

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Sven Mahner

**Inhibierung des Wnt-Signalwegs als therapeutische Option beim  
platinresistenten Ovarialkarzinom-Rezidiv**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Valentina Lirscher, geb. Preinfalk

aus  
Ried im Innkreis

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: PD Dr. Julia Jückstock

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Fabian Trillsch

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2025

## Eidesstattliche Versicherung

Preinfalk, Valentina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Inhibierung des Wnt-Signalwegs als therapeutische Option beim platinresistenten  
Ovarialkarzinom-Rezidiv“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wels, 30.11.2025

Valentina Lirscher

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

## **Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis:	7
Abbildungsverzeichnis:	9
Tabellenverzeichnis:	10
1 Einleitung:	12
1.1 Epidemiologie	12
1.2 Risiko- und Präventivfaktoren	13
1.3 Klassifikation und Pathogenese	16
1.4 Stadieneinteilung	22
1.5 Therapie	23
1.5.1 Operative Therapie	24
1.5.2 Medikamentöse Therapie	26
1.5.3 Rezidivtherapie	28
1.5.4 Nachsorge	30
1.6 Molekulare Mechanismen der Entstehung von Platinresistenz	31
1.7 Wnt-Signalweg	32
1.7.1 Kanonischer Wnt-Signalweg	33
1.7.2 Nicht-kanonischer Wnt-Signalweg	34
1.8 Wnt-Inhibitoren	34
1.8.1 XAV 939	35
1.8.2 SB216763	36
1.8.3 Triptolid	36
2 Zielsetzung	38
3 Material und Methoden	39
3.1 Modellzelllinien	39
3.2 Reagenzien und Materialien	39
3.3 Zellkultur	44
3.3.1 Arbeit an Zellkulturen	44
3.3.2 Kultivierung	45
3.3.3 Konzentrationsfindung der Wnt-Inhibitoren	46
3.3.4 Zellviabilitäts-Test (MTT)	47
3.3.5 Zellproliferations-Test (BrdU)	49
3.3.6 Wound-Healing Assay (Scratch Assay)	51
3.3.7 Cell Death Detection ELISA	53
3.4 Immunzytologie	55
3.4.1 Versuchsdurchführung	56
3.4.2 $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbung	56

3.4.3	M30-Färbung .....	59
3.5	Evaluation und statistische Auswertung .....	61
3.5.1	Zellviabilitäts-Test (MTT).....	61
3.5.2	Zellproliferations-Test (BrdU).....	61
3.5.3	Wound-Healing Assay (Scratch Assay).....	62
3.5.4	Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen.....	62
3.5.5	Cell Death Detection ELISA.....	62
3.5.6	M30-CytoDEATH-Färbung.....	63
4	Ergebnisse .....	64
4.1	Ergebnisse des Zellviabilitäts-Testes (MTT) und des Zellproliferations-Testes (BrdU) 64	
4.2	Ergebnis des Zellmigrations-Assays.....	67
4.3	Ergebnis der Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen .....	70
4.4	Ergebnisse des Apoptose-Assays Cell Death Detection ELISA und der M30-CytoDEATH-Färbung .....	73
5	Diskussion.....	77
6	Zusammenfassung .....	84
7	Danksagung .....	86
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Anhang.....	97
	Ergebnisse des Zellviabilitäts-Testes (MTT) und des.....	97
	Ergebnisse des Zellproliferations-Testes (BrdU) .....	98
	Ergebnis des Zellmigrations-Assays .....	100
	Ergebnis der Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen .....	102

## Abkürzungsverzeichnis:

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA	<i>BReast CAncer</i> Gen
BrdU:	5-Brom-2-desoxyuridin
CA125	<i>Cancer Antigen 125</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CIC	Inklusionszyste
CK1	Casein Kinase 1
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled
ECACC	European Collection of Cell Culture
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FBS	Fetales Kälberserum
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FZD	Frizzled
GSK-3-β	Glykogensynthase-Kinase-3-β
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HET	Hormonersatztherapie
HGSOC	High-grade seröses Ovarialkarzinom
HIOEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses kolorektale Karzinom
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Antikörper vom Typ Immunglobulin-G
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LGSOC	Low-grade seröse Ovarialkarzinom
LGEC	Low-grade endometroides Karzinom
LH	Luteinisierendes Hormon
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
μM	Mikromolar
ml	Mikroliter
MMMT	Maligner Müllerscher Mischtumor
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie

NADH	Nitratreduktase
nM	Nanomolar
NSAR	Nicht-steroidales Antirheumatikum
OS	Gesamtüberleben
OSE	Müller-Oberflächenepithel
PARP	Poly-ADP-ribose-polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSO	prophylaktischen bilateralen Salpingo-Oophorektomie
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFS	Progressionsfreies Überleben
PID	Pelvic inflammatory disease
POD	Peroxidase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RR	Relatives Risiko
STIC	Seröses tubares intraepitheliales Karzinom
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TCF	T-cell Factor
TFI	Treatment-free interval
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor



## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Darstellung des Wnt-Signalweges in aktiver und deaktivierter Form und der Wnt-Inhibitoren.....	35
Abbildung 2: Farbreaktion MTT <sup>133</sup> .....	48
Abbildung 3: Scratch <sup>140</sup> .....	52
Abbildung 4: Metabolische Aktivität der A2780 Zellen im MTT-Test.....	65
Abbildung 5: Metabolische Aktivität der A2780cis Zellen im MTT-Test.....	65
Abbildung 6: Zellproliferation der A2780 Zellen im BrdU-Test.....	66
Abbildung 7: Zellproliferation der A2780cis Zellen im BrdU-Test.....	67
Abbildung 8: Repräsentative Fotos der Wundfläche in den A2780 und A2780cis Zelllinien.....	68
Abbildung 9: Migrationsverhalten der A2780 Zellen.....	69
Abbildung 10: Migrationsverhalten der A2780cis Zellen.....	69
Abbildung 11: Grafische Darstellung des $\beta$ -Catenin-Shift der A2780 Zellen.....	71
Abbildung 12: Grafische Darstellung des $\beta$ -Catenin-Shift der A2780cis Zellen.....	71
Abbildung 13: Repräsentative Fotos nach $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780 und A2780cis Zelllinien.....	72
Abbildung 14: In Apoptose befindliche Zellen des Cell Death Detection ELISA der A2780 und A2780cis Zellen.....	73
Abbildung 15: Prozent der in Apoptose befindlichen A2780 Zellen.....	74
Abbildung 16: Repräsentative Fotos nach M30CytoDEATH-Färbung der A2780 Zellen.....	75
Abbildung 17: Prozent der in Apoptode befindlichen A2780cis Zellen.....	75
Abbildung 18: Repräsentative Fotos nach M30CytoDEATH-Färbung der A2780cis Zellen.....	76

## Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 1: Vergleich zwischen Typ I und Typ II des Ovarialkarzinoms. Modifiziert nach Kurman et al.<sup>39</sup></i>	19
<i>Tabelle 2: Vergleich der häufigsten Tumorentitäten. Modifiziert nach Prat et al.<sup>38</sup></i>	21
<i>Tabelle 3: FIGO- und TNM- Klassifikation beim Ovarialkarzinom</i>	23
<i>Tabelle 4: Zelllinien</i>	39
<i>Tabelle 5: Inhibitoren und Antikörper</i>	40
<i>Tabelle 6: Cisplatin und Zytostatikaschutz</i>	40
<i>Tabelle 7: Geräte und Hilfsmittel</i>	41
<i>Tabelle 8: Plastik- und Glaswaren</i>	42
<i>Tabelle 9: Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterial</i>	43
<i>Tabelle 10: Detektionssystem und, Färbesubstrate</i>	44
<i>Tabelle 11: Konzentrationen der Wnt-Inhibitoren und DMSO-Konzentrationen in den Kontrollen</i>	47
<i>Tabelle 12: Konzentrationen der Substanzen und deren Kontrollen</i>	48
<i>Tabelle 13: Konzentrationen der Wnt-Inhibitoren und DMSO-Konzentrationen in den Kontrollen</i>	52
<i>Tabelle 14: Im Färbeprozess verwendete Materialien</i>	55
<i>Tabelle 15: Ergebnisse von SB216763 im MTT-Test der A2780 Zellen</i>	97
<i>Tabelle 16: Ergebnisse von XAV939 im MTT-Test der A2780 Zellen</i>	97
<i>Tabelle 17: Ergebnisse des Triptolides im MTT-Test der A2780 Zellen</i>	98
<i>Tabelle 18 Ergebnisse von SB216763 im MTT-Test der A2780cis Zellen</i>	98
<i>Tabelle 19: Ergebnisse von XAV939 im MTT-Test der A2780 Zellen</i>	98
<i>Tabelle 20: Ergebnisse des Triptolides im MTT-Test der A2780 Zellen</i>	98
<i>Tabelle 21: Ergebnisse von SB216763 im BrdU-Test der A2780 Zellen</i>	99
<i>Tabelle 22: Ergebnisse von XAV939 im BrdU-Test der A2780 Zellen</i>	99
<i>Tabelle 23: Ergebnisse des Triptolide im BrdU-Test der A2780 Zellen</i>	99
<i>Tabelle 24: Ergebnisse von SB216763 im BrdU-Test der A2780cis Zellen</i>	100
<i>Tabelle 25: Ergebnisse von XAV939 im BrdU-Test der A2780cis Zellen</i>	100
<i>Tabelle 26: Ergebnisse des Triptolides im BrdU-Test der A2780cis Zellen</i>	100
<i>Tabelle 27: Ergebnisse von SB216763 im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen</i>	101
<i>Tabelle 28: Ergebnisse von XAV939 im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen</i>	101
<i>Tabelle 29: Ergebnisse des Triptolid im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen</i>	101
<i>Tabelle 30: Ergebnisse von SB216763 im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen</i>	102
<i>Tabelle 31: Ergebnisse von XAV939 im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen</i>	102
<i>Tabelle 32: Ergebnisse des Triptolid im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen</i>	102
<i>Tabelle 33: Ergebnisse von SB216763 in der <math>\beta</math>-Catenin-Färbung der A2780 Zellen</i>	103
<i>Tabelle 34: Ergebnisse von XAV939 in der <math>\beta</math>-Catenin-Färbung der A2780 Zellen</i>	103
<i>Tabelle 35: Ergebnisse von SB216763 in der <math>\beta</math>-Catenin-Färbung der A2780cis Zellen</i>	103
<i>Tabelle 36: Ergebnisse von XAV939 in der <math>\beta</math>-Catenin-Färbung der A2780cis Zellen</i>	103
<i>Tabelle 37: Ergebnisse des Triptolid in dem Cell Death Detection ELISA der A2780 Zellen</i>	104
<i>Tabelle 38: Ergebnisse des Triptolid in dem Cell Death Detection ELISA der A2780cis Zellen</i>	104

<i>Tabelle 39: Ergebnisse des Triptolid in der M30CytoDEATH-Färbung der A2780 Zellen .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 40: Ergebnisse des Triptolid in der M30CytoDEATH-Färbung der A2780cis Zellen .....</i>	<i>105</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste gynäkologische Karzinom und ist aufgrund der hohen Letalität in Industrienationen die vierthäufigste weibliche Tumortodesursache.<sup>1,2</sup> Mit einer relativ geringen Inzidenz von 7.350 Fällen erkrankt etwa jede 75. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom.<sup>3,4</sup> Somit ist das Ovarialkarzinom noch vor dem Mammakarzinom die gynäkologische Tumorerkrankung mit der höchsten Mortalität und macht die Hälfte aller Sterbefälle durch Tumore am weiblichen Genital aus.<sup>4,5</sup>

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 68 Jahren steigt die Erkrankungsrate bis zum 85. Lebensjahr an. Insgesamt nehmen Prävalenz und Mortalität seit der Jahrtausendwende deutlich ab, zudem sinkt auch die absolute Zahl der Neuerkrankungen.<sup>4</sup> Entwicklungsländer verzeichnen eine geringere Inzidenz von Ovarialkarzinomen, wobei sich in Asien und Afrika mit unter drei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern die geringsten Raten finden. Infolge von Migration aus diesen Ländern nach Nordamerika oder Europa resultiert jedoch in einem erhöhten Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.<sup>3</sup>

Derzeit liegt das 5-Jahres-Überleben stadienübergreifend bei ca. 43%.<sup>1,4</sup> Bei Frauen in frühen Erkrankungsstadien (FIGOI) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei etwa 90%, jedoch findet eine so frühe Diagnose nur in 15% der Fälle statt.<sup>3,23</sup> Die Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms wird jedoch in 70% der Fälle erst in den fortgeschrittenen Stadien (FIGOII-IV) gestellt.<sup>6,7</sup> Das 5-Jahres-Überleben bei Patientinnen im FIGO-Stadium IV beträgt unter 20%.<sup>7-9</sup>

Von besonderer Bedeutung ist somit eine möglichst frühzeitige Diagnose. Dies wird jedoch durch die relativ unspezifische Symptomatik erschwert.<sup>10</sup> So stellen sich Patientinnen meist primär beim Hausarzt aufgrund von unklarer Gewichtsabnahme, Zunahme des Bauchumfanges, diffuser abdominaler Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust und Veränderungen der Miktions- und Defäkationsgewohnheiten vor. Ein weiteres Symptom kann selten auch eine postmenopausale Blutung sein.<sup>11,12</sup>

Betroffene Frauen assoziieren diese Veränderungen oftmals mit physiologischen Alterungsprozessen, der Menopause oder Nachwirkungen von vorhergehenden Schwangerschaften. Dies und die Ähnlichkeit der Symptome des Ovarialkarzinoms zu gastrointestinalen Erkrankungen führen dazu, dass nur 50% der Frauen direkt in eine Gynäkologische Onkologie überwiesen werden.<sup>12</sup> Zudem wurde festgestellt, dass eine mögliche Früherkennung durch ein flächendeckendes Screening durch transvaginale Ultraschalluntersuchungen und Bestimmung der Serumkonzentration von Cancer Antigen 125 (CA125) derzeit keinen Einfluss auf die Mortalität nehmen.<sup>13,14</sup>

Prognosebestimmende Faktoren für das Gesamtüberleben stellen neben Alter und Allgemeinzustand das initiale Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, der histologische Typ, sowie das Grading des Tumors dar.<sup>15</sup> Hervorzuheben ist hierbei die hohe Relevanz der kompletten chirurgischen Tumorexzision des Primärtumors als wichtigster und zu beeinflussender Prognosefaktor beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.<sup>16</sup>

## 1.2 Risiko- und Präventivfaktoren

Eine familiäre Häufung an Mamma- und Ovarialkarzinomen gilt als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Frauen mit genetischer Prädisposition werden etwa 10 Jahre vor dem mittleren Erkrankungsalter diagnostiziert.<sup>1</sup> Der Anteil hereditär bedingter Ovarialkarzinome liegt etwa bei ungefähr 26%.<sup>17,18</sup> Oftmals liegt hierbei eine Keimbahnmutation in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* vor.<sup>4</sup> Diese *BRCA* Gene gehören zur Gruppe der Tumorsuppressorgene und sind wichtig für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Bei Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation liegt das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bei 36 bis 48%, bei einer Mutation des *BRCA2*-Gens erkranken 10 bis 27%.<sup>19</sup> Bei der *BRCA1/2*-Mutation handelt es sich vom histologischen Subtyp meist um high-grade seröse Karzinome.<sup>3</sup>

Die effektivste Methode hierbei, das Erkrankungsrisiko und somit auch die Mortalität zu senken, ist die Durchführung einer prophylaktischen bilateralen Salpingo-Oophorektomie (PBSO) nach abgeschlossener Familienplanung.<sup>15</sup> Eine PBSO reduziert das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, um 80% und reduziert die Mortalität bezogen auf gynäkologische Tumore um 95%.<sup>19,20</sup>

Sie wird in der Regel nach Abschluss der Familienplanung und 5 Jahre vor dem Erkrankungsalter des jüngsten erkrankten Familienmitglieds empfohlen.<sup>19</sup>

Neben der PBSO scheint auch eine vorangegangene Tubenligatur oder Hysterektomie das Ovarialkarzinomrisiko um 26 - 30% zu reduzieren.<sup>21</sup> Der Grund dieser Risikoreduktion durch solche Eingriffe ist möglicherweise, die dadurch verhinderte retrograde Menstruation zu sein, die einen positiven Einfluss auf den klinischen Verlauf nimmt. Bei dieser Hypothese wird postuliert, dass bei der Menstruation endometriales Gewebe retrograd durch die Eileiter ins Ovar fließt, sich dort implantiert und somit das Endometrium der Ursprung für ovarielle Neoplasien ist.<sup>3,22</sup>

Eine weitere, mit dem Ovarialkarzinom assoziierte Erkrankung, ist das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) oder auch Lynch-Syndrom genannt.<sup>15</sup> Durch eine Mutation von DNA-Mismatch-Reparaturproteinen kommt es hier zu einer Mikrosatelliteninstabilität. Dies bedeutet, dass Fehler bei der DNA-Replikation im Rahmen der Zellteilung nicht mehr erkannt und repariert werden können. Das autosomal-dominante HNPCC ist für 2% der Ovarialkarzinome verantwortlich und geht mit einem Lebenszeitrisiko von 20% einher. Diese Karzinome entsprechen dabei typisch endometroiden oder klarzelligen Tumoren.<sup>3</sup>

In vielen Studien konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen hormonellen und reproduktiven Faktoren und der Entstehung eines Ovarialkarzinoms gezeigt werden.<sup>3</sup> Einen protektiven Faktor stellt dabei die Einnahme von oralen Kontrazeptiva (OC) dar. Je länger Frauen eine orale Kontrazeption nutzen, desto niedriger wird das Risiko der Erkrankung. Insgesamt reduziert sich das relative Risiko um 20% pro fünfjahrelanger Einnahme. Eine Risikoreduktion um 50% stellt sich nach einer 15-jährigen OC-Therapie ein. Diese Reduktion des Erkrankungsrisikos verringert sich im Laufe der Jahre, persistiert aber für über 30 Jahre nach letzter Einnahme eines oralen Kontrazeptivums.<sup>23</sup> Auch bei Trägerinnen einer *BRCA1/2*- Mutation konnte eine Risikoreduktion proportional zur Länge der Einnahme der oralen Kontrazeptiva gezeigt werden. Zudem wurde durch eine orale Kontrazeption auch keine Erhöhung des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken, gefunden.<sup>24</sup>

Diese Ergebnisse unterstützen zwei der dominierenden Theorien zur Entstehung des Ovarialkarzinoms. Bei der „incessant ovulation“, auch Hyperovulationshypothese genannt, wird postuliert, dass die ovulationsbedingte erhöhte Zellteilung zur Reparatur der ständigen Läsionen des Oberflächenepithels in einer erhöhten Spontanmutation der Zellen resultiert.<sup>3,10</sup>

Die ergänzende Gonadotropinhypothese geht davon aus, dass ein hoher Spiegel der Gonadotropine LH und FSH, wie es während der Ovulation der Fall ist, die Epithelzellen des Ovars stimulieren und so eine vermehrte karzinogene Entwicklung provozieren.<sup>25</sup>

Beide Theorien unterstützen somit die Korrelation zwischen der Anzahl an Ovulationszyklen und dem Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.

Nach der Hyperovulationshypothese erhöht somit eine frühe Menarche beziehungsweise späte Menopause das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.<sup>3,26</sup>

Infertilität und Nulliparität sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko für ein Ovarialkarzinom. Besonders Frauen, welche eine fertilitätssteigernde Medikation eingenommen haben und dennoch nullipar geblieben sind, scheinen ein von der Dauer der Therapie abhängiges erhöhtes Risiko aufzuweisen.<sup>3,27</sup>

Die mit Parität sowie Laktation verbundene Anovulation und Suppression von Gonadotropinen geht mit einem verringerten Risiko des Ovarialkarzinoms einher. Frauen, die schwanger waren, haben im Vergleich zu Nullipara ein um 30 – 60% geringeres Risiko. Zudem reduziert jede voll ausgetragene Schwangerschaft das Risiko um weitere circa 15%. Unklar ist noch, ob spontane oder induzierte Aborte einen Einfluss auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms nehmen.<sup>3</sup>

Einen protektiven Effekt wird auch dem Stillen zugeschrieben und soll mit der Stilldauer zunehmen. Frauen, die gestillt haben, lassen ein um 30% erniedrigtes Risiko vermuten im Vergleich zu Frauen, die nie gestillt haben.<sup>28</sup>

Eine Hormonersatztherapie (HET) ist laut vieler Metaanalysen mit einem um ein Drittel gesteigerten Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, assoziiert. Die Risikosteigerung ist von der Dauer der Hormontherapie abhängig und schon bei einer Anwendung unter fünf Jahren erhöht. Es wurde dabei kein signifikanter Unterschied zwischen einer reinen Östrogen-Therapie oder einer Östrogen-Gestagen-Therapie festgestellt. Allgemein wird das Risiko primär für seröse und endometroide Tumore berichtet. Das Alter zu Beginn der Hormontherapie zeigte dabei keine Auswirkungen. Noch zehn Jahre nach letzter Hormoneinnahme ist das Risiko für diese Karzinome erhöht.<sup>15,29</sup> Es zeigt sich jedoch kein Einfluss des BMI der Frauen auf das Erkrankungsrisiko durch eine HET.<sup>30</sup>

Auch benigne gynäkologische Erkrankungen stellen mögliche Risikofaktoren dar. Bei der Endometriose, welche ca. 10 – 15% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betrifft, ist besonders das Risiko für ein endometroides und klarzelliges Karzinom

erhöht und kann die Abgrenzung von auffälligen Ovarialbefunden in der gynäkologischen Routine erschweren.<sup>31</sup>

Das Polyzystische Ovar-Syndrom scheint zwar mit einem erhöhten Risiko für endometroide Tumore assoziiert zu sein, die Daten dazu sind jedoch zu limitiert.<sup>3</sup>

Eine Erklärung für den Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und dem Ovarialkarzinom bietet die Entzündungshypothese. Diese dritte Theorie zur Ätiologie postuliert, dass es bei der Ovulation zu Entzündungsreaktionen im Bauchraum kommt. Diese Entzündungen führen zu DNA-Schäden bei Reparaturvorgängen, oxidativen Stress und einer Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen, wodurch das mutagene Potential der Zellen erhöht wird.<sup>32</sup> Für diese Hypothese spricht auch, dass die Einnahme von Entzündungshemmern, wie nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), mit einer Risikoreduktion assoziiert zu sein scheint.<sup>3</sup>

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms stellen auch die Adipositas im Erwachsenenalter (RR von 1,3) und Nikotinabusus (RR von 1,06, jedoch RR von 2,25 für borderline maligne muzinöse Ovarialkarzinome) dar.<sup>33,34</sup> Eine Exposition gegenüber Asbest erhöht ebenfalls das Risiko.<sup>35</sup>

Festzuhalten ist, dass neben den aggressiven Genmutationen die bekannten Risikofaktoren das Erkrankungsrisiko zwar beeinflussen, aber vermutlich nicht in großem Ausmaß erhöhen. Zudem sind sie nicht für alle Unterschiede in den Schwankungen der Inzidenzen verantwortlich. Diesbezüglich ist es sicherlich notwendig zukünftig weitere Parameter zur Entstehung des Ovarialkarzinoms zu identifizieren.<sup>3</sup> Trotzdem ist angesichts der hohen Letalität der Erkrankung die bestmögliche Prävention elementar. Neben der effektiven Behandlung der Endometriose und der Einnahme von Kontrazeptiva ist die Nikotinkarenz eine wichtige Maßnahme zur Risikoreduktion.<sup>36</sup>

### **1.3 Klassifikation und Pathogenese**

Beinahe alle Ovarialtumore lassen sich den folgenden Kategorien zuordnen: Epitheliale Tumore, Keimstrang-Stroma-Tumore und Keimzell-Tumore. Diese Einteilung basiert auf den drei histologischen Bestandteilen des Ovarialkortex. Die oberflächlichste Schicht ist das Müller-Oberflächenepithel (OSE). Unter dieser liegt



das Stroma, eine dichte Bindegewebsschicht, in der die Keimzellen (Follikel) eingebettet sind.

Die Dignität wird unterteilt in benigne (kein invasives Wachstum, keine Metastasierung), maligne (invasives und destruktives Wachstum, Metastasierung) und Borderline-Tumore, welche zwar eine atypische Proliferation, jedoch non-invasives und nicht-destruktives Wachstum aufweisen.<sup>37</sup>

Etwa 60% aller ovarialer Tumore und mehr als 90% der malignen Tumore sind epithelialen Ursprungs, auf welchen auch der Fokus dieser Arbeit liegt.<sup>3,37</sup>

Die Tumortypen unterscheiden sich bezüglich Epidemiologie, genetischen Risikofaktoren, Vorläuferläsionen, Ausbreitungsmustern, molekularbiologischer Pathogenese, Ansprechen auf Chemotherapie und Prognose. Eine Unterscheidung der verschiedenen Histopathologien ist allgemein für eine erfolgreiche Therapie von großer Bedeutung.<sup>38</sup>

Anhand der morphologischen und molekulargenetischen Eigenschaften werden epitheliale Ovarialtumore in Typ I und Typ II kategorisiert (siehe Tabelle 1).<sup>39</sup>

Tumore des Typ I machen 25% der Ovarialkarzinome aus. Sie sind gut differenziert, wachsen langsam und präsentieren sich meist als große zystische Neoplasien und sind auf ein Ovar begrenzt.<sup>39</sup> Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz im Kolorektalkarzinom entsteht der Typ I Tumor im Rahmen einer Tumorprogression aus benignen zystischen Neoplasien, oftmals in einem intermediären Stadium als Borderline-Tumor. Der Prototyp für den Typ I stellt das mit Endometriose assoziierte low-grade endometroiden Karzinom (LGEC) dar. Weiters zählen das klarzellige und seromuzinösen Karzinom, das low-grade seröse Karzinom (LGSC), das muzinöse Karzinom sowie der maligne Brenner-Tumor dazu. Sie sind genetisch stabiler als Typ II Tumore und weisen spezifische Genmutationen auf. Bei den low-grade serösen Karzinomen finden sich in 67% Mutationen in *KRAS*, *BRAF* und *ERBB2* mit folgender Mikrosatelliteninstabilität. Es zeigt sich jedoch nur selten eine Mutation in *p53*.<sup>22,39,40</sup> *KRAS* und *BRAF* sind Proto-Onkogene, welche an der Regulation des RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-Signalwegs beteiligt sind. Diese Kaskade steuert das Zellwachstum und wird durch eine Mutation von *KRAS* oder *BRAF* kontinuierlich aktiviert. Es kommt zur unkontrollierten Proliferation und Zellteilung.<sup>39,41</sup>

Die meisten Borderline-Tumore haben primär benigne Eigenschaften und haben eine gute Prognose. Manche Tumore können jedoch nach chirurgischer Exzision

rezidivieren oder bilden peritoneal lokalisierte Epithelproliferate, sogenannte Implantate.<sup>37</sup> Etwa 10% dieser peritonealen Implantate entwickeln sich zu low-grade Karzinomen und wachsen dann invasiv in das umliegende Gewebe mit einer entsprechenden Prognoseverschlechterung.<sup>39</sup> Aufgrund ihrer niedrigen Inzidenz und der schwierigen histopathologischen Einteilung ist die Entscheidung für die optimale Therapie und Follow-up oft herausfordernd.<sup>42</sup> Eine entscheidende Rolle für die Prognose der Borderline-Tumore spielt hierbei ein individuelles chirurgisches Staging.<sup>43</sup> Da sich ein Drittel der Patientinnen mit einem Borderline-Tumor im reproduktiven Alter befindet (< 40 Jahren) ist besonders auf fertilitätserhaltende Aspekte in der Wahl des Therapieregimes zu achten.<sup>44</sup>

Typ II Tumore wachsen sehr aggressiv und werden in über Dreiviertel der Fälle in späten Erkrankungsstadien diagnostiziert. Bestehend ist die Gruppe der Typ II Tumore aus high-grade serösen (HGSC), high-grade endometroiden (HGEC), undifferenzierten Karzinomen und Sarkomen.<sup>22,39,40</sup> Sie machen 75% aller Ovarialkarzinome aus, sind jedoch für 90% der letalen Verläufe verantwortlich. Dies liegt am HGSC, denn bei nur 10% der Patientinnen mit diesem Tumortyp ist dieser bei der Diagnosestellung auf das Ovar begrenzt. Dabei ist die Tumormasse im Ovar erheblich weniger als bei Typ I Tumoren, jedoch ist oftmals der extraovariale Befall von Omentum und Mesenterien massiv. Auch Aszites ist häufiger anzutreffen.<sup>38,39</sup>

Es ist zudem davon auszugehen, dass viele primär als ovarial eingestufte Tumore ursprünglich aus dem Eileiter oder Endometrium des Uterus stammen (besonders seröse, endometroide und klarzellige Karzinome).<sup>22,38</sup> Diesbezüglich gibt es beim high-grade serösen Karzinom zwei gängige Hypothesen.<sup>45</sup>

Als eine mögliche Vorläuferläsion des HGSC wurde in den vergangenen Jahren das seröse tubare intraepitheliale Karzinom (STIC) identifiziert, welches typischerweise aus den Fimbrien, dem distalen Teil der Tube, entsteht und seinen Ursprung somit nicht in den Ovarien nimmt. Der STIC-Hypothese nach schilfern sich maligne Zellen von den Tuben ab, welche sich dann am Ovar implantieren und so den Anschein geben, primär vom Ovar auszugehen.<sup>45,46</sup> Die Grundlage für diese Hypothese wurde durch molekulargenetische Untersuchungen von den Tuben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom geschaffen. Dabei wurde bei 92% der untersuchten Tuben STICs nachgewiesen, welche eine identische *p53*-Mutation (auch *p53*-Signatur genannt) wie im HGSC aufwies. Dies deutet auf eine klonale Beziehung hin.<sup>47</sup>

Ein zweiter möglicher Mechanismus in der Entstehung von Vorläuferläsionen ist die Implantation von Fimbrienepithel auf die Oberfläche des Ovars im Rahmen der Ovulation. Diese atypischen Zellen der Tube können eine Inklusionszyste (CIC) bilden und später zu malignen Zellen transformieren.<sup>45</sup>

Häufig finden sich bei Typ II Tumoren Mutationen in *p53* und *BRCA1* und *BRCA2*, jedoch selten eine der für den Typ I üblichen Mutationen.<sup>22,38,39</sup>

Der Tumorsuppressor *p53* hat die Aufgabe, die Proliferation entweder durch Arrest des Zellzyklus zu stoppen, um Reparaturvorgänge an der DNA vorzunehmen, oder durch Induktion der Apoptose. Ist *p53* mutiert, können sich die Zellen auch mit DNA-Schäden unkontrolliert teilen.<sup>48</sup>

	Typ I	Typ II
Häufigkeit	25%	75%
Diagnosestadium	eher früh	fast immer spät
Wachstum	langsam und indolent	schnell und invasiv
Differenzierung	gut differenziert	schlecht differenziert
Proliferationsaktivität	eher niedrig	sehr hoch
Chemosensitivität	Gering	Allgemein gut
Aszites	selten	Häufig
Gesamtüberleben	Stadienabhängig, bei Primärdiagnose gut	Schlechter
Risikofaktoren	Endometriose, BOT	<i>BRCA</i> -Mutationen, hohe Anzahl an Ovulationen
Vorläuferläsionen	benigne zystische (borderline) Tumore	meist STICs
genetische Stabilität	stabil	Instabil
<i>P53</i> Mutationen	selten	fast immer
Weitere Mutationen	<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> und <i>ERBB2</i>	Selten

**Tabelle 1: Vergleich zwischen Typ I und Typ II des Ovarialkarzinoms.** Modifiziert nach Kurman et al.<sup>39</sup>

Basierend auf den histopathologischen Eigenschaften werden fünf Haupttypen unterschieden. Das high-grade seröse Ovarialkarzinom (HGSOC) macht dabei 70% aller Ovarialkarzinome aus, das endometroide Karzinom 10%, das klarzellige

Karzinom ebenfalls 10%, das muzinöse Karzinom macht 3% aus, und das low-grade seröse Ovarialkarzinom (LGSOC) unter 5% der Fälle (siehe Tabelle 2).<sup>38</sup>

Seröse Tumore sind mit 70% die am häufigsten vorkommende Entität des Ovarialkarzinoms. Wie oben beschrieben stellt das LGSC dabei den Prototyp für den Typ I Tumor und das HGSC für den Typ II. <sup>45</sup> Etwa 60% der serösen Karzinome findet man bilateral.<sup>37</sup> Seröse Borderline Tumore machen einen Anteil von 10 – 15% aus.<sup>37</sup> Fast alle mit *BRCA1* oder *BRCA2*-Mutationen assoziierten Ovarialkarzinome sind HGSC.<sup>1</sup>

Das endometroide Karzinom wird von Zellen geformt, die dem Endometrium des Uterus gleichen.<sup>37</sup> Es ist mit Endometriose assoziiert und wird analog zum endometroiden Karzinomen des Corpus uteri anhand der Kernatypien und dem Ausmaß an soliden Anteilen in G1, G2 oder G3 graduiert.<sup>15</sup> Es wird entsprechend der Differenzierung und Histomorphologie in low-grade (Typ I) und high-grade (Typ II) eingeteilt. Aberrationen im Wnt-Signalweg mit somatischen Mutationen von *CTNNB1* (codierend für  $\beta$ -Catenin), in *ARID1A*, *PTEN* und *PIK3CA* finden sich in low-grade endometroiden Karzinomen, während beim high-grade *p53* Mutationen charakteristisch sind.<sup>22,40</sup>

Klarzellige Karzinome machen, wie auch das endometroide Karzinom, 10% der Ovarialkarzinome aus. Von den betroffenen Frauen sind zwei Drittel nullipara und 50–70% leiden unter Endometriose.<sup>37</sup> Zu einem hohen Anteil liegt eine Aktivierung von *ARID1A* oder *PIK3CA* vor.<sup>22,40</sup>

Muzinöse maligne Tumore weisen intestinales oder gastrales Epithel auf und beinhalten muzinöses Material.<sup>37</sup> Sie werden häufig schon in frühen Stadien diagnostiziert, machen jedoch nur 3% der Tumore aus.<sup>1</sup> Sie zeigen zu 50% Mutationen in *KRAS* und entstehen schrittweise aus benignen Zystadenomen, welche sich zu Borderline-Tumoren und dann invasiven Karzinomen entwickeln.<sup>15,22,40</sup>

Es folgt eine Zusammenfassung der häufigsten Tumorentitäten:

### Häufigste Tumorentitäten

	High-grade seröses Karzinom	Endometroides Karzinom	Klarzelliges Karzinom	Muzinöses Karzinom	Low-grade seröses Karzinom
Häufigkeit	70%	10%	10%	3%	< 5%
Assoziierte Molekularpathologie	<i>P53, BRCA1/2,</i> hohe gen. Instabilität	<i>PTEN, ARIDA1A</i>	<i>ARIDA1A</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRAF, KRAS, selten</i> <i>p53, gen. stabil</i>
Mögliche Vorläuferläsion, Assoziation mit	STIC, kortikale Inklusionszysten	Atypische Endometriose, endometroider Borderline-Tumor	Atypische Endometriose. klarzelliger Borderline Tumor	Muzinöser Borderline-Tumor, muzinöse Zystadenome, Teratom, Brenner Tumor	Seröser Borderline- Tumor
Chemo-sensibilität	hoch	hoch	Niedrig	niedrig	intermediär

**Tabelle 2: Vergleich der häufigsten Tumorentitäten. Modifiziert nach Prat et al.<sup>38</sup>**

## 1.4 Stadieneinteilung

Die korrekte Stadieneinteilung eines Ovarialkarzinoms ist wichtig, um eine Vergleichbarkeit der Patientinnen zu ermöglichen und die Patienten anhand der Prognose einer entsprechenden Behandlung zuzuordnen.<sup>49</sup>

Im Rahmen der gynäkologischen Evaluation können hierfür neben der transvaginalen Ultraschalluntersuchung können auch Computertomographie, Positronen-Emissions-Tomografie (PET), PET/CT, oder Magnetresonanztomographie zur besseren Beurteilung des Abdomens eingesetzt werden, wichtigster Bestandteil hierfür ist jedoch ein komplettes operatives Staging durch eine offene abdominale Exploration.<sup>15</sup> Das Ovarialkarzinom wird mit Hilfe der FIGO- und TNM-Klassifikation in Tumorstadien eingeteilt werden und bilden die Grundlage für Therapieentscheidungen. Aus klinischer Sicht werden in diesen Klassifikationen die Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms zusammengefasst.<sup>15,49</sup>

FIGO	TNM	Anatomische Ausbreitung
I	T1	Tumor auf Ovarien bzw. Tuben begrenzt
I A	T1a	Tumor auf ein Ovar bzw. eine Tube begrenzt, Kapsel bzw. Serosa intakt, Spülzytologie negativ, tumorfreie Ovar- bzw. Tubenoberfläche
I B	T1b	Tumor auf beide Ovarien bzw. Tuben begrenzt, Kapsel bzw. Serosa intakt, Spülzytologie negativ, tumorfreie Ovar- bzw. Tubenoberfläche
I C	T1c	Tumor auf ein oder beide Ovarien bzw. Tuben mit einem der folgenden Punkte:
I C 1	T1c1	Iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
I C 2	T1c2	Präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf Ovar- bzw. Tubenoberfläche
I C 3	T1c3	malignen Zellen im Aszites bzw. der Spülzytologie
II	T2	Tumorbefall ein oder beider Ovarien bzw. Tuben, zytologisch oder histologisch nachgewiesene Ausbreitung im kleinen Becken oder primäres Peritonealkarzinom
II A	T2a	Tumorinfiltration des kleinen Beckens und/oder Tumorimplantate auf Uterus, Tuben oder Ovarien

II B	T2b	Tumordinfiltration des kleinen Beckens mit Ausbreitung auf intraperitoneale Strukturen
III	T3 und/oder N1	Tumorbefall eines oder beider Ovarien bzw. Tuben oder primäres Peritonealkarzinom, zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
III A	T3a	Tumorausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder Peritonealmetastasen
III A i	N1a	Mikroskopische Peritonealmetastasen $\leq 10$ mm
III A ii	N1b	Mikroskopische Peritonealmetastasen $> 10$ mm
III B jedes N	T3b	Makroskopische extrapelvine Tumorausbreitung $\leq 2$ cm auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit/ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
III C jedes N	T3c	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung $> 2$ cm auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit/ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; inklusive Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel
IV	M1	Fernmetastasen, exklusive Peritonealmetastasen
IV A	M1a	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
IV B	M1b	Parenchymmetastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in extraabdominellen Organen (inklusive inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

**Tabelle 3: FIGO- und TNM- Klassifikation beim Ovarialkarzinom**

## 1.5 Therapie

Sofern keine Kontraindikationen bestehen, sollte die leitliniengerechte Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms aus einer Operation mit dem Ziel der maximalen Tumorreduktion und einer anschließenden Systemtherapie bestehen. Der systemische Therapieansatz beinhaltet in den meisten Fällen einer Kombination aus Chemotherapie und zielgerichteten Therapeutika. Entscheidend ist, dass die Therapie frühestmöglich begonnen wird, um Rezidive so lange wie möglich zu verhindern.

Seit dem Jahr 2004 konnte durch eine laufende Qualitätskontrolle der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie), der QS-OVAR Studie, eine

deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) in Deutschland beobachtet werden. Ein optimales chirurgisches Ergebnis konnte von vormals 42% in 71% der Patientinnen erreicht werden. Das PFS nach 2 Jahren erhöhte sich in dieser Gruppe auf 84% gegenüber 71% der Patientinnen mit suboptimaler chirurgischer Therapie. Damit erhöhte sich auch das 2-Jahres-Überleben auf 91% im Vergleich zu 76% in der untertherapierten Gruppe. Auch eine Steigerung im Bereich der verabreichten optimalen systemischen Therapie konnte verzeichnet werden. Im Falle der optimalen chirurgisch-systemischen Kombinationstherapie beobachtete man eine 2-Jahres-Überleben von 93%, während bei suboptimalen Bedingungen 68% erreicht wurden.<sup>50</sup> Ein weiterer Aspekt in der Therapie ist die primäre Erhaltungstherapie mit dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab, welche auf 67,3% im Jahr 2016 stieg.<sup>51</sup> Damit ließ sich eine Erhöhung des Gesamtüberlebens auf 46,2 Monate erzielen. Im Vergleich dazu lag das Gesamtüberleben nach Chemotherapie ohne anschließende Erhaltungstherapie bei 39 Monaten.<sup>52</sup>

### **1.5.1 Operative Therapie**

Wird das Ovarialkarzinom in einem frühen Stadium diagnostiziert (FIGO-Stadien I bis IIA) ist ein umfassendes operatives Staging angezeigt. Dieses ist entscheidend, da ein Upstaging bei Bestätigung einer zusätzlichen Tumormanifestation eine Änderung in der folgenden Therapie nach sich zieht.

Eine Staging-Op umfasst die Längslaparotomie mit anschließender Evaluation der gesamten Abdominalhöhle durch Inspektion und Palpation. Zudem werden Biopsien aus suspekten, sowie makroskopisch unauffälligen Bereichen des Peritoneums entnommen. Eine Peritonealzytologie wird aus Aszites oder durch Spülung der Peritonealhöhle mit Kochsalz gewonnen. Bei nicht Erhaltung der Fertilität werden beidseits die Adnexe und der Uterus exstirpiert. Weiters folgt die Entfernung des infragastrischen und infrakolischen Omentums und die systematische pelvine und paraaortale Lymphnodektomie. Durch diese Maßnahme konnten okkulte Lymphknotenmetastasen, welche in bis zu einem Drittel der Patientinnen vorkommen, häufiger erkannt werden als durch ein „sampling“. Ein positiver Lymphknotenbefund führt zu einem Upstaging in Stadium FIGO III.<sup>53</sup>

Bei muzinösen Karzinomen oder unklarem Tumortyp wird zudem eine Appendektomie durchgeführt.<sup>15</sup>



Zur Fertilitätserhaltung kann bei unilateralen serösen, muzinösen oder endometroiden Tumoren im gesicherten FIGO Stadium I eine unilaterale Salpingo-Oophorektomie und ein Verzicht auf die Hysterektomie erwogen werden.<sup>54</sup> Über die dadurch erhöhte Rezidivrate und eine engmaschigere Nachsorge bei fertilitätserhaltendem Vorgehen muss die Patientin dabei unbedingt aufgeklärt werden.<sup>15</sup>

Wie bereits oben beschrieben ist ein adäquates Staging äußerst wichtig. Sollte es durch fehlende Voraussetzungen zu einem inkompletten Staging kommen, beispielsweise einem in Rahmen einer Operation durch Zufall entdecktem Ovarialkarzinom, muss eine zweite Re-Staging-Operation nachgeholt werden.<sup>15</sup>

Gemäß der S3-Leitlinie soll bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom primär ein operativer Ansatz mit maximaler Zytoreduktion (Debulking-Operation) und dem Ziel der makroskopischen Tumorfreiheit durchgeführt werden.

Ausgeführt wird die Debulking-Operation wie die Staging-Operation über eine mediane Laparotomie. Über einen retroperitonealen Zugang erfolgt die pelvine Resektion mit möglicher zusätzlicher Entfernung von tumorbefallenem Blasen- und Douglasperitoneum. In mehr als 50% der Fälle ist eine viszerale Resektion notwendig. So ist bei Infiltration des Rektosigmois die En-bloc-Resektion von Uterus, Adnexen und Colon sigmoideum unumgänglich. Das Omentum majus sowie benachbarte Milzanteile werden reseziert und die Bursa omentalis exploriert. Fallweise ist es erforderlich das tumorbefallene Omentum minus, des befallenen parietalen Peritoneums, inklusive Zwerchfellperitoneum, und im Bereich des Mesenteriums das viszerale Peritoneum zu entfernen. Notwendige Eingriffe im Oberbauch erhöhen die perioperative Morbidität und sind nur bei möglicher R0-Resektion empfohlen. Eine Resektion der Appendix ist bei Tumorbefall unumgänglich und sollte bei muzinöser oder intraoperativ nicht eindeutiger Differenzierung erfolgen.<sup>15</sup>

Anders als bei der Staging-OP soll bei makroskopischer Tumorfreiheit und unauffälligen Lymphknoten keine Lymphonodektomie vorgenommen werden. In der LION-Studien konnte gezeigt werden, dass Patientinnen durch eine Entfernung der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten weder in der progressionsfreien Zeit noch im Gesamtüberleben profitieren. Zudem ist durch eine Lymphonodektomie die Komplikationsrate und die 60-Tage Mortalität erhöht.<sup>55</sup>

Prognosebestimmend für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom ist der postoperative Tumorrest nach Primäroperation. Es konnte gezeigt werden, dass das

Gesamtüberleben von Patientinnen mit Stadium FIGO IIB–IIIB durch eine makroskopische Komplettresektion um ca. 60 Monate verlängert werden kann. Selbst im Stadium FIGO IV zeigte sich das Überleben um 30 Monate verlängert.<sup>56</sup> Bei einem verbliebendem Resttumor von  $\leq 1$  cm fand sich in Studien weiter ein signifikanter Vorteil im Vergleich zu Resttumoren  $> 1$  cm, gegenüber einer Komplettresektion ist das Gesamtüberleben jedoch deutlich reduziert. Ohne Operation beschränkt sich im Stadium FIGO IV das mediane Überleben auf circa 2 Monate.<sup>57,58</sup>

### 1.5.2 Medikamentöse Therapie

Der zweite Bestandteil der Primärtherapie ist eine kombinierte Systemtherapie, welche ausgenommen im Stadium IA Grad 1, unabdingbar ist.<sup>59</sup>

Die Standard-Chemotherapie (First-Line) ist dabei die Kombination aus platin- und taxanaltigen Chemotherapeutika, bevorzugt Carboplatin und Paclitaxel. Diese beiden Substanzen haben sich aufgrund eines besseren Nebenwirkungsprofils und Lebensqualität im Vergleich zu Cisplatin beziehungsweise Docetaxel durchgesetzt.<sup>60,61</sup> Eine Monotherapie mit Carboplatin sollte beim frühen Ovarialkarzinom (FIGO IB–C) aufgrund des besseren Nebenwirkungsprofils als der Kombinationstherapie verabreicht werden

Der VEGF-Inhibitor Bevacizumab wird beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (Stadium IIIB bis IV) zur Verlängerung des progressionsfreien Überlebens addiert und kann anschließend als Erhaltungstherapie bis zu 15 Monaten fortgeführt werden.<sup>62,63</sup> Zur Erhaltungstherapie gibt es die Möglichkeit der Monotherapie mit Bevacizumab oder einem Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitor sowie einer Kombinationstherapie. Die Therapie mit einem PARP-Inhibitor, Olaparib oder Niraparib, wird bei fortgeschrittenem epitheliale high-grade Karzinom (FIGO-Stadien III und IV) mit Ansprechen (komplett oder partiell) auf platinbasierte Chemotherapie empfohlen. In der SOLO1-Studie zeigte sich für Olaparib keine negativen Veränderungen bei der Lebensqualität bei signifikanter Verbesserung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Placebo.<sup>64,65</sup>

Eine Kombination von Bevacizumab und Olaparib wird angewendet bei Patientinnen mit einem positiven Status der homologen Rekombinations-Defizienz (HRD, entsprechend BRCA1/2 Mutation oder genomische Instabilität) nach erfolgter Erstlinienchemotherapie, auf die sie ein Ansprechen gezeigt haben.<sup>66</sup>

Weiters konnte in Studien eine Steigerung des progressionsfreien Überlebens, jedoch nicht des Gesamtüberlebens für die Tyrosinkinase-Inhibitoren Nintedanib und Pazopanib gezeigt werden, die allerdings keinen Einzug in die Therapieempfehlung erhalten haben.<sup>67,68</sup>

Die Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie zur präoperativen Zytoreduktion mit anschließender Intervall-Operation ist laut S3- Leitlinien nicht empfohlen.<sup>15</sup> Auch wenn es hierzu Phase III-Studie gibt, in denen bei fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO IIIC und IV) ein vergleichbares Gesamtüberleben bei insgesamt höherer Rate an makroskopischen Komplettresektionen vermuten lassen, ist die Datenbasis hierfür noch nicht ausreichend und kann angesichts unklarer chirurgischer Charakteristika aktuell noch nicht als Standard angesehen werden.<sup>69-71</sup> Die für 2025 erwarteten Ergebnisse der TRUST-Studie sollen Klarheit bezüglich des optimalen Operationszeitpunktes schaffen.<sup>72</sup>

Bisher nicht durchgesetzt hat sich eine lokoregionäre Therapie im Sinne einer intraperitonealen Chemotherapie, welche direkt auf die Peritoneum-befallenden Zellen zielt. Durch peritoneale Resorption der Zytostatika kommt es jedoch auch zu systemischen Wirkungen, sowie Nebenwirkungen.<sup>73,74</sup> Die verschiedenen Studien zur intraperitonealen Therapie liefern jedoch sehr inkonsistente Ergebnisse. Eine aktuelle Studie von Monk et al. zeigte jedoch keinen Überlebensvorteil für diese Applikationsform.<sup>75,76</sup>

Eine weitere Therapieoption ist die Spülung des Abdomens mit einer erwärmten Zytostatikallösung, genannt hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC). Sie kann nach vorangegangener neoadjuvanter Chemotherapie (NACT) bei als nicht operabel eingestuften Tumorerkrankungen angewandt werden. Da es jedoch noch keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich eines therapeutischen Vorteils dieser Methode gibt, müssen für eine Empfehlung noch weitere Studienergebnisse abgewartet werden und die Anwendung ist außerhalb von Studien ausdrücklich nicht empfohlen.<sup>15,77</sup>

Im Verlauf der zytoreduktiven Therapie kann ein Monitoring über das Ansprechen klinisch, sonographisch oder durch Schnittbildgebung durchgeführt werden. Der Tumormarker CA125 eignet sich dabei zur serologische Verlaufskontrolle.<sup>15</sup>

### 1.5.3 Rezidivtherapie

Einen sehr wichtigen Bestandteil der Therapie des Ovarialkarzinoms stellt die Rezidivtherapie dar. Trotz eines guten Ansprechens auf die First-line Therapie rezidivieren 75% der Patientinnen mit einem fortgeschrittenen FIGO Stadium III oder IV innerhalb von 15 Monaten nach Diagnosestellung.<sup>78</sup> Das Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie ist dabei der wichtigste prognosebestimmende Faktor für das Gesamtüberleben.<sup>79,80</sup>

Klassischerweise bestimmt dabei die Zeit zwischen der letzten Platin-Therapie und der Diagnose eines Rezidivs (platinum-free interval, PFI) die Klassifikation in ein partiell platinsensitives (TFI 6-12 Monate), ein platinsensitives (TFI > 12 Monate) oder ein platinresistentes (TFI < 6 Monate) Ovarialkarzinom. Kommt es bereits unter der Firstline Therapie zu einer Progression des Karzinoms wird dieses Ovarialkarzinom als platinrefraktär eingestuft.<sup>80</sup> Während bei einem platinsensiblen Rezidiv nach Möglichkeit immer wieder eine platinhaltige Chemotherapie eingesetzt werden sollte, liegt das Ansprechen auf eine erneute platinhaltige Chemotherapie beim platinresistenten Rezidiv unter 15%.<sup>79,81,82</sup> Aufgrund der Beeinflussung durch andere klinische Faktoren auf die rezidivfreie Zeit, wie beispielsweise das Diagnosestadium, die Tumormorphologie, der Mutationsstatus und das operative Debulking, differenziert man sich jedoch von dieser strikten Kategorisierung zunehmend, so dass für Therapieentscheidungen auch weitere klinische und biologische Faktoren eingebunden werden.

Im Falle eines platinsensitiven Ovarialkarzinom-Rezidivs ist zu klären, ob durch eine zytoreduktive Rezidivchirurgie eine makroskopische Komplettresektion erreicht werden kann. In der prospektiven DESKTOP III Studie konnte gezeigt werden, dass die Operation eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bietet im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie.<sup>78,83</sup> Wichtig für die Therapieentscheidung sind das platinfreie Intervall (entsprechend einer Platinsensitivität), der *BRCA*-Status, die Tumorphologie und eine vorangegangene Bevacizumab-Therapie. Ein weiterer Aspekt ist auch der AGO-Score, er wird bestimmt durch einen Aszites < 500ml, einer makroskopische Komplettresektion und des Gesamtzustandes der Patientin mit einem ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Score von 0. Treffen alle drei Faktoren zu, wird der Score als positiv

gewertet.<sup>78,84,85</sup> Besteht kein sinnvoller operativer Ansatz erfolgt die Reinduktions-Therapie sofort, im Falle der zytoreduktiven Operation anschließend. Mit einer Kombination aus einer platinhaltigen Chemotherapie und Paclitaxel, Gemcitabine oder pegyliertem liposomalen Doxorubicin konnte ein längeres progressionsfreies Überleben erzielt werden, verglichen mit einer Platin-Monotherapie.<sup>1,15,82</sup> Bevacizumab soll bei Patientinnen, welche zuvor keine anti-angiogene Vorthherapie erhalten haben, addiert werden. Durch die zusätzliche Etablierung von Bevacizumab zur kombinierten Chemotherapie und folglich Monotherapie bis zum Progress verbesserte sich das progressionsfreie Überleben deutlich.<sup>86,87</sup> Im Falle eines Ansprechens auf die platinhaltige Chemotherapie wird bei Patientinnen mit high-grade Karzinomen, welche als Vorthherapie anti-angiogen behandelt wurden, eine PARP-Inhibitor-Therapie empfohlen. Damit kann in manchen Fällen neben einem verlängerten progressionsfreien Überleben die Progression über mehrere Jahre kontrolliert werden.<sup>88</sup> Zur Verfügung stehen Olaparib und Niraparib wobei es zur Auswahl keine eindeutige Empfehlung gibt, es sollte hierbei das Nebenwirkungsprofil berücksichtigt werden.<sup>15</sup> Schlussendlich entwickeln fast alle Patientinnen mit rezidivierender Erkrankung eine Resistenz auf die platinhaltige Chemotherapie.<sup>89</sup>

Etwa 25% der Erstrezidive sind platinresistent.<sup>82</sup> Eine operative Therapie ist beim platinresistenten Rezidiv keine Option. Patientinnen mit einem Rezidiv innerhalb von sechs Monaten nach der initialen Therapie zeigen in weniger als zehn Prozent der Fälle ein Ansprechen auf eine erneute platinhaltige Chemotherapie.<sup>90</sup> Das Behandlungsregime des platinresistenten Rezidivs besteht aus einer Monotherapie mit Paclitaxel, pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Gemcitabine, oder Topotecan therapiert, da eine Kombinationschemotherapie kein verbessertes Überleben bei erhöhter Toxizität zeigte.<sup>89</sup> Die Addition von Bevacizumab zu Paclitaxel, Topotecan oder pegyliertem liposomalen Doxorubicin verlängert das progressionfreie Überleben.<sup>15,89,91</sup> Wie beim platinsensitiven Rezidiv wird die Kombination mit Bevacizuab empfohlen, wenn zuvor noch keine VEGF-Inhibitor-Therapie stattgefunden hat.<sup>15,89,91</sup> Die Monotherapie mit PARP-Inhibitoren für Patientinnen, welche an einem rezidierten *BRCA*-mutierten high grade Ovarialkarzinom leiden wird nicht empfohlen. Es wurde zwar in der SOLO-3 Studie ein verlängertes progressionsfreies Überleben gezeigt, jedoch kein Überlebensvorteil.<sup>92</sup>

Eine endokrine Therapie kann bei Patientinnen, die eine Chemotherapie ablehnen oder denen eine Chemotherapie aufgrund der Toxizität nicht zumutbar ist, erwogen

werden. Beim high-grade Karzinomen zeigt die antihormonelle Therapie eine schlechtere Wirksamkeit im Vergleich zu einer Monochemotherapie. Low-grade Karzinome zeigen gegenüber der Firstline platinhaltigen Therapie eine über 70%ige Rezidivrate. Sie sollten in diesen Fällen bei positiven Östrogen-Rezeptorstatus berücksichtigt werden.<sup>93-95</sup>

Obwohl die Strahlentherapie bei der Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms aufgrund der hohen Toxizität bei notwendiger Bestrahlung des gesamten Abdomens keine therapeutische Option darstellt, kann sie in isolierten Fällen oder beim symptomatischen Rezidiv eine lokalisierte Bestrahlung zur Verbesserung der klinischen Symptomatik erwogen werden.<sup>96,97</sup>

Zielgerichtete Therapieoptionen bieten eine neue Form der Behandlungsperspektive. Mit dem MEK-Inhibitor Trametinib gibt es eine mögliche Alternative für das rezidierte low-grade seröse Ovarialkarzinom. Vor der Verabreichung muss mindestens eine platinhaltige Therapie erfolgt sein. Für diese Subgruppe konnte durch Trametinib, unabhängig vom KRAS, BRAF, oder NRAS-Mutationsstatus, das progressionsfreie auf 13 Monate im Vergleich zu 7,2 Monate mit der Standardtherapie verlängert werden.<sup>98</sup> In speziellen Fällen bieten Checkpoint-Inhibitoren eine Therapieüberlegung. Weiterführende Untersuchungen in diesen Bereichen sollten durchgeführt werden.

Festzuhalten ist, dass besonders in der Therapie des platinresistenten Ovarialkarzinoms das Behandlungsziel die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und die Erhaltung der Lebensqualität ist. Die optimale Betreuung beinhaltet ebenfalls eine psychoonkologische Versorgung und rehabilitative Maßnahmen.<sup>15</sup>

#### **1.5.4 Nachsorge**

Die Erkennung der Rezidivkrankung, die Therapie von therapieassoziierten Nebenwirkungen, wie Lymphödeme, Polyneuropathien, funktionelle Darmbeschwerden und Fatigue sowie die Eingliederung in rehabilitative Programme sind Themen der Nachsorge. Weiters erfolgt ein Therapiemonitoring bei Erhaltungstherapien. Das Nachsorgeprogramm sollte bereits während der Primärtherapie angesprochen werden. Die Furcht der Patientinnen vor dem Rezidiv ist

sehr häufig, weshalb auch die psychosoziale Betreuung der Patientinnen und auch der Angehörigen bedeutend ist. Die Erwartung der Patientinnen von der Nachsorge ist die Bestätigung der Rezidivfreiheit beziehungsweise die Früherkennung eines Rezidivs. Die Limitationen der vorhandenen Untersuchungsmöglichkeiten sollen daher mit den Patientinnen besprochen werden.<sup>15</sup>

Teil der Nachsorge ist die Durchführung einer Anamnese und die klinische Untersuchung. Diese beinhaltet neben der körperlichen Untersuchung die gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung, eine digitale rektale Untersuchung sowie die Vaginalsonografie. Eine apparative Diagnostik wird bei symptomfreien Patientinnen nicht empfohlen. Ebenso soll keine routinemäßige Markerbestimmung durchgeführt werden.<sup>15</sup> Eine CA 125-Bestimmung in asymptomatischen Patientinnen führte zwar zum frühzeitigeren Therapiebeginn, es konnte jedoch dadurch kein verlängertes Überleben erzielt werden bei Verschlechterung der Lebensqualität durch die höhere Anzahl der durchgeführten Chemotherapien.<sup>99</sup>

## **1.6 Molekulare Mechanismen der Entstehung von Platinresistenz**

Seit mehr als 30 Jahren werden platinhaltige Therapien in vielen unterschiedlichen Tumorerkrankungen eingesetzt. Ihre zytotoxische Wirkung besteht in der Induktion von kovalenten DNA-Vernetzungen, welche zu einer Deformierung führen und somit eine weitere Replikation verhindern und nachfolgend eine Apoptose induzieren. Die Entstehung einer zunehmenden Platinresistenz im Verlauf der Behandlung ist dabei allerdings charakteristisch.<sup>90,100</sup> Die Ursache der Resistenzbildung beim Ovarialkarzinom-Rezidiv ist eine Mischung aus heterogenen primären und erworbenen Mechanismen in den verschiedenen molekularen Signalwegen. Mögliche Entstehungsprozesse sind eine reduzierte Aufnahme, beziehungsweise erhöhter Efflux der Platinmoleküle, eine Inaktivierung durch Glutathion oder andere Anti-Oxidantien sowie eine Erhöhung der DNA Reparatur und Toleranzentwicklung.<sup>100</sup> Vermutlich resultiert eine Kombination dieser Mechanismen in der Entstehung einer klinisch merklichen Platinresistenz.<sup>100</sup>

Ein weiterer Angriffspunkt einer Platinresistenzbildung ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg, welcher ein essenzieller Bestandteil eines funktionierenden Organismus ist, eine Dysregulation jedoch weitreichende Folgen nach sich ziehen kann.<sup>101-104</sup> Eine

fehlerhafte Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch aberrante Komponenten scheint dabei mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Ovarialkarzinom-Patientinnen assoziiert zu sein.<sup>105</sup> Dabei sind besonders Ovarialkarzinome vom endometroiden Typ von einer Mutation im kanonischen Wnt-Signalweg betroffen, die jedoch insgesamt nur einen kleinen Teil der epithelialen Ovarialkarzinome darstellen.<sup>106,107</sup>

Eine aktivierende Mutation im Gen *CTNNB1*, welches das  $\beta$ -Catenin codiert, scheint für eine Dysregulation, einer geförderten Tumorprogression und damit für ein schlechteres Gesamtüberleben verantwortlich zu sein.<sup>102,105-108</sup> Mutationen des *CTNNB1* führen zu einer erhöhten Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus zu führen und können somit die Transkription von den Zielgenen fördern.<sup>107</sup>

Eine in vielen Ovarialkarzinomen vorkommende Abberation ist die *PIK3CA*-Mutation, welche zu einer Inaktivierung der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  führen kann, wodurch der Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindert wird.<sup>109</sup>

Bei Patientinnen mit einem high grade serösen Ovarialkarzinom konnten in 88% eine Amplifikation von Aktivatoren oder Deletion von Suppressoren der Komponenten des Wnt-Signalwegs gefunden werden, wobei jedoch insgesamt selten Genmutationen des Signalwegs detektiert werden.<sup>109</sup>

Eine Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch einen Knockdown von  $\beta$ -Catenin führte in Studien zu einer Re-Induktion einer Sensibilität auf Platin in vormals platinresistenten Ovarialkarzinomzellen *in vitro*.<sup>105,109-111</sup> Dies könnte somit einen vielversprechenden neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung von Patientinnen mit einem platinresistenten Ovarialkarzinom-Rezidiv darstellen.

## 1.7 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist aufgrund seiner essenziellen Rolle in diversen molekularen Prozessen, wie der Embryonalentwicklung, der Zelldifferenzierung, der Proliferation und Migration, bereits viel untersucht. Er ist strikt reguliert durch stimulierende und inhibierende Faktoren. Bei einem Verlust oder einer Veränderung dieser Mechanismen durch Mutationen kann eine abnorme Aktivierung hin zu onkogenen Prozessen und Tumorgenese führen. Ein hyperaktiver Wnt-Signalweg scheint auch beim Ovarialkarzinom eine verstärkte Metastasierung und Resistenzbildung zu induzieren.<sup>109</sup>



Eingeteilt wird der Wnt-Signalweg in den kanonischen ( $\beta$ -Catenin-abhängigen) und nicht-kanonischen ( $\beta$ -Catenin-unabhängige) Signalweg, wobei der nicht-kanonische in zwei Untergruppen unterteilt wird. In allen Signalwegen bindet ein Wnt-Ligand an einen der Frizzled (FZD) Rezeptoren und bedingt damit eine Rekrutierung von Dishevelled (Dsh) an die Zellmembran. Durch Bindung des Wnt-Liganden an die bekannten zehn FZD-Rezeptoren und fünf Korezeptoren (LRP5/6, ROR1/2, RyK) entscheidet sich, welcher der Wnt-Signalwege nachfolgend eingeschlagen wird.<sup>109</sup>

### 1.7.1 Kanonischer Wnt-Signalweg

In Abwesenheit von Wnt-Liganden oder bei Blockierung der Transmembranrezeptoren hyperphosphoryliert der zytosmatische Destruktions-Komplex, bestehend aus den Serin/Threonin Kinasen Glykogensynthese-Kinase-3-  $\beta$  (GSK-3- $\beta$ ), Casein Kinase 1 (CK1) sowie den Tumorsuppressor-Proteinen Adenomatous-polyposis-coli (APC), Axin und dem Proto-Onkoprotein  $\beta$ -Catenin. Die Phosphorylierung durch CK1 und GSK-3- $\beta$  induziert eine anschließende Ubiquitinylierung durch  $\beta$ -TRCP, einer E3 Ligase, und markiert  $\beta$ -Catenin für den proteolytischen Abbau in den Proteosomen. Darüber hinaus phosphoryliert GSK-3- $\beta$  auch Axin, welches dadurch stabilisiert wird und die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin fördert.<sup>107,112</sup> Niedrige  $\beta$ -Catenin Plasmaspiegel führen zu einer Rekrutierung von Transkriptionsrepressoren, welche die Transkription supprimieren und so als Antagonisten des Wnt-Signalwegs agieren.<sup>112</sup>

Eine Aktivierung durch Wnt-Liganden induziert eine Dimerisierung des Transmembranrezeptoren Frizzled (FZD) mit dem Ko-Rezeptor low-density lipoprotein receptor related protein 5 und 6 (LRP). Diese Konformationsänderung führt zu einer Interaktion von Dishevelled (Dsh) mit der zytosmatischen Domäne von FZD, wodurch Dsh phosphoryliert wird und an die Membran rekrutiert. Dort fördert das phosphorylierte Dsh die Bindung des Destruktions-Komplexes an die Zellmembran. Die Phosphorylierung der zytosmatischen Domäne von LRP 5/6 durch Kinasen wie unter anderem GSK-3- $\beta$  und CDK14 verstärken diese Bindung zusätzlich. Diese Interaktionen führen zu einer Inaktivierung des Destruktions-Komplexes und inhibieren die Phosphorylierung sowie die subsequeute Ubiquitinylierung von  $\beta$ -Catenin. Das „freie“  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytosol und transloziert in den Nukleus. Dort aktiviert es assoziierte Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Mitglieder der T-cell factor (TCF)/Lymphoid enhanced factor (LEF) Familie und Histonmodifizierer wie das *CREB-*

Bindeprotein, welche den Transkriptionsrepressor Groucho verdrängen und so die Wnt-Zielgene aktivieren.<sup>107,112</sup> Das  $\beta$ -Catenin fördert dabei die Transkription von wichtigen Genen für die Proliferation und dem damit verbundenem Überleben, wie *c-Myc (MYC)*, *Zyklin D1 (CCMD1)*, *Survivin (BIRC5)*, *Axin2 (AXIN2)* und der *Matrix Metalloproteinasen (MMPs)*. Von den über 100 bereits identifizierten Zielgenen des Wnt-Signalwegs konnten in 23 eine Überexpression im Ovarialkarzinom gefunden werden.<sup>112</sup> Eine gesteigerte Aktivität des Wnt-Signalwegs resultiert entsprechend in einer erhöhten Tumorgenese in einer Vielzahl von Organen.<sup>113</sup>

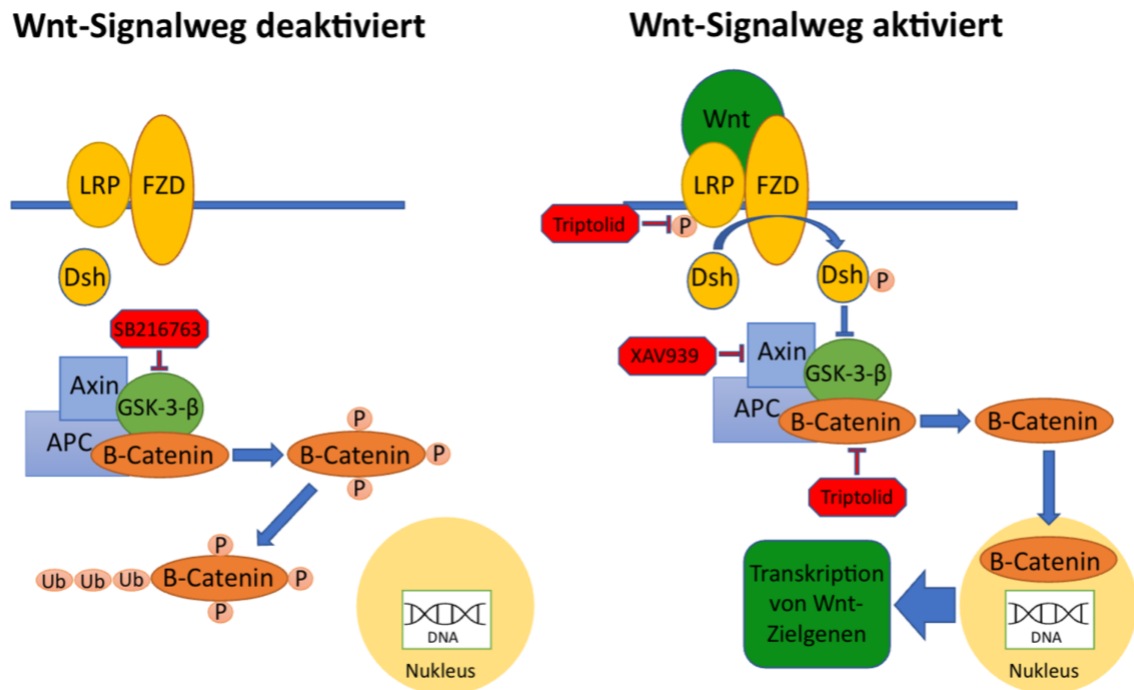
### 1.7.2 Nicht-kanonischer Wnt-Signalweg

Die nicht-kanonische Wnt-Signalwege sind  $\beta$ -Catenin-unabhängig und können in den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg und planaren Zellpolaritäts-Signalweg unterteilt werden. Im Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg bindet der Komplex aus Wnt, FZD und Dsh mit dem G-Protein Ror 172 und führt zu einer Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), Proteinkinase C (PKC) und der Phosphatase Calcineurin. Diese aktivieren Transkriptionsfaktoren wie *NF $\kappa$ B* und *CREB*.<sup>109</sup> Es entsteht ein erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, wodurch eine erhöhte Expression von Zielgenen in Neuronen, Herz- und Muskelzellen und pro-inflammatorischen Genen in Lymphozyten stimuliert werden.<sup>114</sup> Der zweite  $\beta$ -Catenin unabhängige Wnt-Signalweg reguliert über die GTP-asen RhoA und Rac die Zellpolarität und damit verbunden die asymmetrische Organisation und den Aufbau des Zytoskeletts, die Zellbewegung und gerichtetes Zellwachstum.<sup>112,114</sup> Defekte im planaren Zellpolaritäts-Signalweg sind mit Zellenwicklungserkrankungen wie der polyzystischen Nierenerkrankung, Neuralrohrdefekten, Herzdefekten, Taubheit und dem Kartagener Syndrom (situs inversus) verbunden.<sup>109,114</sup>

## 1.8 Wnt-Inhibitoren

Basierend vorangegangenen Informationen scheint der Wnt-Signalweg für einen Teil der diagnostizierten Ovarialkarzinome im Rahmen der Entstehung und dem Therapieansprechen eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>115</sup> Für die Evaluation einer potenziellen Beeinflussung des Wnt-Signalwegs wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Moleküle ausgewählt, welche an unterschiedliche Stellen des Wnt-Signalweges

eingreifen, und somit spezifische Effekte ausüben und dadurch Rückschlüsse auf die Funktion des gesamten Wnt-Signalweg erlauben.



**Abbildung 1: Darstellung des Wnt-Signalweges in aktiver und deaktivierter Form und der Wnt-Inhibitoren.**

### 1.8.1 XAV 939

Das kleine XAV939 Molekül ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor und inhibiert die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Enzyme Tankyrase 1 und 2. Diese Isoformen der Tankyrase destabilisieren Axin, einen Teil des Destruktions-Komplexes. Durch eine Inhibierung durch XAV939 kann eine Stabilisierung von Axin und somit Stimulation der Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin bewirkt werden. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung des Wnt-Signalweges.<sup>116</sup>

In zwei Studien an Ovarialkarzinom- beziehungsweise Colonkarzinom-Zellen konnte nach einer Inkubation der Zellen mit XAV939 bereits eine Überwindung der Resistenz auf die Chemotherapie gezeigt werden.<sup>117,118</sup>

### 1.8.2 SB216763

SB216763 ist ein Inhibitor der Glykogensynthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK-3- $\beta$ ). GSK-3- $\beta$  ist eine, in allen Eukaryonten vorkommende, multifunktionale Serin/Threonin-Kinase.<sup>119</sup> Durch die Inhibierung von GSK-3- $\beta$  kommt es im Zytosol zu einer Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin und somit, im Gegensatz zum XAV939, zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges. Eine Inaktivierung von GSK-3- $\beta$  zeigte jedoch auch eine Inhibierung der Zellproliferation und Immortalisierung von Tumorzellen.<sup>120-122</sup>

Dies könnte unter anderem an der Rolle von GSK-3- $\beta$  in der *NF $\kappa$ B* induzierten Transkription liegen, sowie an der Resistenz von Tumorzellen auf die Tumornekrosefaktor (TNF) -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induzierte Apoptose. Darüber hinaus könnte GSK-3- $\beta$  eine Rolle in der Abberation im *p53*-moduliertem Tumorsuppressor-Signalweg, in der Rb-modulierten Zellzyklusregulierung und in der Erhaltung der Telomerlänge in immortalen Tumorzellen spielen. *C-Myc* und *Zyklin D1* modulierte Zellproliferationswege sind ebenfalls GSK-3- $\beta$  abhängig.

Durch diese Quervernetzungen scheint GSK-3- $\beta$  eine Mediation vieler verschiedener Signalwege zu übernehmen und könnte daher ein Schlüsselenzym für die Beeinflussung von Tumorinvasion und Therapieresistenz sein.<sup>122</sup>

### 1.8.3 Triptolid

Die dritte verwendete Substanz dieser Studie ist das Triptolid, welche aus dem Extrakt der Pflanze „*Tripterygium wilfordii*“ isoliert werden kann.<sup>123</sup> In der traditionellen chinesischen Medizin wird das Triptolid seit über zwei Jahrhunderten zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematoses und der Psoriasis angewendet.<sup>124</sup> Neben den immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften greift das Triptolid, auch in multiple andere Signalwege ein.

Das Triptolid unterdrückt die Aktivierung des Wnt-Signalweges, indem es die Phosphorylierung von LRP verhindert und somit die Aktivierung von FZD und DSH inhibiert. Zusätzlich verhindert das Triptolid Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus indem es die Glykosylierung von  $\beta$ -Catenin inhibiert.<sup>125</sup>

Beim *NFκB*, *HSP70*, *c-Myc*, *Zyklin D1* und *p53*-Signalweg führt es zu einer Verringerung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und ruft eine Induktion der Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen herbei.<sup>110,126-129</sup> Auch eine Down Regulation der *Matrix Metalloproteinasen (MMPs)* 7 und 19 sowie eine Erhöhung der E-Catherin-Expression konnte beobachtet werden.<sup>127</sup>

Durch seine proliferationshemmenden Eigenschaften in verschiedenen soliden Tumoren wie beispielsweise dem Colon-, Mamma-, Nierenzell-, Lungen-, Magen-, Pankreas-, Zervix- und Ovarialkarzinom, als auch dem Osteosarkom zeigte das Triptolid ein erhebliches Potential als mögliches Therapeutikum.<sup>110,127-130</sup>

## **2 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine neue therapeutische Perspektive zur Behandlung des platinresistenten Ovarialkarzinom-Rezidivs zu erarbeiten.

Mit der Diagnose eines rezidierten Ovarialkarzinoms wechselt der initial kurative Therapieansatz auf eine palliative Erkrankung. Auch wenn Patientinnen mit einer platin sensiblen Erkrankung initial in der Regel gut auf eine erneute platinhaltige Chemotherapie ansprechen, entwickeln sie im Verlauf alle eine zunehmende Platinresistenz. Hierbei stehen dann palliative Gesichtspunkte bei limitierten Behandlungsoptionen im Vordergrund, das mediane Gesamtüberleben liegt bei unter 12 Monaten nach Diagnose des Rezidivs. Neue therapeutische Strategien zur Überwindung der Platinresistenz sind daher dringend erforderlich.

Als neue Perspektive wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die Option der Re-Sensibilisierung von platinresistenten Ovarialkarzinomzellen auf eine platinhaltige Therapie durch die Inhibierung des Wnt-Signalweges untersucht. Dies könnte eine wichtige Erweiterung der therapeutischen Optionen für Ovarialkarzinom-Patientinnen mit platinresistenter Erkrankung darstellen und hat somit eine hohe klinische Relevanz. Langfristig soll diese Studie einen Beitrag zur Erweiterung des Verständnisses des Wnt-Signalweges als Auslöser der Platinresistenz beim Ovarialkarzinom leisten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Modellzelllinien

In dieser Arbeit wurden die Ovarialkarzinom-Zellen A2780 und A2780cis verwendet. Die Zelllinie A2780 wurde aus einer Patientin mit unbehandeltem epithelialen Adenokarzinom des Ovars etabliert, welche vor der Entnahme keine Therapie erhalten hatte. Sie ist eine häufig und seit langem verwendete Linie und als Zellkulturmodell exzellent geeignet.<sup>131</sup> A2780cis Zellen wurden aus platinsensitiven A2780 Zellen durch chronische Exposition einer zunehmenden Konzentration an Cisplatin generiert. Um die Platinresistenz zu bewahren, wurde bei jedem Medium-Wechsel Cisplatin zugefügt. In Kultur bildeten die Zelllinien einen einschichtigen adhärenen Zellrasen, die A2780cis-Zellen zeigen eine spindelförmige Struktur.

#### 3.2 Reagenzien und Materialien

Im weiteren Verlauf sind die für diese Arbeit verwendeten Reagenzien und Materialien tabellarisch dargestellt:

<b>Zelllinie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
A2780	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) über Sigma-Aldrich, Missouri, USA
A2780cis	ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) über Sigma-Aldrich, Missouri, USA

**Tabelle 4: Zelllinien**

<b>Inhibitoren und Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-Inhibitor SB-216763	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tankyrase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

XAV939	
Wnt-Inhibitor Triptolid	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Monoklonaler Antikörper Anti-M30	Alexis, Kalifornien, USA
Polyklonaler Antikörper Anti-β-Catenin	Diagnostic BioSystems, Kalifornien, USA
Polyklonaler Antikörper Anti-GSK-3-β	Abcam, Cambridge, England

**Tabelle 5: Inhibitoren und Antikörper**

<b>Cisplatin und Zytostatikaschutz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Cisplatin	Apotheke Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Armstulpen	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland
Handschuhe	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland
Schutzkittel	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland
Arbeitsunterlagen für Zytostatika und biol. Arbeitsstoffe	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland

**Tabelle 6: Cisplatin und Zytostatikaschutz**

<b>Geräte und Hilfsmittel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
12-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Abzug Zellkultur Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elx800 universal Microplate Reader	BioTek; Vermont, USA
Feuchte Kammer	Labor Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Gefrierschrank, -20°C, (Bosch Cooler)	Robert Bosch GmbH; Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank, -80°C, (Hera Freeze)	Thermo Electron Corporation; Massachusetts, USA



Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Inkubator Zytostatika	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Kamera-Mikroskop	LEICA MC120 HD, Leica; Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank, 4°C	Liebherr; Biberach, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer 0,0025m <sup>2</sup>	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference®, 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipet boy)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (pipetus®)	Hirschmann; Eberstadt, Deutschland
Plattenschüttler	IKA-Labortechnik; Staufen im Breisgau, Deutschland
Sterilwerkbank	Hera Safe, Thermo Fischer
Stickstofftank	Arpege, Cryopal; Bussy-Saint-George, Frankreich
Tischzentrifuge	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie	VWR; Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL; Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Hettich; Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 7: Geräte und Hilfsmittel**

<b>Plastik- und Glaswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Deckglas	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Flacon-Röhrchen, steril, 10ml, 15ml, 50ml	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich
Glasgefäß, 100ml	Labor Klinikum Großhadern, München, Deutschland

Glasküvette	Labor Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Kulturschale, 4-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kryoröhrchen 1,0ml, 1,8ml, 3,6ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Markierstift	Labor Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zellkulturflasche BD Falcon™ T75 (= 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche)	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten, 6-Well, 24-Well, 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 8: Plastik- und Glaswaren**

<b>Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
dH <sub>2</sub> O	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Brij	Sigma Life Science; Missouri, USA
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Eindeckmittel <i>Vision Mount™</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol (100%, 96%, 70%)	Apotheke Klinikum Großhadern, München, Deutschland
FBS	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

HCl	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % in Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leitungswasser	Labor Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Methanol	Apotheke Klinikum Großhadern, München, Deutschland
PBS	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
RPMI (1640 Medium)	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
TBS	Sigma Life Science; Missouri, USA
TRIS	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom AG; Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma Life Science; Missouri, USA
Tween20	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 9: Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterial**

<b>Detektionssysteme und Färbesubstrate</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AEC	DAKO, Hamburg, Deutschland
DAB	DAKO, Hamburg, Deutschland
Detektionssystem Cell Death Detection ELISA	Roche, Basel, Schweiz
Detektionssystem Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Basel, Schweiz
Detektionssystem MTT-Lösung	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Detektionssystem Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit	Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA

Detektionssystem ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
---	---

**Tabelle 10: Detektionssystem und, Färbesubstrate**

### **3.3 Zellkultur**

Die Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und deren platinresistente Zellklone A2780cis wurden mit drei Modulatoren, welche an unterschiedlichen Stellen in den Wnt-Signalweg eingreifen, behandelt. In einer Reihe unterschiedlicher Zellfärbungen und funktionaler Analysen wurde überprüft, welche therapeutischen Effekte auf Ovarialkarzinomzellen hierdurch bewirkt werden. Aufgrund des biologischen Modells mit den unterschiedlichen Zellklonen konnte dabei evaluiert werden, ob durch die Modulation eine Beeinflussung von Proliferation und Vitalität in Abhängigkeit der Platinresistenz ausgelöst werden kann und ob durch Beeinflussung des Wnt-Signalweges die Re-Sensibilisierung für eine Platinhaltige Chemotherapie möglich ist.

#### **3.3.1 Arbeit an Zellkulturen**

Die A2780 und A2780cis Zelllinien wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit 13 ml Zellkulturmedium angezüchtet und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung im Brutschrank kultiviert. Das Nährmedium setzte sich aus RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) mit GlutaMAX, und zusätzlich 10% FBS (Fetales Kälberserum) als Wachstumsfaktoren- und Proteinquelle, zusammen.

Zu Beginn der Arbeit wurden die Zellen, welche im Stickstofftank gelagert wurden, aufgetaut und ausgesät. Damit die Lagerung in zytotoxischem DMSO (Dimethylsulfoxid), in dem sich die Zellen während des Einfrierens befanden, keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurden die Zellen erst nach zwei Passagen für die weiteren Versuche verwendet.

Um die Platinresistenz zu erhalten, wurde den A2780cis-Zellen bei jedem Mediumwechsel 1 µM Cisplatin zugefügt. Bei der Arbeit mit dem Platin-Derivat wurde stets auf die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen geachtet. Es wurde mit speziellen sterilen Zytostatika-geeigneten Handschuhen gearbeitet und Armstulpen sowie eine Schutzschürze verwendet. Alle Materialien, die mit dem Cisplatin in

Berührung gekommen sind, wurden in einem gekennzeichneten Zytostatika-Müll entsorgt und die Arbeitsfläche in der sterilen Arbeitsbank gesäubert.

Es kamen im Rahmen der Kultivierung keine Antibiotika oder Antimykotika zum Einsatz, um mögliche zytotoxische Eigenschaften der Antibiotika auszuschließen und somit keine Limitierung der Ergebnisse zu erwarten ist. Um eine Kontamination der Zellen zu verhindern, wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

### **3.3.2 Kultivierung**

Die einzelnen Schritte dieser Vorbereitung der Zellen auf die Experimente werden nun kurz erläutert. Für die A2780cis-Zelllinie wurde bei jedem dieser Schritte ein mit Cisplatin angereichertes Medium verwendet.

#### Zellaussaat:

Zuerst erfolgte das langsame Auftauen der Zelllinien A2780 und A2780cis aus dem Stickstofftank in ca. 37 °C warmem Wasserbad. Anschließend erfolgte die Reinigung des Kryoröhrchens mit 70%igem Ethanol gefolgt von zügigem Pipettieren der Zellen in ein mit 9ml Medium gefülltes vorbereitetes Röhrchen unter der sterilen Werkbank. Danach wurden die Röhrchen 10 Minuten bei 1000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert und folglich der liquide Überstand abgekippt. Nun geschah das Auffüllen des Zellpellets mit 3 ml Nährmedium, gutes Vermischen und Überführen in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche. Abschließend wurde der Inhalt der Kulturflasche mit dem Medium auf 13 ml ergänzt und im Brutschrank kultiviert.

#### Mediumwechsel:

Es wurde ca. jeden zweiten Tag ein Wechsel des Mediums vorgenommen. Dafür erfolgte ein Abziehen und Verwurf des Mediums aus der Kulturflasche und eine Spülung der Zellen mit 10 ml PBS. Anschließend wurden 13 ml frisches Medium zugefügt.

#### Aufteilen der Zellen:

Begonnen wurde die Aufteilung mit dem Abziehen und Verwerfen des Mediums aus der Kulturflasche sowie dem Waschen der Zellen mit 10 ml PBS. Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin und ca. 10-minütige Inkubation im Brutschrank, bis sich die

Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen. Danach wurde die Kulturflasche zur Vorbereitung auf die Bestimmung der Zellzahl mit 10ml Medium aufgefüllt. Die Auszählung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer erfolgte folgendermaßen:

- Pipettieren von 25 µl aus der Kulturflasche in ein Well einer 96-Well-Platte und Zugabe von 25 µl Trypanblau
- Vermischen der beiden Substanzen und Befüllen der Zählkammer
- Unter dem Mikroskop Auszählen der vitalen Zellen (ungefärbt, da der Farbstoff nicht durch die Membran kommt) der 4 Groß-Quadranten des Hämozytometers
- Auswertung nach der Formel:

**Zellzahl/ml = Gesamt-Zellzahl der 4 Quadrate/4 (4 Quadrate) x 2**

*(Verdünnung mit Trypanblau) x 10 (Verdünnungsfaktor bei 10ml Zellsuspension) x 10<sup>4</sup>*

*(Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Höhe der Zählkammer)*

Zuletzt wurden neue Kulturflaschen mit 13 ml Medium und den im beschriebenen Prozess gewonnenen Zellen entsprechend der vorgegebenen optimalen Zellzahl von 3–6x10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> für A2780 und 2-4x10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> für A2780cis angesetzt.

### 3.3.3 Konzentrationsfindung der Wnt-Inhibitoren

Um eine Aussage über die passende Konzentration der Wnt-Inhibitoren für die in der Arbeit verwendeten Zelllinien treffen zu können wurde folgendes Experiment durchgeführt:

In je drei 6-Well-Platten für A2780 und A2780cis wurden je 100.000 Zellen/Well ausgesät. Die Substanzzugabe wurde nach 24 Stunden Inkubation durchgeführt. Es wurden 25 µM und 50 µM von SB216763, 0,5 µM und 1 µM von XAV939 und 50 nM und 100 nM von dem Triptolid getestet.<sup>110,116,120</sup> Die Substanzzugabe wurde nach 24 Stunden Inkubation durchgeführt. Die entsprechenden Konzentrationen der Inhibitoren wurde durch Verdünnungsreihen hergestellt und in die Wells pipettiert.

Nach weiteren 24/48/72 Stunden wurde je ein Well der Kontrollen und der beiden fraglichen Konzentrationen trypsinisiert und an der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für SB216763 wurden 100µM ausgewählt, da sich bei den getesteten Konzentrationen eine zu geringe Wirkung einstellte. Bei XAV939 kam es zu keiner Wachstumsminde- rung, weshalb der Versuch für 12,5µM, 25µM und 50µM wiederholt

wurde. Erst bei 50µM zeigte sich die Wirkung von XAV939. Das Triptolid bewirkten bereits bei 50nM eine sehr deutliche Wachstumsverminderung der Zellen.

Da die Substanzen wie vom Hersteller empfohlen in DMSO gelöst wurden sind bei allen weiteren Experimenten Kontrollen mit der höchstmöglichen DMSO-Konzentration, welcher die Zellen nach Zugabe der Substanzen ausgesetzt waren, durchgeführt worden. Die höchste DMSO-Konzentration bei 100µM SB216763 lag bei 0,2%, bei 50 µM XAV939 bei 0,5%.

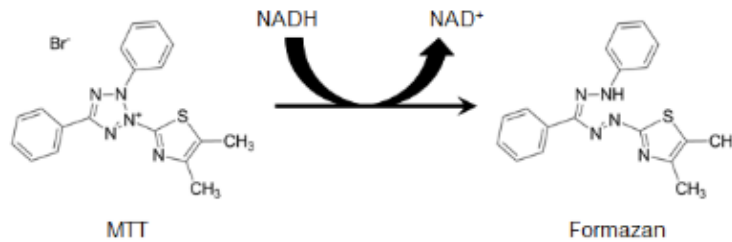
Nachfolgend eine Darstellung der verwendeten Konzentrationen der Wnt-Inhibitoren und der DMSO-Konzentration in den Kontrollen:

WnT-Inhibitor	Konzentration	DMSO in Kontrolle
SB216763	100µM	0,2%
XAV939	50µM	0,5%
Triptolid	50nM	0%

**Tabelle 11: Konzentrationen der Wnt-Inhibitoren und DMSO-Konzentrationen in den Kontrollen**

### 3.3.4 Zellviabilitäts-Test (MTT)

Die Bestimmung der Zellviabilität wurde mittels der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Reagenz durchgeführt, dadurch können über die metabolische Aktivität der Zellen Rückschlüsse auf deren Viabilität gezogen werden.<sup>132</sup> Durch eine NADH-abhängige Reduktion des löslichen MTT-Farbstoffes kommt es in den stoffwechselaktiven Zellen zur Bildung von nicht-löslichem violetten Formazan-Kristallen.<sup>133</sup> Mit dem Plattenlesegerät kann die Quantität des Formazans bestimmt werden, welche direkt proportional mit der Anzahl an viablen Zellen korreliert. Der MTT-Test ist besonders gut für adhärente Zellen geeignet<sup>4</sup>.



**Abbildung 2: Farbreaktion MTT<sup>133</sup>**

### 3.3.4.1 Versuchsdurchführung

#### Tag 1

Es wurden die beiden Zelllinien A2780 und A2780cis wie oben beschrieben durch Auszählen auf 15.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingestellt und in eine 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert (5.15000 Zellen/Well). Danach wurden die Zellen 24 h im Brutschrank kultiviert, um eine Adhäsion der Zellen an den Boden der Platte zu erhalten.

#### Tag 2

In folgenden Konzentrationen wurden die Substanzen und Kontrollen zugefügt:

WnT-Inhibitor	Konzentrationen	DMSO in Kontrolle
SB216763	12,5 µM, 25 µM, 50 µM und 100µM	0,2%
XAV939	6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM und 50µM	0,5%
Triptolid	6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50nM	0%

**Tabelle 12: Konzentrationen der Substanzen und deren Kontrollen**

Jede Kontrolle und Konzentration wurde in einer Triplet-Bestimmung durchgeführt. Um die Hydratation der Zellen zu gewährleisten, wurde um die Zellen herum eine Feuchtreihe ohne Zellen aus 200µl PBS in die Wells pipettiert.

Zu den 100 µl Zellsuspension in der 96-Well-Flachbodenplatte wurden jeweils 100µl der vorbereiteten Konzentrationen der Substanzen bzw. DMSO pipettiert. Lediglich bei der Kontrolle ohne DMSO wurde nur Medium zugefügt. Das Gesamtvolumen im Well betrug nun 200µl. Die Platten wurden im Inkubator 48 h sowie 72 h inkubiert.



## Tag 4 und 5

Der MTT-Farbstoff wurde für den Versuch zu 5mg/ml in PBS angesetzt und aliquotiert eingefroren. Am Tag der Messung wurde jeweils eine ausreichende Menge aufgetaut und á 20µl mit Hilfe einer Multikanalpipette zu den Zellen pipettiert. Zur Vermengung des Farbstoffes mit den Zellen wurden die 96-Well-Flachbodenplatten zuerst 5 Minuten auf den Plattenschüttler gestellt und noch 90 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Danach wurde der Überstand auf Zellpapier abgekippt und ausgeklopft. Der in die Zellen eingedrungene MTT-Farbstoff stellte sich blauviolett dar. Lichtgeschützt wurden mit einer Multipipette 200µl DMSO je Well zugefügt und die Platte erneut 5 Minuten auf den Plattenschüttler gegeben. Das bei der Reduktion des MTT gebildete Formazan - bzw. dessen Absorption - wurde nun am Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Bei diesem Schritt war ein zügiges Arbeiten sehr wichtig, da die Sensitivität bei zu langer Dauer zwischen Zugabe des DMSO und Messung abnimmt<sup>133</sup>.

### **3.3.5 Zellproliferations-Test (BrdU)**

Zur Detektion der Proliferation wurde der als Goldstandard angesehene<sup>134,135</sup> 5-bromo-2'-deoxyuridin(BrdU)-ELISA verwendet. In der S-Phase des Zellzyklus kommt es zu einem Einbau des Pyrimidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) anstatt der endogenen Nukleoside Desoxyuridin beziehungsweise Thymidin, wodurch die replizierte DNA markiert wird. Nach dem Fixieren und Denaturieren der DNA wurde ein mit Peroxidase (POD) konjugierter monoklonaler Anti-BrdU-Antikörper zugegeben. Die entstandenen Immunkomplexe wurden durch die Zugaben von Tetramethylbenzidin (TMB) mit dem ELISA-Reader detektiert. Die Absorptions-Werte korrelierten direkt mit der neu synthetisierten DNA. Die ruhenden Zellen wurden dabei nicht erfasst. Basierend auf den BrdU-Einbau konnte somit die Zellproliferation mit hoher Sensitivität quantifiziert werden<sup>136,137</sup>.

### 3.3.5.1 Versuchsdurchführung

Für den Versuch wurden Zellen in 96-Well-Flachbodenplatten mit einer Zellzahl von 15.000/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach Zugabe der Wnt-Inhibitoren an Tag 2 wurden die 96-Well-Flachbodenplatten 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Durchführung wurde gemäß Herstellerprotokoll (Roche) durchgeführt, welche unten kurz beschrieben ist.

Zuerst wurden die lyophilisiert gelieferten Lösungen vor dem ersten Gebrauch gelöst. Dann wurde das BrdU Labeling Reagent im Verhältnis 1:100 zu den Zellen pipettiert. Die Endkonzentration an BrdU im Well betrug 10µM.

Während einer zweistündigen Inkubationszeit kam es zum Einbau des BrdU in die DNA der proliferierenden Zellen. Der Überstand wurde danach auf Zellstoff abgekippt und die Flachbodenplatte ausgeklopft.

Als nächster Schritt wurden 200µl/Well FixDenat (eine Lösung zum Denaturieren der DNA) zu den adhären Zellen pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkippen und Ausklopfen der FixDenat-Lösung wurden je Well 100µl der vorbereiteten BrdU-POD-Gebrauchslösung (Peroxidase-gekoppelter monoklonaler BrdU-Antikörper aus Maus-Maushybridzellen + Antikörper-Verdünnungslösung im Verhältnis 1:100) zugefügt.

Es folgte eine Inkubation von 90 Minuten bei Raumtemperatur, in welcher sich der Anti-BrdU-POD-Antikörper mit dem in der neu synthetisierten DNA eingebauten BrdU komplexierte. Die BrdU-POD-Gebrauchslösung wurde nach der Inkubation ausgekippt und die Flachbodenplatten mit einer Waschlösung dreimal mit 200 µl pro Well gewaschen. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde die Platte gut ausgeklopft.

Nun wurden 100µl/Well TMB Substrat Lösung zu den Immunkomplexen pipettiert. Während der folgenden ca. 15-minütigen Inkubation kam es durch eine POD-induzierte Oxidation des TMB zur Farbreaktion nach blau. Durch Zufügen von 25µl/Well 1 molarer Schwefelsäure wurde diese Reaktion abgestoppt und es kam zum Farbumschlag nach gelb. Nach einminütiger Inkubation am Plattenschüttler wurde die Absorption am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

### **3.3.6 Wound-Healing Assay (Scratch Assay)**

Um Zellmigration im zweidimensionalen System zu analysieren ist der Wound-Healing Assay aufgrund der einfachen Methodik und kostengünstigen Materialien eine Standardmethode<sup>138</sup>.

Das Grundprinzip dieses Versuchs stellt eine mit einer Pipettenspitze kreierte „Wunde“ inmitten des Zellrasens dar.<sup>139</sup> Im Verlauf des Versuches wurden die Zellen am Rand dieser „Wunde“ nach 0h, 24h, 48h und 72h beobachtet und fotografisch festgehalten. Ein Hauptvorteil ist die Imitation der Zellmigration in vivo, welche durch diesen Assay zu einem gewissen Grad interpretiert werden kann.<sup>139</sup> Unter Migration der Zellen versteht man eine aktive Bewegung von einzelnen Zellen oder Zellverbänden.<sup>140</sup>

#### **3.3.6.1 Versuchsdurchführung**

Da bei diesem Experiment der Boden einer 24-Well-Platte nach 24 Stunden Inkubation mit einem Monolayer voll bedeckt sein muss, wurden im Rahmen der Vorbereitung unterschiedliche Zellzahlen/Well ausgetestet. Bei den A2780 zeigten sich 500.000 Zellen/Well und bei A2780cis 800.000 Zellen/Well als suffizient.

Vor der Zugabe der Zellen in die 24-Well-Platten wurden an der Unterseite außen an der Platte zwei horizontale Linien je Well mit einem feinen Markierstift angezeichnet. Diese Vorbereitung diente als Markierung und erleichterte das Auffinden und Fotografieren der Referenzpunkte.

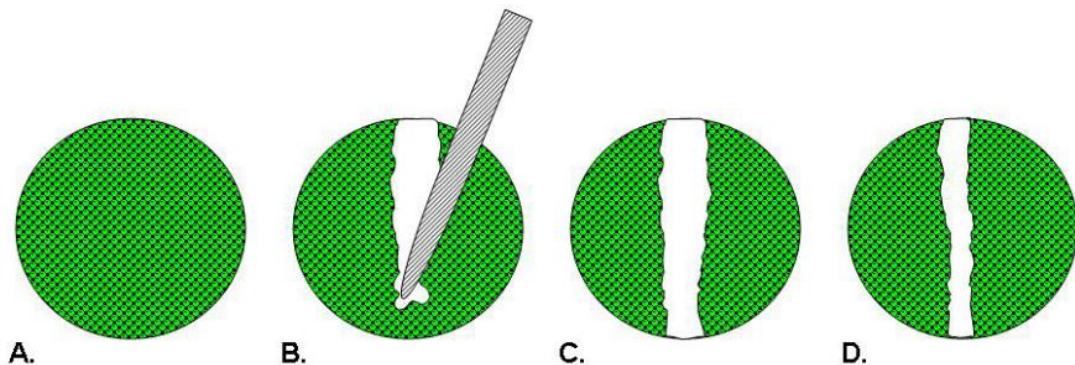
Es wurde je eine Platte für die A2780 und A2780cis Zelllinien in oben genannter Zellzahl angefertigt. Dafür wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ausgezählt und eine Zellsuspension von 500.000 Zellen/ml Medium für A2780 und 800.000 Zellen/ml Medium hergestellt. In jedes Well wurden je 1ml dieser Suspension und 1ml Medium pipettiert und gut durchgemischt für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Well. Die Platten wurden über Nacht inkubiert, um einen konfluenten Monolayer zu bilden und eine Adhäsion zu gewährleisten.

Vor dem „Scratch“ (dem Zufügen der „Wunde“) wurden die Wells mit 1,5ml/Well PBS gewaschen und 2ml frisches Medium zugefügt. Es wurden die Wnt-Inhibitoren erneut in folgenden Konzentrationen mit den entsprechenden Kontrollen untersucht:

Wnt-Inhibitor	Konzentration	DMSO in Kontrolle
SB216763	100µM	0,2%
XAV939	50µM	0,5%
Triptolid	50nM	0%

**Tabelle 13: Konzentrationen der Wnt-Inhibitoren und DMSO-Konzentrationen in den Kontrollen**

Nach Zugabe der Substanzen wurde mit einer 200µl-Pipettenspitze manuell ein gerader vertikaler „Scratch“ kreiert, welcher senkrecht zu den Bodenmarkierungen lief. Folgende Darstellung beschreibt diesen Vorgang:



**Abbildung 3: Scratch<sup>140</sup>**

Bei diesem Schritt wurde sehr darauf geachtet, bei jeder Durchführung den gleichen Druck und den gleichen Winkel einzuhalten und eine zellfreie Zone zu formen, in welche die Zellen am Rand der „Wunde“ einwandern konnten. Es durfte jedoch auch nicht zu viel Druck ausgeübt werden, da durch eine Beschädigung der extrazellulären Matrix der Zellen am Rand des „Scratch“ die Migrationsrate beeinflusst werden konnte.<sup>141</sup> Zudem durfte auch die Oberfläche des Bodens nicht beschädigt werden, um keine bevorzugte Migrationswege zu erzeugen.<sup>142</sup>

Die erste Fotodokumentation unter dem inversen Mikroskop wurde gleich nach dem Scratch zum Zeitpunkt 0h durchgeführt. Weitere Fotos wurden nach 24, 48 und 72 Stunden aufgenommen. Dabei wurden die Zellen der Referenzfelder aufgesucht und deren Migration beobachtet. Ein weiterer Mediumwechsel mit entsprechendem Inhalt an Wnt-Inhibitoren wurde 48 Stunden nach dem „Scratch“ wiederholt.

Der Wound-Healing Assay wurde mit ImageJ-win64 ausgewertet.

### 3.3.7 Cell Death Detection ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der durch das Triptolid ausgelösten Apoptose wurde der Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) verwendet. Es ist dies eine schnelle, sehr sensible und verlässliche Methode zur frühen Detektion apoptotischer Zellen und Ermittlung der Menge an Histon-assoziierten DNA-Fragmenten (Mono- und Oligonukleosomen) mit niedrigem Molekulargewicht im Zytoplasma der Zellen.<sup>143</sup> Die Präsenz dieser Fragmente ist ein Merkmal der in Apoptose befindlichen Zellen.<sup>144</sup>

Das Prinzip dieses Assays basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay unter Verwendung eines monoklonalen Maus-Antikörpers, welcher gegen DNA beziehungsweise Histone gerichtet ist.<sup>145</sup>

Es wurden dabei die im Voraus hergestellten Zelllysate in eine mit Streptavidin-beschichtete Microplatte aus dem Kit platziert. Während der Inkubation der Lysate mit Anti-Histon-Biotin- und Anti-DNA-POD-Antikörper verband sich der Anti-Histon-Biotin-Antikörper mit den Histon-Komponenten. Gleichzeitig band er den Immunkomplex an die Streptavidin-beschichtete Microplatte über eine Biotinylierung. Zusätzlich reagierte der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Nach der Entfernung der ungebundenen Komponenten durch einen Wasch-Schritt konnte die Menge an Nukleosomen quantitativ bestimmt werden, indem das im Immunkomplex vorhandene POD durch die Umsetzung von ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) -Substrat photometrisch gemessen wurde.<sup>146</sup>

#### 3.3.7.1 Versuchsdurchführung

Die lyophilisiert gelieferten Lösungen wurden gemäß dem Herstellerprotokoll vor dem ersten Gebrauch gelöst.

##### Lysatherstellung:

Zu Beginn wurden die beiden Zelllinien, wie weiter oben bereits erläutert, auf 100.000 Zellen/ml Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100µl je Well in eine 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert und die Zellen adhärten über Nacht im Brutschrank.

Am nächsten Tag wurden Triplikate mit den Triptolid-Konzentrationen 6,25nM, 12,5nM, 25nM und 50nM sowie entsprechende Kontrollen hergestellt. Bei dem ersten Durchgang des Versuchs wurde 4h bei leicht geöffnetem Deckel, um den Gasaustausch zu ermöglichen, im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde einmal mit 16h und dann zweimal mit 24h inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 200µl Lysepuffer behandelt und bei Raumtemperatur für 30 min lysiert. In dieser Zeit wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde von den Wells in beschriftete 1ml Eppendorf-Gefäße pipettiert und für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand, in welchem sich nun die Zytoplasma-Bestandteile befanden, wurden vorsichtig 20µl je Eppendorf-Gefäß in die Streptavidin-beschichtete Microplatte transferiert. Zusätzlich wurden noch eine vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle und eine Background-Kontrolle, welche nur aus dem Inkubationspuffer bestand, in Triplikaten mitgeführt.

#### ELISA-Assay:

Zu jedem Well der Microplatte wurden 80µl des Immunoreagenz (1/20 Anti-DNA-POD-Antikörper, 1/20 Anti-Histon-Biotin-Antikörper und 18/20 Inkubationspuffer) pipettiert. Nach der Zugabe des Immunoreagenz wurde die Microplatte mit einer haftenden Abdeckfolie überzogen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler bei 300 Upm inkubiert.

Das Immunoreagenz wurde nach der Inkubation gründlich ausgekippt und auf Zellpapier ausgeklopft. Die Wells wurden dreimal mit 250µl Inkubationspuffer gewaschen, welcher danach durch Ausklopfen gut entfernt wurde.

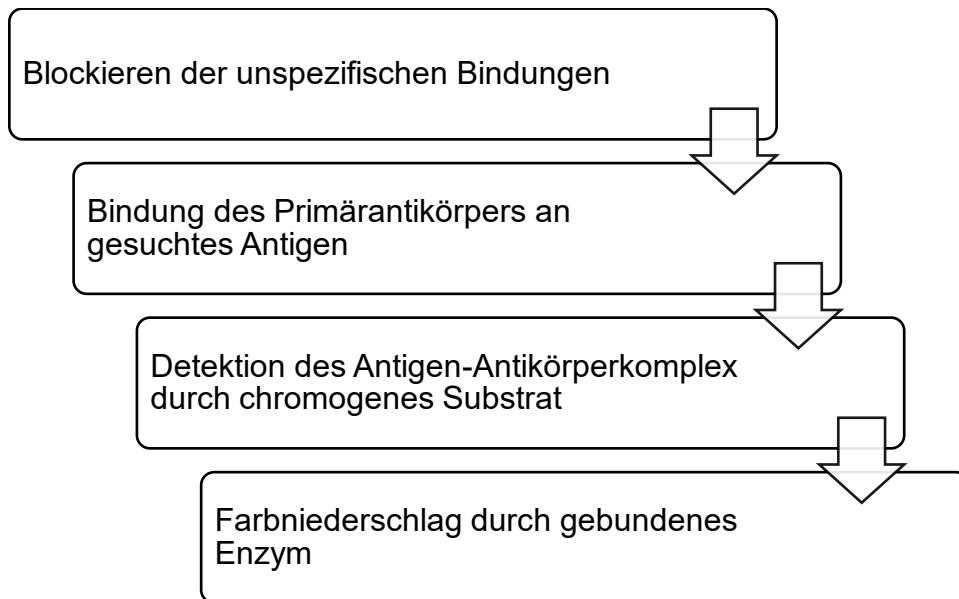
Nun wurden zu jedem Well 100µl ABTS-Lösung pipettiert. Diese wurde durch Zugabe einer ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer generiert.

Während der Inkubation am Plattenschüttler bei 250 Upm kam es zur Reaktion von ABTS mit POD, wodurch sich ein grün gefärbtes Radikalkation bildete. Diese Farbreaktion wurde nach 15 Minuten durch eine Stopplösung (1% Natriumdodecylsulfat) beendet. Die Absorption, welche die Menge an Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma und somit die in Apoptose befindlichen Zellen repräsentiert, wurde bei 405nm am ELISA-Reader gemessen.<sup>147</sup>

### 3.4 Immunzytologie

Im immunzytologischen Teil dieser Arbeit wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin und von phosphorylierter Glycogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in beiden Zelllinien, A2780 und A2780cis, unter der Behandlung mit den Wnt-Inhibitoren untersucht.

Das Grundprinzip der Immunzytologischen Färbung beruht auf folgenden Schritten:



Dieses Grundprinzip spiegelt sich auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen wider. In Bezug auf das verwendete Detektionssystem und Chromogen unterschieden sie sich jedoch. Die folgende Tabelle stellt die unterschiedlichen Detektionssysteme und Verfahren dar.

Färbungen	$\beta$ -Catenin	GSK-3- $\beta$	M30-CytoDeath
<b>Primärantikörper</b>	Anti- $\beta$ -Catenin (Kaninchen-IgG)	Anti-GSK-3- $\beta$ (phospho Y216) (Kaninchen -IgG)	Anti-M30 (Maus-IgG)
<b>Detektionssystem</b>	Vectastain Elite Kaninchen -IgG-Kit	ZytoChem Plus HRP Polymer System-Kit	ZytoChem Plus HRP Polymer System-Kit
<b>Chromogen</b>	AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole)	DAB (3,3'-diaminobenzidin)	DAB (3,3'-diaminobenzidin)

**Tabelle 14: Im Färbeprozess verwendete Materialien**

### 3.4.1 Versuchsdurchführung

#### Präparation der Objektträger

Die Objektträger wurden einzeln autoklaviert und steril in eine 4-Well-Objektträgerkammer gelegt. Es wurde für die A2780 Zelllinie eine Zellsuspension von 500.000 Zellen/ml Medium, und für die A2780cis Zelllinie 750.000 Zellen/ml Medium erstellt (Prozess wie oben bereits beschrieben). Der Unterschied in der Zellzahl beruht auf der in der Kultivierung festgestellten geringeren Wachstumstendenz der A2780cis-Zellen. Von dieser Zellsuspension wurde zuerst je 1ml auf die Objektträger pipettiert und das Volumen danach mit Nährmedium auf 5ml/Objektträger aufgefüllt.

Nach einer viertägigen Kultivierung wurden die Wnt-Inhibitoren zugegeben. Die Objektträger der  $\beta$ -Catenin- und der GSK-3- $\beta$ -Färbung wurden für 72 Stunden mit 100 $\mu$ M SB216763, 50 $\mu$ M XAV939 und 50nM Triptolid bei 37° C inkubiert. Es wurden Kontrollen mitgeführt, welche mit 0,2%, 0,5% und ohne DMSO behandelt wurden.

Bei der M30-Färbung wurde für 48 Stunden mit 6,25nM, 12,5nM, 25nM und 50nM des Triptolides inkubiert. Auch hier wurde eine Kontrolle ohne Triptolid-Behandlung unter gleichen Bedingungen erstellt.

Zur Fixierung wurde das Medium abgesaugt und die Objektträger für fünf Minuten lang zuerst in PBS und danach fünf Minuten in eiskaltem Methanol eingelegt. Nun konnten die fixierten Objektträger bei -20° C eingefroren aufbewahrt werden.

### 3.4.2 $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbung

Wie in der Einleitung beschrieben, befindet sich das  $\beta$ -Catenin beim aktiven Wnt-Signalling im Nukleus der Zellen. In Abwesenheit aktivierender Trigger wird das  $\beta$ -Catenin jedoch vom  $\beta$ -Catenin-Destruktions-Komplex, welcher aus Axin, Adenomatous-polyposis-coli (APC) und Glycogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK-3- $\beta$ ) besteht, degradiert, von der Casein-Kinase-1 (CK1) phosphoryliert und dadurch ubiquitär von den Proteosomen abgebaut.

#### Färbung

Der Färbeprozess erfolgte in einer feuchten Kammer, um die Objektträger im Verlauf der Färbung vor einer Austrocknung zu schützen. Zur Herstellung des TBS (TRIS-



gepufferte Kochsalzlösung) wurden 6,05g TRIS und 8,76g NaCl (Natriumchlorid) in 800ml dH<sub>2</sub>O vermengt, mit 1molarem HCl auf einen pH-Wert von 7,5 titriert und mit weiterem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt. Das TBS wurde dann bei 4 °C gelagert. PBS-Brij bestand aus sterilem PBS und einem Brij-Anteil von 0,2%. Zu Beginn wurden die Objektträger mit einem Fettstift in der Hälfte separiert. Dies diente dazu, gebildete unspezifische Bindungen auszuschließen. Lediglich eine Hälfte wurde mit dem Antikörper behandelt. Die andere Hälfte wurde als Negativkontrolle nur mit PBS behandelt. Im weiteren Prozess wurden beide Hälften identisch behandelt. Nach einem Waschschrift in einer Glasküvette mit PBS-Brij beziehungsweise TBS wurden die Objektträger 20 Minuten ( $\beta$ -Catenin) oder 5 Minuten (GSK-3- $\beta$ ) mit dem Blockierungsserum des jeweiligen Detektionssystems behandelt. Dieses sättigte die elektrostatischen Ladungen im Gewebe ab und verhinderte, dass sich im Verlauf Immunglobuline durch hydrophobe Bindungen unspezifisch an die Membranen oder Fettgewebe binden. Somit wurde prinzipiell eine unspezifische Anfärbung verhindert. Der Primärantikörper wurde nun auf die untere Hälfte des Objektträgers pipettiert: Im Falle der  $\beta$ -Catenin-Färbung wurde der in einer Konzentration von 1:600 in PBS-Brij verdünnte polyklonale aus Kaninchen gewonnene Anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper verwendet. Für die GSK-3- $\beta$ -Färbung wurde der in TBS 1:100 verdünnte Anti-GSK-3- $\beta$ -Antikörper, welcher ebenfalls im Kaninchen gewonnen wurde, verwendet. Die beiden Primärantikörper wirkten jeweils über Nacht in der feuchten Kammer bei 4 °C ein. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper abgeschüttet und die Objektträgerhälften wurden mit PBS-Brij beziehungsweise TBS gewaschen (zweimal zwei Minuten lang).

Die folgenden Schritte variierten aufgrund der unterschiedlichen Detektionssysteme. Im Fall der  $\beta$ -Catenin-Färbung wurden die Objektträger 30 Minuten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper behandelt. Dieser koppelte in seiner Funktion als Brückenantikörper an den Primärantikörper. Während dieser Inkubationszeit wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) vorbereitet und die Objektträger nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS-Brij (zweimal zwei Minuten lang) und danach 30 Minuten mit dem ABC-Komplex inkubiert.

Eine kurze Erläuterung des ABC-Prinzip: Das tetravalente Avidin DH (eine speziell hergestellte Form des Avidin, welche unspezifische Bindungen vermeidet) hat eine sehr hohe Affinität für Biotin (Vitamin H) und ist das Reagenz A. Reagenz B ist das mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugierte Biotin, welches

zwei Bindungsstellen für Avidin aufweist. Die beiden Reagenzien werden prä-inkubiert und bilden den riesigen Avidin-Biotin-Komplex. Das vom Hersteller angegebene Verhältnis ist dabei strikt zu beachten, um eine Sättigung des Avidin DH zu vermeiden. Ein Aliquot wird auf die Objektträger gegeben und der biotinylierte Sekundärantikörper kann an die noch freien Bindungsstellen des Avidin DH binden. Somit bildet sich ein Gitter aus biotinyliertem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex, und es kann die Intensität der Färbung stark erhöht werden.

Bei der GSK-3- $\beta$ -Färbung wurde nach dem Primärantikörper und dem folgendem Waschschrift für 20 Minuten ein Verstärkerreagenz (Post-Block Reagenz) aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS (zweimal zwei Minuten lang) kam es für 30 Minuten zur Inkubation mit dem einem Biotin-unabhängigen Meerrettichperoxidase (HRP)-Polymer.

Im folgenden Schritt wurde zu beiden Färbungen eine Substrat/Chromogen-Lösung zugefügt. Als Chromogen diente für die  $\beta$ -Catenin-Färbung AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), mit welchem die Zellen 13 Minuten inkubiert wurden. Für die GSK-3- $\beta$ -Färbung wurde DAB (3,3'-Diaminobenzidin), bei dem die Inkubationszeit 1,5 Minuten betrug, verwendet. Es kam dabei zu einer enzymatischen Reaktion, bei der das Chromogen durch die an den Antikörper gebundene Peroxidase (HRP) oxidiert wird und sich ein Farbniederschlag bildet. Dadurch wird nach Vollendung des Färbevorganges eine visuelle quantitative Auswertung unter dem Lichtmikroskop ermöglicht.

Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Objektträger mit dH<sub>2</sub>O gewaschen (zweimal zwei Minuten lang). Letzter Schritt des Färbevorganges war eine einminütige ( $\beta$ -Catenin) beziehungsweise zweiminütige (GSK-3- $\beta$ ) Gegenfärbung mit saurem Hämalun nach Mayer. Bei diesem Färbeverfahren kommt es zu einer Bindung der positiv geladenen Farbstoffmoleküle an die im Zellkern vorhandenen anionischen Strukturen, wie die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Beim folgenden 5-minütigen Spülen mit Leitungswasser kam es zur Anhebung des pH-Wertes und damit zur typischen Blaufärbung des Nukleus.

Als letzter Schritt der immunzytologischen Färbung folgte das Eindecken der Objektträger mit Lab Vision™ Vision Mount (Thermo Fisher Scientific) um diese für die lichtmikroskopischen Auswertung zu konservieren.

### 3.4.3 M30-Färbung

Bei der Färbung wurde mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers M30-CytoDEATH (IgG) die Auswirkung der Triptolid-Behandlung auf die Ovarialkarzinomzellen und die damit verbundene Apoptose untersucht. Zur visuellen Darstellung kommt eine spezifische Bindungsstelle der Caspase des Zytokeratin 18, welche ein Endprodukt des Caspase abhängigen frühen Apoptosevorganges ist.

Durch die hohe apoptotische Wirkung des Triptolides wurden die Objektträger 48 Stunden mit folgenden Triptolid-Konzentrationen inkubiert: 6,25nM, 12,5nM, 25nM und 50nM Triptolid. Unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Triptolid-Behandlung, wurden die Kontrollen hergestellt.

#### Färbung

Die M30-Färbung erfolgte weitgehend analog zu dem bereits im vorherigen Kapitel beschriebenen Färbeprozess:

Die Objektträger wurden erneut mit einem Fettstift in zwei Hälften separiert, um gebildete unspezifische Bindungen auszuschließen. Im weiteren Verlauf wurde lediglich eine Hälfte mit dem Antikörper behandelt und die andere Hälfte nur mit PBS zur Erzeugung einer Negativkontrolle. Der restliche Färbeprozess gestaltete sich in beiden Hälften identisch. Nach dem Spülen der Objektträger in dH<sub>2</sub>O erfolgte ein zweimaliges Waschen der Objektträger in einer Glasküvette mit PBS/0,1% Tween20. Nach einer 5-minütigen Behandlung mit dem Blockierungsserum zur Verhinderung einer unspezifischen Anfärbung wurde der 1:50 in PBS verdünnte aus Mäusen gewonnene Anti-M30-Primärantikörper auf die untere Objektträgerhälfte aufgetragen und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper abgeschüttet und die Objektträgerhälften mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen (zweimal zwei Minuten lang). Im nächsten Schritt wurde auf beide Hälften der Objektträger für 20 Minuten ein Verstärkerreagenz (Post-Block Reagenz) appliziert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS/0,1% Tween20 (zweimal zwei Minuten lang) und eine 30-minütige Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-Polymer. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS/0,1% Tween20 (zweimal zwei Minuten lang). Danach erfolgte die Substratfärbung für 1,5 Minuten mit dem Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin). Wie bereits beschrieben erfolgte dabei ein Farbniederschlag durch Oxidation der an den Antikörper gebundenen Peroxidase (HRP). Zur

Beendigung dieser enzymatischen Reaktion folgte ein Waschen der Objektträger mit dH<sub>2</sub>O (zweimal zwei Minuten lang). Nun wurde eine Gegenfärbung mit saurem Hämaalaun nach Mayer für 2 Minuten vorgenommen. In der nachfolgenden 5-minütigen Spülung mit dH<sub>2</sub>O kam es durch die Veränderung des pH-Wertes zum Bläuen des Nukleus. Letztlich erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Lab Vision™ Vision Mount (Roche) zur Konservierung für die lichtmikroskopische Auswertung.

### **3.5 Evaluation und statistische Auswertung**

Die Aufbereitung der Daten und die statistische Auswertung wurde mittels Microsoft Excel Version 2015 und dem Programm GraphPad Prism 8 vorgenommen. Die Parameter wurden mithilfe einer einfaktoriellen ANOVA, gefolgt von Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, beziehungsweise zweifaktoriellen ANOVA, gefolgt von Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, analysiert und die statistische Signifikanz ermittelt.

#### **3.5.1 Zellviabilitäts-Test (MTT)**

Für die am Plattenlesegerät in Triplikat gemessenen Absorptionswerte wurden jeweils für die gleichen Konzentrationen an Wnt-Inhibitoren und für die DMSO-Kontrolle die Mittelwerte berechnet. Danach wurde der Mittelwert der Modulatoren auf die entsprechende Kontrolle in Prozent bezogen. SB216763 wurde dabei in Bezug zu den Kontrollen mit 0,2% DMSO gesetzt, XAV939 zu den Kontrollen mit 0,5% DMSO und das Triptolid zu den Kontrollen ohne DMSO. Die Kontrollen mit DMSO wurden zuvor in Bezug zur Kontrolle ohne DMSO gesetzt und die Prozentzahl errechnet. Die Daten wurden nachfolgend anhand einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche ausgewertet. Der Versuch wurde pro Substanz, Konzentration und Inkubationszeit neunmal durchgeführt (n = 9).

#### **3.5.2 Zellproliferations-Test (BrdU)**

Die Auswertung des Zellproliferations-Testes erfolgte erneut durch die Ermittlung des Mittelwertes der drei entsprechenden Triplikat-Absorptionswerte. Anschließend folgte die Eruiierung der Prozentzahl der Wnt-Inhibitoren bezogen auf die entsprechende Kontrolle wie oben beschrieben. Der Versuch wurde je neunmal durchgeführt (n = 9).

### **3.5.3 Wound-Healing Assay (Scratch Assay)**

Die bei dem Versuch erstellten Fotos der Zellen nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit den Wnt-Inhibitoren beziehungsweise der Kontrollen mit DMSO wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ-win64 ausgewertet. Anhand einer automatischen Kantenerkennung und Schwellenwerttechnik wurde die Fläche der Wunde eruiert. Die dabei erhaltenen Rohdaten der unterschiedlichen Untersuchungszeiten je Modulator wurden folglich auf die entsprechende Kontrolle in Prozent bezogen. Der Wound-Healing Assay wurde zweimal durchgeführt und es wurden je zwei Wunden je Substanz und Kontrolle ausgewertet ( $n = 4$ ). Anschließend erfolgte die Verarbeitung der Daten mit zweifaktoriellen ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche.

### **3.5.4 Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen**

Für die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen wurden im Falle der  $\beta$ -Catenin-Färbung in drei repräsentativen Abschnitten die Zellen anhand der Expression von  $\beta$ -Catenin an der Membran, beziehungsweise im Nukleus, gezählt. Danach wurde die Prozentzahl der Zellen mit nukleärer Lokalisation des  $\beta$ -Catenin eruiert. Die Ergebnisse der Zellen nach Behandlung mit den Modulatoren wurden nun bezogen auf die entsprechenden Kontrollen in Prozent eruiert. Es wurden je drei Auswertungen pro Substanz und der jeweiligen Kontrolle vorgenommen. Die Daten wurden schließlich mittels zweifaktoriellen ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche verarbeitet. Aufgrund der geringen Anzahl der mit dem Triptolid behandelten Zellen nach der Färbung, welche sich bereits in Apoptose befanden, konnte keine statistische Auswertung dieser Substanz durchgeführt werden ( $n = 3$ ).

### **3.5.5 Cell Death Detection ELISA**

Aus den erfassten Absorptionswerten der in Triplikaten durchgeführten Untersuchung wurde zuerst der Mittelwert errechnet und der Background (Absorptionswert bestehend aus Inkubationspuffer und den zugefügten Lösungen ohne Zellen)

abgezogen. Danach wurde der Enrichment Faktor eruiert, indem die Absorption der mit den Wnt-Inhibitoren behandelten Zellen in Bezug zur Absorption der jeweiligen Kontroll-Zellen gesetzt wurde. Es wurden sechs Absorptionswerte ( $n = 6$ ) erhoben und die Ergebnisse mit einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche analysiert.

### **3.5.6 M30-CytoDEATH-Färbung**

Zur Auswertung der M30-Färbung wurden die in Apoptose befindlichen Zellen ausgezählt. Danach wurde der Prozentanteil der in Apoptose befindlichen Zellen (M30 CytoDEATH positive) je Konzentration des Wnt-Inhibitors bezogen auf die Kontrolle errechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einem Dunnetts Post-hoc-Test ermittelt ( $n = 3$ ).

## 4 Ergebnisse

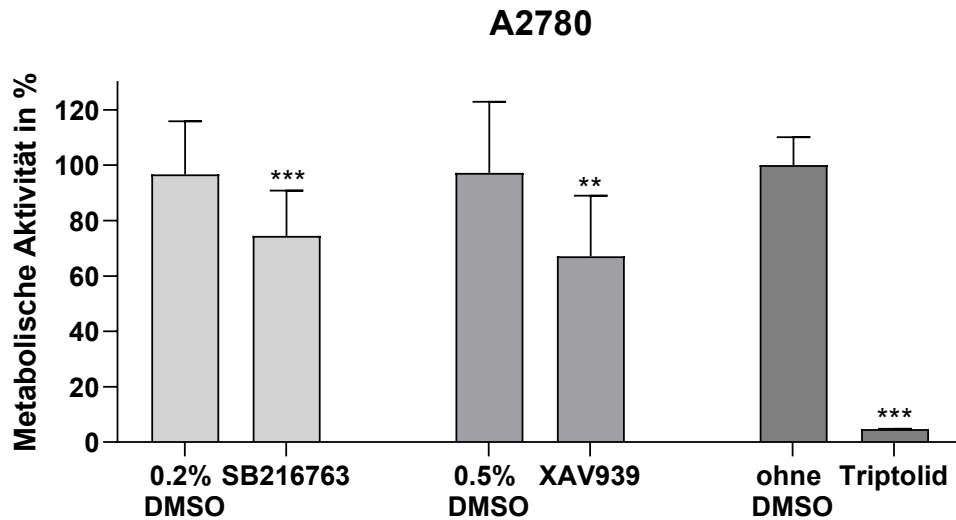
Ein Teil dieser Arbeit wurden bereits im Journal of Cancer Research and Clinical Oncology veröffentlicht.<sup>148</sup>

### 4.1 Ergebnisse des Zellviabilitäts-Testes (MTT) und des Zellproliferations-Testes (BrdU)

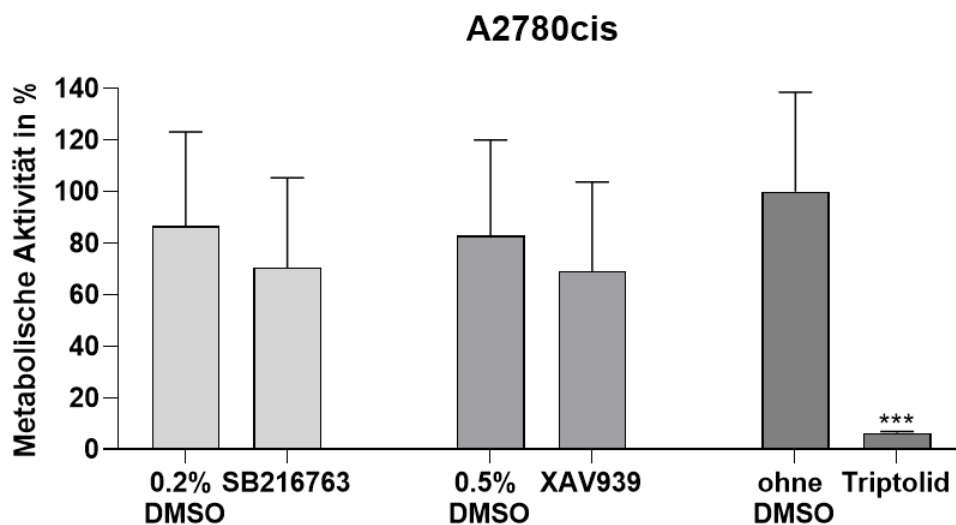
Um die Viabilität der Zellen nach der Inkubation mit den Wnt-Inhibitoren zu bestimmen, wurde der MTT Assay durchgeführt. Es konnte bei allen drei Substanzen in den platinsensiblen und -resistenten Zellen eine dosisabhängige verminderte metabolische Aktivität detektiert werden. Wie in der weiter unten befindlichen Grafik präsentiert, konnten in den A2780 Zellen für die Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bei SB216763 und 50 nM bei dem Triptolid sogar hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) und für 50  $\mu\text{M}$  bei XAV939 signifikante ( $p = 0,0016$ ) Ergebnisse erzielt werden. In den A2780cis Zellen zeigten SB216763 und XAV939 nichtsignifikante Werte, das Triptolid ergab jedoch wieder ein hochsignifikantes ( $p < 0,001$ ) Resultat. Dabei zeigte sich der Zellmetabolismus nach der Behandlung mit dem Triptolid schon nach einer Inkubation von 48 Stunden signifikant vermindert, bei den beiden anderen Substanzen nach 72 Stunden.

Es folgt die grafische Darstellung der höchsten getesteten Konzentration der Substanzen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen:





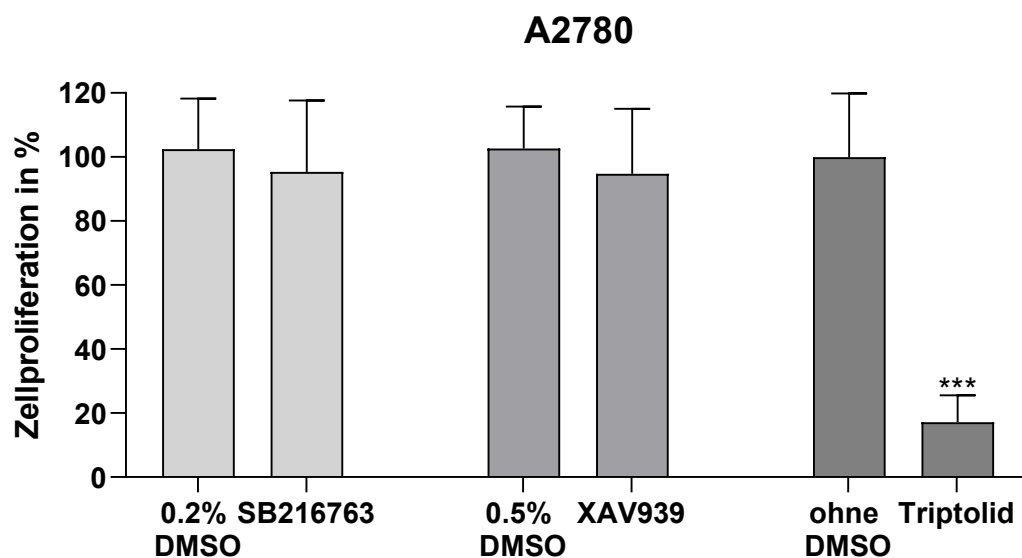
**Abbildung 4: Metabolische Aktivität der A2780 Zellen im MTT-Test nach 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich mit deren Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 9), einfaktorielle ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$**



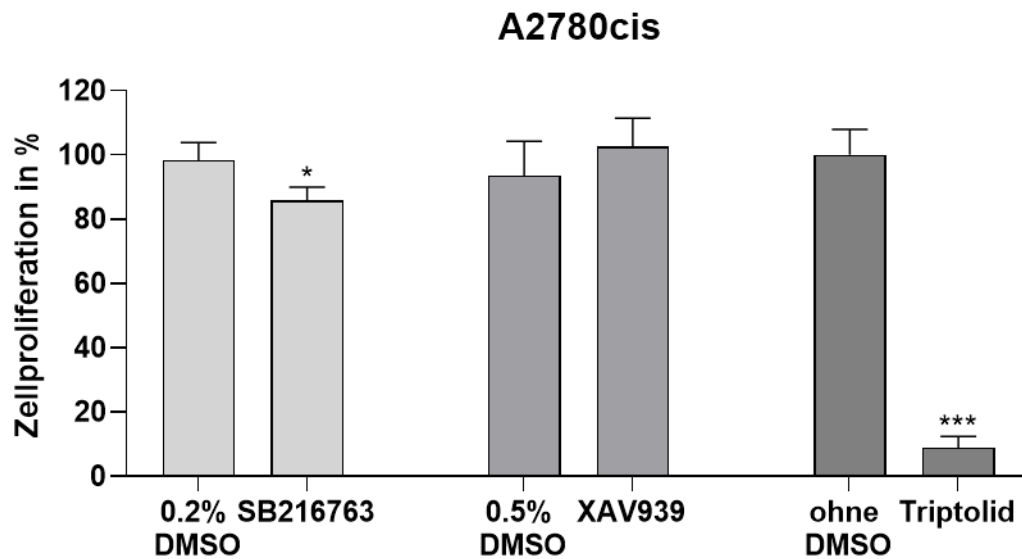
**Abbildung 5: Metabolische Aktivität der A2780cis Zellen im MTT-Test nach 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich mit deren Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 9), einfaktorielle ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,001$**

Zur Evaluierung der Auswirkungen der Behandlung mit den Wnt-Inhibitoren auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen wurde der BrdU-Assay durchgeführt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferation für das Triptolid, nicht jedoch für SB216763 und XAV939. Nach einer 72-stündigen Inkubation mit dem Triptolid (50nM) zeigte sich eine hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Verminderung der Proliferation in den A2780 (17,1%) und A2780cis (8,9%) Ziellinien. Während sich keine signifikante Inhibierung der Proliferation für XAV939 in beiden Ziellinien fand, zeigte SB216763 eine signifikante ( $p = 0,01$ ) Inhibierung dieser in den A2780cis Zellen auf 84,5%.

Es folgt die grafische Darstellung der höchsten getesteten Konzentration der Substanzen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen:



**Abbildung 6: Zellproliferation der A2780 Zellen im BrdU-Test nach 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt ( $n = 9$ ), einfaktorielle ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,001$**

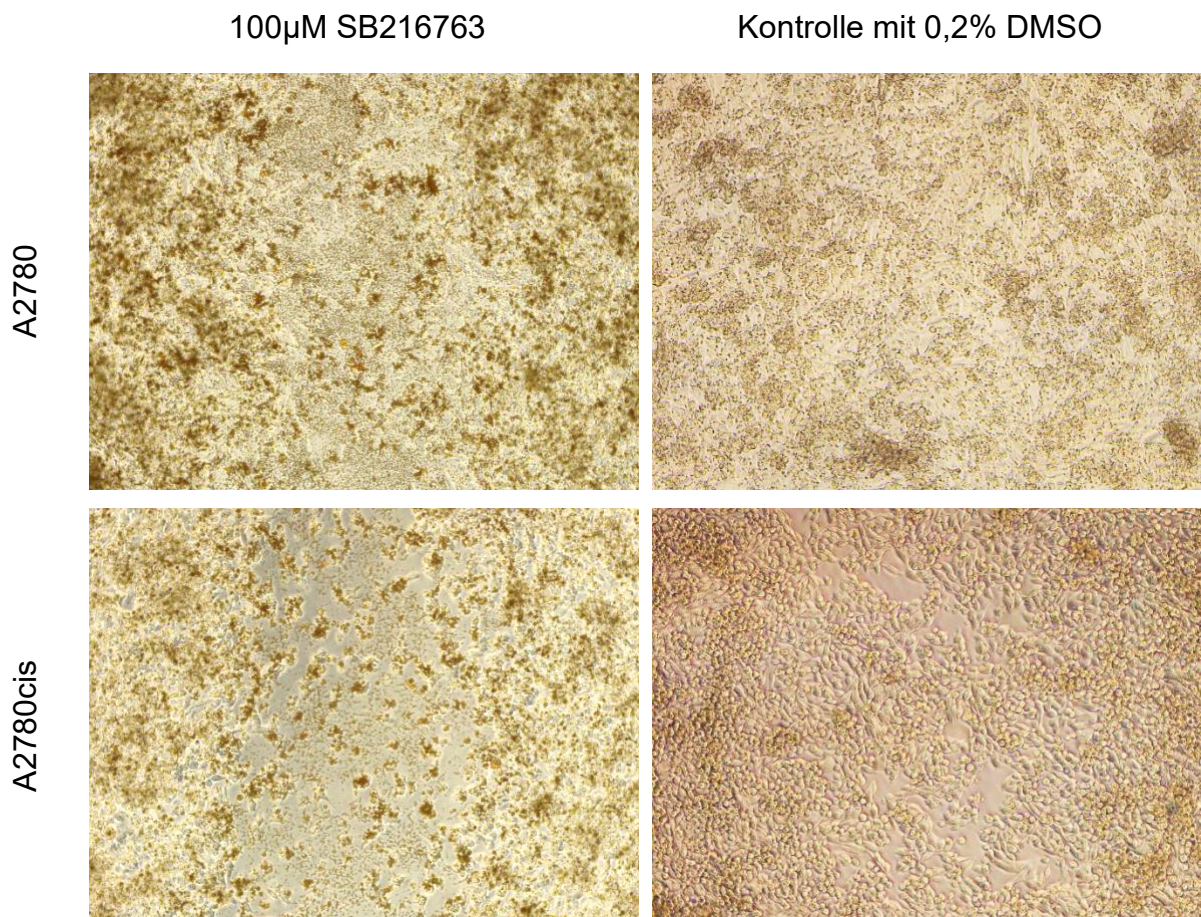


**Abbildung 7: Zellproliferation der A2780cis Zellen im BrdU-Test nach 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 9), einfaktorielle ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$**

## 4.2 Ergebnis des Zellmigrations-Assays

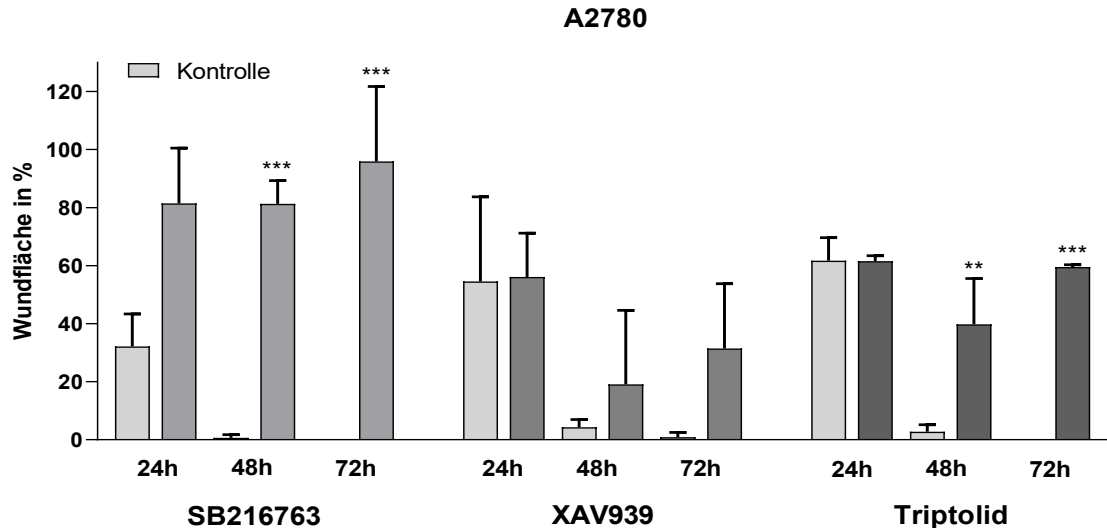
Die Darstellung der Migrationskapazität der Ovarialkarzinomzellen erfolgte mit dem in-vitro Wound Healing Assays. Dabei wurde den Zellen nach Inkubation mit den Wnt-Inhibitoren eine „Wunde“ zugefügt und im Anschluss beobachtet, ob sich diese „Wundfläche“ mit Hilfe der Zellmigration wieder schloss. In den A2780 Zellen konnte eine signifikante Reduktion der Wound Healing-Kapazität nach 48 und 72 h ( $p < 0,01$ ) für die Substanzen SB276763 und dem Triptolid beobachtet werden. Nach 72 Stunden lag die verbleibende Wundfläche der mit SB216763 behandelten Zellen bei 95,9% und 59,5% bei den mit dem Triptolid inkubierten A2780 Zellen. Im Vergleich dazu lag die Fläche der jeweiligen Kontrollen bei 0,0%, sie war somit „verschlossen“. In der platinresistenten Zelllinie A2780cis zeigte sich eine identische, wenngleich etwas niedrigere Wirkung der beiden Substanzen. Die Inkubation mit XAV939 zeigte keinen Effekt auf die Migrationskapazität der A2780 und A2780cis Zellen.

Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Wundflächen der Ovarialkarzinomzellen nach 72-stündiger Inkubation mit SB216763, verglichen mit den dazugehörigen Kontrollen (0,2% DMSO). Bei den mit dem Inhibitor inkubierten Zellen sieht man eine verbleibende Wundfläche, wohingegen bei den unbehandelten Zellen eine neue Zellschicht entstanden ist.

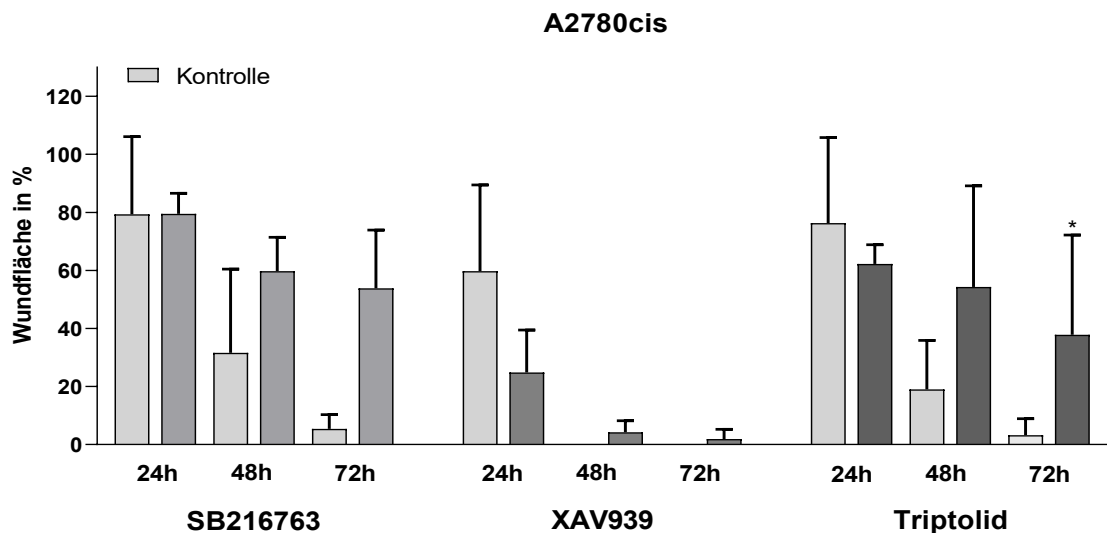


**Abbildung 8: Repräsentative Fotos der Wundfläche in den A2780 und A2780cis Zelllinien nach 72h Inkubation mit 100µM SB216763 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit 0,2% DMSO**

Es folgt eine grafische Darstellung der Wundfläche in Prozent, dabei ist der Ausgangswert die Wundfläche zum Zeitpunkt 0 h auf 100% gesetzt:



**Abbildung 9:** Migrationsverhalten der A2780 Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 4), zweifaktorieller ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

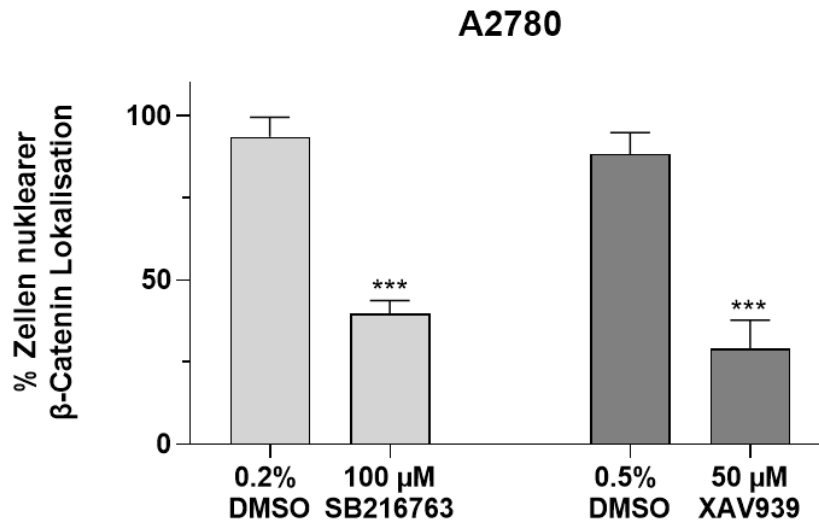


**Abbildung 10:** Migrationsverhalten der A2780cis Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100µM SB216763, 50µM XAV939, 50nM Triptolid) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 4), zweifaktorieller ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,05$

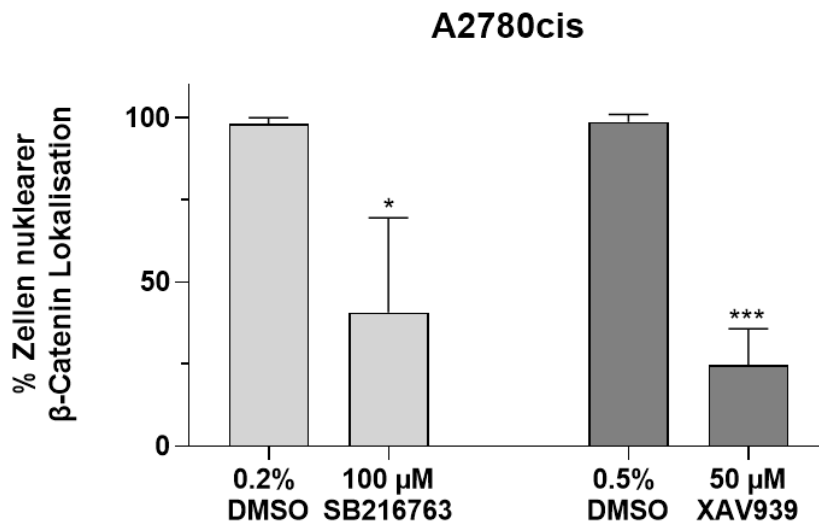
### **4.3 Ergebnis der Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen**

Die immunzytologische  $\beta$ -Catenin-Färbung wurde durchgeführt, um den Aktivierungszustand des Wnt-Signalwegs und die damit einhergehende Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus zu detektieren. Es konnte dabei eine signifikante Translokation von  $\beta$ -Catenin vom Nukleus in die Membran nach der Inkubation der Zellen mit SB216763 (100 $\mu$ M) und XAV939 (50 $\mu$ M) im Vergleich zu den Kontrollen in den Ziellinien A2780 und A2780cis gezeigt werden. Der größte Effekt fand sich nach der XAV939 Behandlung der A2780cis-Zellen mit einer  $\beta$ -Catenin Lokalisation im Nukleus von 99,1% vor und 25,2% nach der Inkubation. Aufgrund der geringen Anzahl der mit dem Triptolid behandelten Zellen nach der Färbung konnte keine Auswertung dieser Substanz durchgeführt werden.

Gezeigt sind folgend Grafiken der Ziellinien A2780 und A2780cis und deren  $\beta$ -Catenin-Shift nach der Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren SB216763 und XAV939. Es zeigt sich hier die Proportion der Zellen mit nuklearer Lokalisation von  $\beta$ -Catenin signifikant vermindert nach Addition von 100 $\mu$ M SB216763 oder 50 $\mu$ M XAV939 im Vergleich zu den Kontrollen.



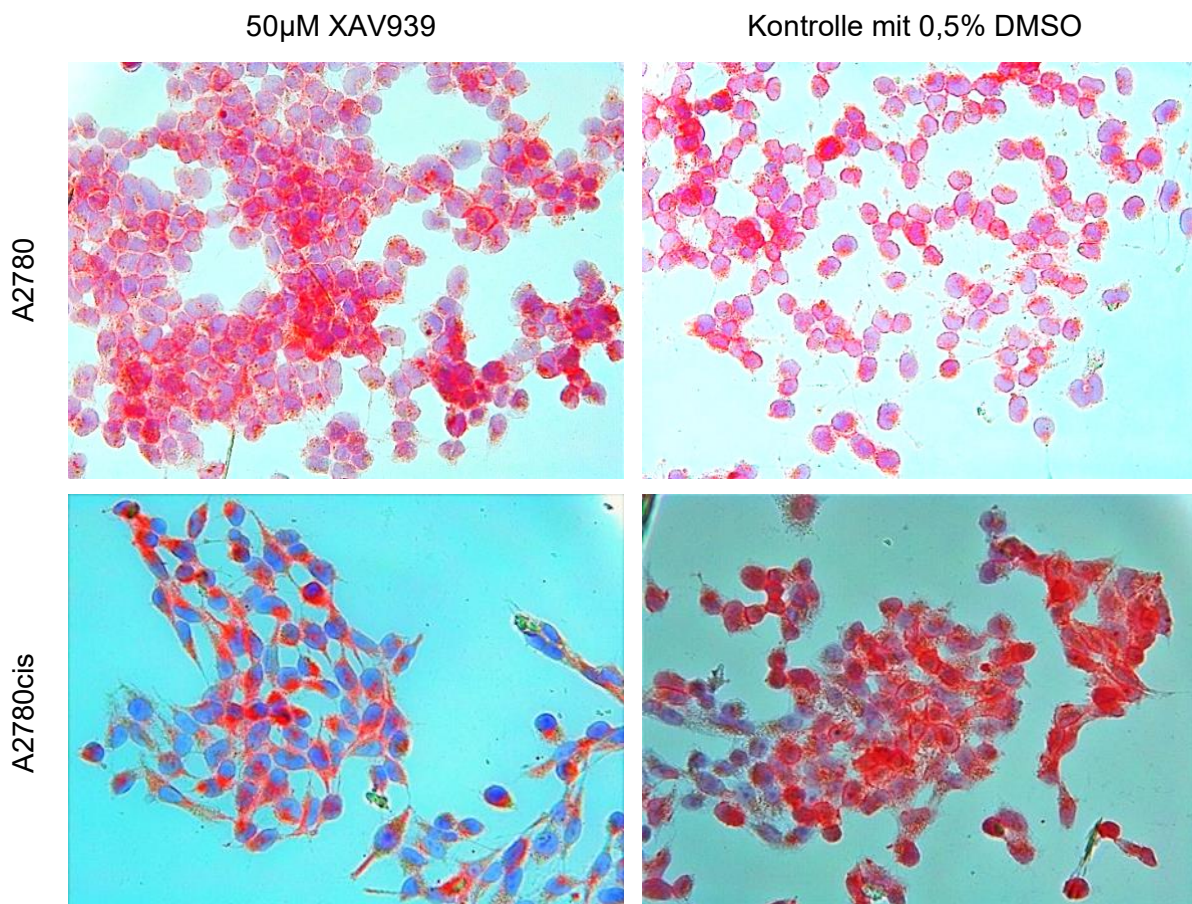
**Abbildung 11:** Darstellung des β-Catenin-Shift der A2780 Zellen nach der 72 h Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100μM SB216763, 50μM XAV939) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert ± SD dargestellt (n = 3), zweifaktorieller ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\*\* indiziert eine signifikante Veränderung p < 0,001



**Abbildung 12:** Grafische Darstellung des β-Catenin-Shift der A2780cis Zellen nach 72 h der Inkubation mit den Wnt-Signalweg-Inhibitoren (100μM SB216763, 50μM XAV939) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle abgebildet und als Mittelwert ± SD dargestellt (n = 3), zweifaktorieller ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \* indiziert eine signifikante Veränderung p < 0,05, \*\*\* = p < 0,001



Es wurden repräsentative Fotos der A2780 und A2780cis Zellen nach der Behandlung mit 50µM XAV939 und den entsprechenden Kontrollen, welche mit 0,5% DMSO inkubiert wurden, ausgewählt. Das  $\beta$ -Catenin stellt sich in der Färbung rot dar. Bei den mit XAV939 behandelten Zellen ist eine Translokation in die Zellmembran sichtbar, im Vergleich zur Kontrolle, in welcher sich das  $\beta$ -Catenin im Nukleus befindet.



**Abbildung 13: Repräsentative Fotos nach  $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780 und A2780cis Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 50 µM XAV939 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit 0,5% DMSO.  $\beta$ -Catenin stellt sich rot dar mit Translokation in die Zellmembran, im Vergleich zur Kontrolle**

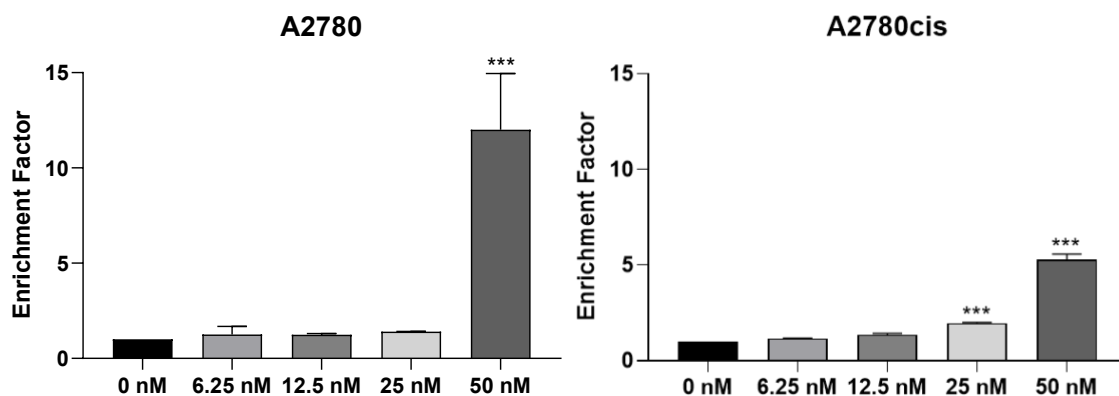
Aus der GSK-3- $\beta$ -Färbung konnten, nach zwei frustrierten Färbeversuchen, keine aussagekräftigen Ergebnisse erhoben werden.



#### 4.4 Ergebnisse des Apoptose-Assays Cell Death Detection ELISA und der M30-CytoDEATH-Färbung

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Triptolides in den vorhergehenden Ergebnissen wurde die Rolle davon in Bezug auf die Induktion einer Apoptose durch eine Inhibierung des Wnt-Signalwegs mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA untersucht. In diesem Assay können Histon-assoziierte DNA-Fragmente, welche bei der Apoptose entstehen, quantifiziert werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Triptolid in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM) zeigte sich ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) dosisabhängiger Anstieg der Absorption von maximal 8,9-fach in den A2780 und 2,7-fach in den A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Damit konnte erneut eine dosisabhängige, durch das Triptolid induzierte, Steigerung der Apoptose dargestellt werden. Der Versuch wurde pro Konzentration und Ziellinie sechsmal wiederholt ( $n = 6$ ).

Folglich die grafische Präsentation der Ergebnisse der in Apoptose befindlichen Zellen anhand des Enrichment Factors:



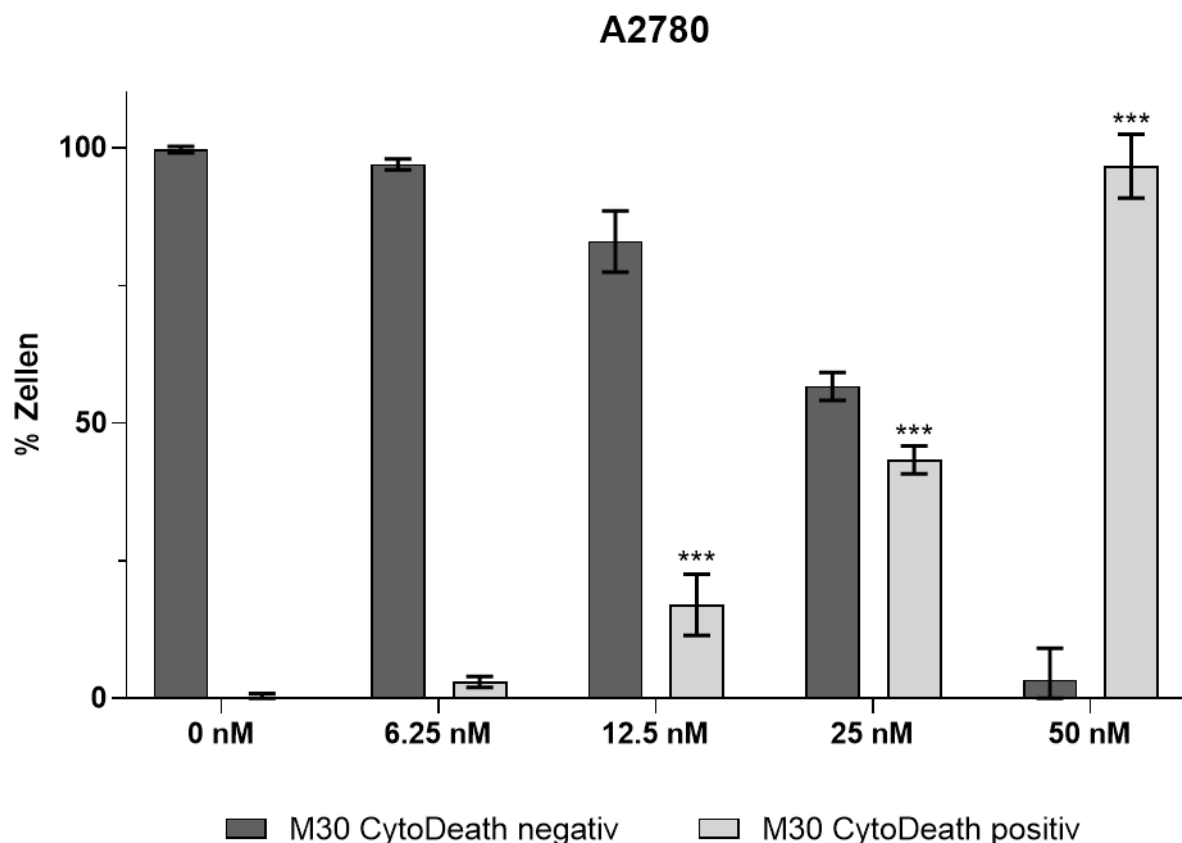
**Abbildung 14:** In Apoptose befindliche Zellen des Cell Death Detection ELISA der A2780 und A2780cis Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Triptolid in verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM) anhand des Enrichment Factors. Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt ( $n = 6$ ), einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,001$

Zur weiteren Analyse wurde eine M30 CytoDEATH-Färbung durchgeführt. Dabei wurde der Prozentanteil der in Apoptose befindlichen Zellen (M30 CytoDEATH positive) nach einer 48-stündigen Inkubation mit dem Triptolid in vier unterschiedlichen

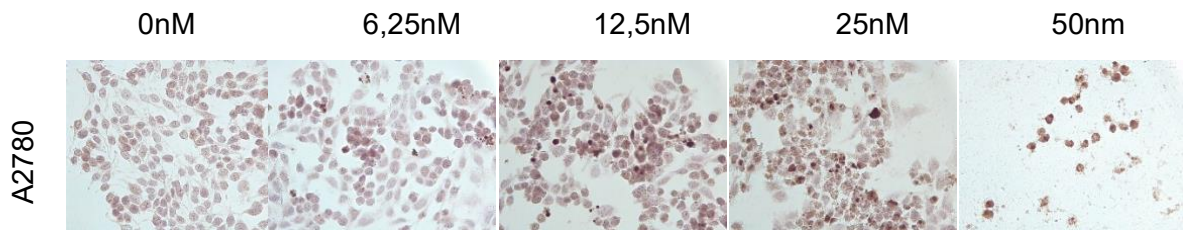
Konzentrationen, analog zum Cell Death Detection ELISA, ermittelt. Die in Apoptose befindlichen Zellen stellten sich nach der Behandlung mit DAB braun dar. Die Kontrollen (ohne DMSO) zeigten dabei 0% M30 CytoDeath positive Zellen.

Es präsentierte sich ein dosisabhängiger signifikanter Anstieg von 95,4% für A2780 und 53,1% für A2780cis, in der jeweils höchsten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

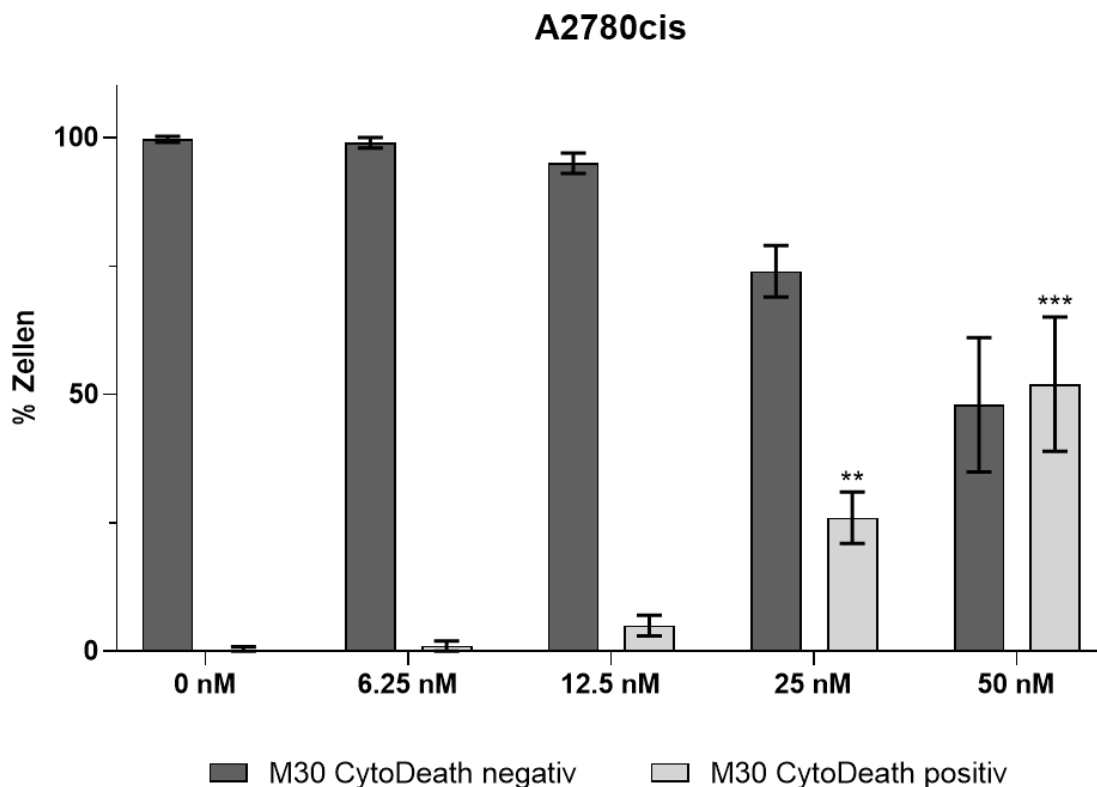
Weiters folgt die grafische und bildliche Darstellung. In der Grafik wird die Prozentanzahl der in Apoptose befindlichen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Es wurden repräsentative Fotos der A2780 und A2780cis Zellen nach Applikation der unterschiedlichen Konzentrationen des Triptolides in steigender Dosis ausgewählt.



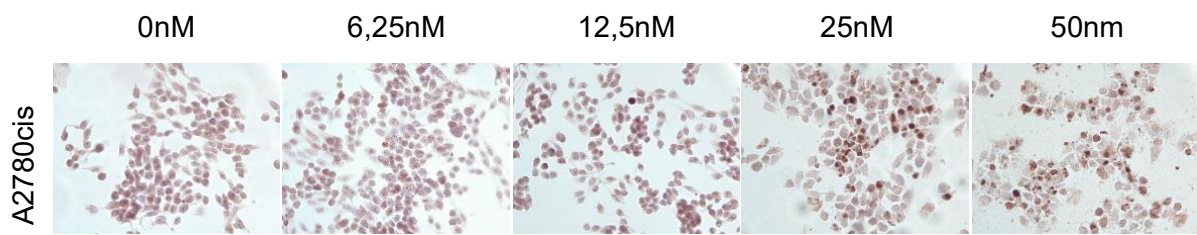
**Abbildung 15:** Prozent der in Apoptose befindlichen A2780 Zellen nach 48 h Inkubation mit dem Triptolid in verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM). Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt ( $n = 3$ ), einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,001$



**Abbildung 16: Repräsentative Fotos nach M30CytoDEATH-Färbung der A2780 Zellen nach 48 h Inkubation mit dem Triptolid in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM). Die in Apoptose befindlichen Zellen stellen sich braun dar**



**Abbildung 17: Prozent der in Apoptode befindlichen A2780cis Zellen nach 48 h Inkubation mit dem Triptolid in verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM). Die Werte sind als prozentuelle Veränderung bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO abgebildet und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 3), einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, \*\* indiziert eine signifikante Veränderung  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$**



**Abbildung 18: Repräsentative Fotos nach M30CytoDEATH-Färbung der A2780cis Zellen nach 48 h Inkubation mit dem Triptolid in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM und 50 nM). Die in Apoptose befindlichen Zellen stellen sich braun dar**

## 5 Diskussion

Trotz intensiver Forschung zur Ätiologie, Pathogenese und zu möglichen Risikofaktoren sowie den Fortschritten in der operativen und medikamentösen Behandlung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate beim Ovarialkarzinom weiter bei unter 50%. Dies liegt auch an der hohen Rezidivrate, vor allem in den fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV), in welchen jedoch meist die Erstdiagnose gestellt wird. Besonders die Platinresistenz ist für das Gesamtüberleben hierbei prognosebestimmend. Auch wenn das Ovarialkarzinom primär als ein sehr chemosensitiver Tumor einzustufen ist, treten bereits ca. 25% der Erstrezidive kurz nach Abschluss der Chemotherapie auf. Nach einem Rezidiv entwickeln im klinischen Verlauf fast alle Patientinnen eine Platinresistenz. Das Ansprechen auf eine platinhaltige Therapie ist relevant für die Art der Therapie sowie das Therapieziel. Im Gegensatz zum platinsensitiven Rezidiv, bei dem die Ziele aus der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bestehen, steht beim platinresistenten Rezidiv die Lebensqualität und Symptomkontrolle im Vordergrund.<sup>79,116,149</sup>

Eine Kombination aus heterogenen primären und erworbenen Mechanismen in diversen molekularen Signalwegen sind ursächlich für die Resistenzbildung. Mechanismen sind hierbei unter anderem eine reduzierte Aufnahme, ein vermehrter Efflux, eine Inaktivierung von Anti-Oxidantien und eine Erhöhung der DNA Reparatur und Toleranz.<sup>100</sup>

Weiters scheint hierbei eine fehlerhafte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges durch aberrante Komponenten den Prozess einer Platinresistenzbildung zu begünstigen.<sup>105</sup> Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg spielt eine essenzielle funktionelle Rolle in diversen molekularen Prozessen im Organismus und eine Dysregulation ist meist mit weitreichenden Folgen, wie der Tumorgenese, verbunden.<sup>10, 86, 108</sup> In Studien hatte sich die Hypothese entwickelt, dass eine Re-Induktion einer Platinsensibilität in vormalig platinresistenten Ovarialkarzinomzellen durch eine Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges erzielt werden kann.<sup>105,109-111</sup> Somit bietet eine Modulation dieses Signalweges einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt in der Therapie des schwer zu behandelnden platinresistenten Ovarialkarzinom-Rezidivs.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis den Wnt-Signalweg-Modulatoren SB216763, XAV939 und einem Triptolid in vitro ausgesetzt und mittels immunzytochemischer Färbungen und funktionellen Tests auf eine Re-Sensitivierung der Zellen auf Cisplatin untersucht.

Die A2780 Ziellinie ist in der Ovarialkarzinom-Forschung seit Jahren gut etabliert. Es sind dabei kommerziell verfügbare platinsensible (A2780) und platinresistente (A2780cis) Linien vorhanden, welche den Kontrast zwischen platinsensiblen und platinresistenten Zellen sehr gut darstellen. Alle drei getesteten Substanzen zeigten dabei eine Wirkung sowohl auf die platinsensible A2780 als auch die platinresistente Zelllinie A2780cis.

Es zeigte jedoch nur das Triptolid einen kontinuierlichen signifikanten Effekt auf die Proliferation, Viabilität und Induktion einer Apoptose. Damit konnten die bereits vorhandenen positiven Resultate des Triptolides in Bezug auf die Reduktion der Tumorprogression bestätigt werden.<sup>110,150</sup>

Hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit erstmals das Triptolid direkt verwendet wurde und kein Prodrug. Zudem gab es zur Wirkung von SB216763 und XAV939 auf platinresistente und platinsensible Ovarialkarzinom-Zellen zur Zeit der Durchführung dieser Studie noch keine Daten.

Nach Evaluation der richtigen Konzentrationen für die jeweiligen Substanzen war die Bestimmung der optimalen Zellzahl für die entsprechenden Untersuchungen und der Inkubationszeit mit den Inhibitor-Substanzen eine Herausforderung. Durch diverse Vortests und Negativkontrollen konnten schließlich sehr zufriedenstellende Ergebnisse mit ausreichender Sensitivität und Spezifität erreicht werden. Bei der GSK-3- $\beta$ -Färbung konnte jedoch keine adäquate Anfärbung zur ausreichenden Antigenexpression gefunden werden.

Um in den Versuchen intra- und interpersonelle Schwankungen der Durchführung und Auswertung zu vermeiden, wurde die Versuchsdurchführung sowie die Auswertung und Zählung der Zellen von nur einer Person vorgenommen und immer am selben Tag alle entsprechenden Auswertungen durchgeführt. Bei der immunzytologischen Färbung und dem Wound-Healing-Assay handelt es sich um semi-quantitative Verfahren. Der prozentuale Anteil wurde nach Auszählung beziehungsweise Auswertung von repräsentativen Abschnitten errechnet.

In dieser Studie wurde versucht, die Aussagekraft der Hypothesen und Ergebnisse mit jeweils unterschiedlichen Methodiken zu untermauern. So wurde unter anderem zur Darstellung der durch das Triptolid induzierten Apoptose ein Cell Death Detection ELISA und eine M30-CytoDEATH-Färbung durchgeführt. Beim Cell Death Detection ELISA wurde mittels Histon-assoziierten DNA-Fragmenten die Menge an apoptotischen Zellen ermittelt. Mit der M30-CytoDEATH-Färbung wurde der Apoptosevorgang visuell mittels Zytokeratin 18 dargestellt. Die Zahl der in Apoptose befindlichen Zellen konnte anschließend, nach Auswertung von repräsentativen Abschnitten, eruiert werden.

Das Verhalten von GSK-3- $\beta$ , welches als Chamäleon in dysregulierten Wnt-Signalwegen in Tumorzellen wirkt, führte zur Überlegung, eine Inhibierung des GSK-3- $\beta$  als mögliche Tumorthherapie in Betracht zu ziehen.<sup>151,152</sup>

Paradoxerweise zeigten die Zellen nach einer Behandlung mit dem GSK-3- $\beta$ -Inhibitor SB216763, mit einer vermuteten darauffolgenden Aktivierung des Wnt-Signalweges, ähnliche Resultate wie nach der Behandlung mit dem Wnt-Signalweg-Inhibitor XAV939.

Es wurde bereits in Studien postuliert, dass GSK-3- $\beta$  eine wichtige Rolle in der Tumorprogression von Ovarialkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich spielen.<sup>120,121</sup> Möglicherweise steht dies mit der Inklusion von GSK-3- $\beta$  auch in anderen Signalwegen, wie dem *NF $\kappa$ B*, oder durch Modulation des Mikromilieus des Tumors in Zusammenhang.<sup>153-155</sup>

Die Diversität der Target-Gene des Wnt-Signalweges ermöglichen jedoch auch das Vorliegen einer inhibitorischen Funktion des Wnt-Signalweges in Bezug auf die Tumorprogression.<sup>112,156</sup>

Die Serin/Threonin-Kinase GSK-3- $\beta$  wurde primär als Regulator der Glykogen-Synthese identifiziert.<sup>149,157,158</sup> Nach Stimulierung von GSK-3- $\beta$  durch Insulin oder andere Faktoren kommt es sehr schnell zu einer Inaktivierung der Kinase durch eine Phosphorylierung am Serin-Rest 9 (GSK3 $\beta$ [pS9]), beziehungsweise Aktivierung durch Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 216 (GSK3 $\beta$ [pY216]).<sup>122,159</sup>

Es ist bekannt, dass GSK-3- $\beta$  als Tumorsuppressor wirkt, indem es das Onkoprotein  $\beta$ -Catenin direkt phosphoryliert und so zum Abbau markiert. Jedoch gibt es auch neuere Erkenntnisse über eine Involvement von GSK-3- $\beta$  in der *NF $\kappa$ B*-induzierten Gentranskription. Dies würde bedeuten, dass eine Inaktivierung von GSK-3- $\beta$  eine

verminderte Zellproliferation zur Folge hat.<sup>120,151</sup> Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse mit einer signifikanten Inhibierung der A2780cis Zellen durch SB216763 unterstützen diese Theorie.

In Vorgängerstudien konnte in Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes eine gesteigerte Expression von GSK-3- $\beta$  mit einer erhöhten Phosphorylierung am Tyrosin 216 und eine damit einhergehende Aktivierung, jedoch eine verminderte Phosphorylierung am Serin 9 nachgewiesen werden. Auch in Glioblastom-Zellen konnte eine höhere Expression von GSK-3- $\beta$  im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe gezeigt werden.<sup>152</sup> Eine Inhibierung des GSK-3- $\beta$  führte in den Zellen zu einer abgeschwächten Viabilität und Proliferation, sowie einer gesteigerten Apoptose.<sup>152,160</sup> Entsprechende Ergebnisse wurden erstmals in dieser Studie an Ovarialkarzinomzellen dargestellt. Die durch den GSK-3- $\beta$ -Inhibitor SB216763 bewirkte Reduktion der Viabilität und Proliferation in den Ovarialkarzinomzellen bedeutet einen weiteren Schritt zum Verständnis der Platinresistenz und der Erarbeitung neuer Therapiemethoden.

Mittels des Tyrosinkinase-Inhibitors XAV939 konnte eine signifikante Verminderung der Zellviabilität gezeigt werden. Ursächlich dafür ist der durch XAV939 induzierte Abbau von  $\beta$ -Catenin durch eine Stabilisierung von Axin.<sup>116</sup> Dieses Ergebnis untermauert auch den von Li et al. beschriebenen Effekt von XAV939. Dort konnte die vermutlich vom Wnt-Signalweg verursachte Resistenz der Ovarialkarzinomzellen auf die Chemotherapie nach einer Therapie mit XAV939 teilweise inhibiert werden.<sup>117</sup> Ebenfalls bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die durch XAV939 verursachte erhöhte Apoptose-Rate in Kolonkarzinomzellen.<sup>118</sup>

Im Vergleich zu SB216763 und XAV939 zeigte das Triptolid bereits nach einer 48-stündigen Inkubation einen signifikant verminderten Zellmetabolismus. Ebenso fand sich in beiden Zelllinien eine signifikante Inhibierung der Proliferation. Dieses eindeutige Ergebnis unterstreicht die Bedeutung des Triptolid als mögliche zukünftige Therapieoption. Anzumerken ist hierbei, dass das Triptolid neben dem Wnt-Signalweg diverse andere Signalwege, wie den HSP70, *NF $\kappa$ B*, *HSP70*, *c-Myc*, *Zyklin D1* und *p53* beeinflusst.<sup>161</sup> Aufgrund dieser multiplen Einflüsse in die biochemischen Abläufe sind die genauen Auswirkungen auf die jeweiligen Signalwege schwer vorherzusagen.

Zur Gewinnung von weiteren Erkenntnissen der vielfältigen Rolle des Wnt-Signalweges wurde versucht die Lokalisation des  $\beta$ -Catenins nach Inkubation mit den



Wnt-Inhibitoren zu identifizieren. Es konnte dabei nach Inkubation mit SB216763 und XAV939 eine Verlagerung von  $\beta$ -Catenin vom Nukleus, in welchem sich das  $\beta$ -Catenin im aktivierten Wnt-Signalweg befindet, in die Membran dargestellt werden. Dies ist ein Zeichen für eine Inaktivierung des Wnt-Signalweg. Besonders in Hinblick auf nukleäres  $\beta$ -Catenin als Indikator für eine schlechtere Prognose ist die erwirkte Transition von  $\beta$ -Catenin bedeutungsvoll. Dies spricht für die Möglichkeit einer Re-Sensibilisierung der Tumorzellen auf eine erneute platinhaltige Chemotherapie.<sup>164,165</sup>

Die Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ist von sehr relevantem Interesse, da die Metastasierung ein großes therapeutisches Problem darstellt und ein Indikator für eine schlechte Prognose ist.<sup>162</sup> In dieser Arbeit konnte eine Inhibierung der Zellmigration nachgewiesen werden. SB216367 bewirkte eine signifikant reduzierte Migration der A2780 Zelllinie, das Triptolid beeinflusste dabei das Migrationsverhalten in beiden Zelllinien negativ.

Eine Schlüsselrolle für die Zellmigration ist die Epithelial-mesenchymale Transition, kurz EMT, bei der dem Wnt-Signalweg eine besondere Bedeutung zukommt. Die EMT beschreibt einen Prozess, in welchem sich Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften umwandeln. Die Epithelzellen verlieren dabei ihre Zellkontakte und die Ausrichtung der strengen baso-apikale Orientierung. Dadurch erlangen sie Plastizität, Kapazität zur Migration, Fähigkeit zum invasiven Wachstum, Stammzeleigenschaften und Resistenz auf Apoptose.<sup>156</sup> Grundsätzlich ist die EMT ein wichtiger Bestandteil der Zellbiologie und ein wichtiger biologischer Prozess für die Embryologie und den Prozess der Wundheilung. Aufgrund der Beteiligung an pathologischen Prozessen, wie der Metastasierung von Tumoren, ist die EMT ein interessanter und wichtiger Angriffspunkt in der Behandlung von epithelialen Malignomen.<sup>156</sup>

Die grundlegende Option einer Inhibierung der EMT in Ovarialkarzinomzellen durch den Wnt-Repressor Salinomycin konnte bereits gezeigt werden.<sup>163</sup> Jedoch sind entsprechende Versuche zur Inhibierung der Zellmigration durch Wnt-Inhibitoren zum derzeitigen Wissensstand erstmals an platinresistenten Zellen durchgeführt worden.

Aufgrund der starken Ergebnisse des Triptolid wurden Versuche zur exakten Darstellung der Auswirkung dieser Substanz auf die Apoptose vorgenommen. Dabei konnte sowohl in der immunzytochemischen M30-CytoDEATH-Färbung als auch im Cell Death Detection ELISA ein dosisabhängiger signifikanter Anstieg der in Apoptose befindlichen Zellen dargestellt werden. Ein Problem in der klinischen Anwendung des

Triptolid ist die schlechte Wasserlöslichkeit bei guter Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wodurch die klinische Anwendung deutlich eingeschränkt wird.<sup>166</sup>

In einer Phase-I-Studie von Kitzen et al., in welcher einer ein Derivat des Triptolid angewendet wurde, zeigten Tumorzellen eine Aktivierung der Apoptose. Jedoch fand sich eine hohe interindividuelle Variabilität im Triptolid-Plasmaspiegel und zwei letale Ereignisse mit einer erhöhten Caspase-3-Aktivität und gesteigerter Apoptose von Monozyten und Granulozyten. Während bei den restlichen Probanden die Toxizität kontrollierbar war, fand sich in den beiden letalen Fällen eine außergewöhnlich hohe Dosis des aktivierten Triptolid im Plasma. Herauszufinden, welche Esterase für die Umwandlung der Derivate in das Triptolid verantwortlich ist, könnte ermöglichen die Wirkungs-dosis und Toxizität zu steuern.<sup>167</sup>

Im Gegensatz dazu konnte das Minnelid, ein wasserlösliches Prodrug des Triptolid, in vivo in einer Studie von Rivard et al. ein vielversprechendes Ergebnis liefern. Darin konnte in Mäusen mit Ovarialkarzinomen nach einer Monotherapie mit dem Minnelid ein verlängertes Überleben beobachtet werden welches sich noch weiter verbesserte unter einer Kombinationstherapie mit Carboplatin.<sup>110</sup> In einem weiteren Mausmodell konnte durch eine Minnelid-Therapie eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums und der Tumorausbreitung sowie ein verbessertes Überleben gezeigt werden.<sup>166</sup> Bezüglich möglicher Nebenwirkungen wurde in Tiermodellen (Hunde und Mäuse) keine Kardio- oder Neurotoxizität beobachtet.<sup>167</sup>

Die Effektivität des Minnelid wird gerade in eine Phase-II-Studie an Patienten mit therapierefraktären Pankreaskarzinom evaluiert. Diese Studie könnte somit eine Aussage über die Sicherheit und Toleranz im menschlichen Körper liefern. Die Ergebnisse werden für 2026 erwartet.<sup>168</sup>

Es ist sicherlich zukünftig notwendig, eine systemische Evaluierung der Wirkung des Triptolid und seinen Derivaten, insbesondere dem Minnelid, in vivo weiter zu untersuchen, um eine reduzierte Zytotoxizität bei verbesserter Effektivität zu erreichen.<sup>169,170</sup> Obwohl das Triptolid in der klinischen Anwendung noch seinen Platz finden muss, ist es als Substrat zur Erforschung der Mechanismen des Wnt-Signalweges und dessen Effekt auf die Tumorprogression ein äußerst vielversprechendes Forschungsobjekt.

Die Wahl der A2780 Zelllinie stellt dabei eine mögliche Limitierung dieser Arbeit dar, da sie hauptsächlich den Typ des endometroiden Ovarialkarzinoms repräsentiert.

Dieser histologische Subtyp macht nur einen kleinen Teil der Tumore aus und ist nicht für alle histologischen Typen repräsentativ.<sup>171,172</sup> Die Zelllinie ist jedoch ein seit Jahren etabliertes Modell und durch die vorhandenen Klone als Pärchen, in platinsensibel und platinresistent, sehr gut für den Versuchsaufbau in dieser Arbeit geeignet. Es wurde angestrebt alle Versuche mit Triplikaten durchzuführen. Aus Kapazitätsgründen war dies jedoch nicht in allen funktionalen Tests möglich. Dies spiegelt sich wohl in den teilweise variierenden Signifikanzlevels wider.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der funktionalen Tests der drei getesteten Substanzen eine Reduktion in der metabolischen Aktivität in den platinsensitiven sowie platinresistenten Zellen. Es kann daher von einer therapeutischen Wirksamkeit der Substanzen auch auf die Zellen mit Resistenz auf eine platinbasierte Chemotherapie ausgegangen werden. Eine volle Re-Sensitivierung der Ovarialkarzinomzellen auf Platin konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Verlagerung von  $\beta$ -Catenin vom Nukleus in die Membran durch den GSK-3- $\beta$ -Inhibitor SB216763 und XAV939 zeigte den Einfluss des Wnt-Signalwegs und exponiert ihn als möglichen Angriffspunkt in der Tumorthapie. Das reduzierte Migrationsverhalten in beiden Zelllinien durch das Triptolid und durch SB216763 in den platinsensitiven A2780 Zellen stellen interessante Ausblicke dar in Sinner einer Eindämmung der Metastasierung des Karzinoms. Durch die Verringerung der Viabilität der platinresistenten Zellen durch die getesteten Substanzen könnte möglicherweise eine Kombination mit anderen Substanzklassen eine therapeutische Option darstellen. Zielgerichtete Substanzen wie der monoklonalen Antikörper Mirvetuximab, gegen den Folat-Rezeptor alpha, oder das antineoplastisch wirkende Immunkonjugat Trastuzumab-Deruxtecan, für Patientinnen mit HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) -Expression, lieferten bereits starke Effekte in der Therapie des rezidierten Ovarialkarzinoms.<sup>173,174</sup>

Die durch Wnt-Inhibitoren ermöglichte vielversprechende neue Perspektive der Therapie des platinresistenten Ovarialkarzinom-Rezidivs kann in dieser Studie bestätigt werden. Weitere Untersuchungen, speziell in vivo, sind zum Verständnis der Auswirkung des modulierten Signalweges und der Toxizität der Substanzen unabdinglich.<sup>10,102,105,110,111,150</sup>

## 6 Zusammenfassung

Die Entstehung einer Resistenz auf eine platinhaltige Chemotherapie ist eine der größten Herausforderungen in der Behandlung des Ovarialkarzinoms. Es gibt derzeit noch keine klinischen Behandlungsstrategien, die eine Re-Sensibilisierung platinresistenter Tumoren auf eine platinhaltige Chemotherapie ermöglichen. In dieser Arbeit wurde eine Manipulation des Wnt-Signalweges als therapeutische Option zur Überwindung der Resistenz untersucht. Dafür wurden drei, über unterschiedliche Angriffspunkte im Wnt-Signalweg eingreifende Inhibitoren ausgewählt. Die platinsensitiven Ovarialkarzinomzellen A2780 und deren platinresistenten A2780cis Zellklone wurden nach Inkubation mit den Substanzen SB216763, XAV939 und einem Triptolid verschiedenen funktionalen Tests unterzogen. Ebenfalls wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt.

Zur Evaluierung der Auswirkung der Substanzen auf die Zellviabilität und Proliferation wurden ein MTT- und BrdU-Assay durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine Verminderung des Metabolismus für alle drei Substanzen. Besonders effektiv stellte sich dies nach Inkubation der Zellen mit dem Triptolid dar, wo sich eine stark verringerte Proliferation beider Zelllinien im Vergleich mit den Kontrollen fand. In der  $\beta$ -Catenin-Färbung konnte eine signifikante Transition von  $\beta$ -Catenin vom Nukleus in die Membran dargestellt werden. Die deutlichste Transition zeigte sich nach Behandlung der platinresistenten A2780cis Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor XAV939. Das Apoptoseverhalten wurde mit einer M30 CytoDAETH-Färbung und einem Cell Death Detection-ELISA untersucht. Für das Triptolid ließ sich eine signifikante konzentrationsabhängige gesteigerte Apoptose nachweisen. Die Zellmigration, welche als Hinweis des Metastasierungspotenzials untersucht wurde, zeigte sich im Wound-Healing-Assay durch den GSK-3- $\beta$ -Inhibitor SB216763 in den platinsensitiven A2780 Zellen und in beiden Zelllinien durch das Triptolid eingeschränkt.

Auch wenn mit den Arbeiten der vorliegenden Promotion das Ziel einer vollständigen Re-Sensibilisierung von platinresistenten Ovarialkarzinomzellen auf eine platinhaltige Chemotherapie durch Wnt-Modulatoren nicht erreicht werden konnte, liefern die Ergebnisse Hinweise für eine mögliche Potenzierung der Wirkung einer platinhaltigen Chemotherapie. Damit konnte die Grundhypothese des Forschungsprojektes zwar

nicht direkt bestätigt werden, jedoch bieten die Erkenntnisse eine vielversprechende Perspektive für eine Verbesserung der Therapieoptionen in der Platinresistenz. Aufgrund der multiplen Nebenwirkungen der klassischen Chemotherapie ist die Erforschung neuer Substanzklassen mit molekularen Zielstrukturen zur Erhaltung der Lebensqualität der Patientinnen erstrebenswert. Eine Addition von SB216763 könnte in platinsensitiven Tumoren möglicherweise eine Reduktion der Metastasierung bewirken. In platinresistenten Zellen könnte die Verringerung der Viabilität durch die getesteten Substanzen eine therapeutische Option als Kombinationstherapie mit neuen zielgerichteten Substanzklassen wie den Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) darstellen.

Zur sicheren klinischen Anwendung sind zukünftig noch weitere Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen einer Wnt-Modulation *in vivo* sowie der Toxizität der Substanzen in der erforderlich.

## 7 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Udo Jeschke danke ich für die Möglichkeit dieses ausgesprochen interessanten Themas zu erforschen und die guten Konversationen. Bei Herrn Prof. Dr. med. Fabian Trillsch möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und die hilfreichen Anmerkungen vor allem in der Ausarbeitung der schriftlichen Arbeit herzlich bedanken. Dass ihr mich nach den vielen Jahren noch unterstützt, rechne ich euch Hoch an.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Martina Rahmeh für die Einarbeitung im Labor, die guten Ratschläge und der vielen interessanten Gespräche, sowie allen Labormitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema und die experimentelle Arbeit im Labor mit Freude bearbeiten konnte.

Gabriel und Verena möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Für die dauerhafte Unterstützung in jedweder Hinsicht gilt meinen Eltern ein besonderer Dank. Meinem Bruder Alexander möchte ich für die ständige Ermutigung und das Anspornen zum Erweitern meines Horizontes von Herzen danken. Meinem Freund Max danke ich für sein Verständnis und seine Unterstützung.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *The Lancet*. 2014;384(9951):1376-1388.
2. Huang M-L, Ren J, Jin Z-Y, et al. A systematic review and meta-analysis of CT and MRI radiomics in ovarian cancer: methodological issues and clinical utility. *Insights into Imaging*. 2023;14(1):1-19.
3. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017;14(1):9-32.
4. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2011/2012 AcA, 18]; Available from.
5. International Agency for Research on Cancer (2020) World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention, Lyon, pp 411–420
6. Banerjee T, Aggarwal M, Sommers JA, Brosh RM. Biochemical and cell biological assays to identify and characterize DNA helicase inhibitors. *Methods*. 2016;108:130-141.
7. Ataseven B, Chiva LM, Harter P, Gonzalez-Martin A, du Bois A. FIGO stage IV epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer revisited. *Gynecologic oncology*. 2016;142(3):597-607.
8. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines (Basel)*. 2018;5(1):16.
9. Chen T, Jansen L, Gondos A, et al. Survival of ovarian cancer patients in Germany in the early 21st century: a period analysis by age, histology, laterality, and stage. *European Journal of Cancer Prevention*. 2013;22(1).
10. Conic I, Dimov I, Tasic-Dimov D, Djordjevic B, Stefanovic V. Ovarian epithelial cancer stem cells. *TheScientificWorldJOURNAL*. 2011;11:1243-1269.
11. Burges A, Schmalfeldt B. Diagnostik und Therapie.
12. Bankhead C, Collins C, Stokes-Lampard H, et al. Identifying symptoms of ovarian cancer: a qualitative and quantitative study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2008;115(8):1008-1014.
13. Buys SS, Partridge E, Black A, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *Jama*. 2011;305(22):2295-2303.
14. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10022):945-956.
15. (DGfG) DGfGuG. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.1, 2022, AWMF-Registernummer: 032/035OL 2019; <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>. Accessed 04.05.2024, 2024.
16. Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*. 2009;115(6):1234-1244.
17. Hauke J, Hahnen E, Schneider S, et al. Deleterious somatic variants in 473 consecutive individuals with ovarian cancer: results of the observational AGO-TR1 study (NCT02222883). *Journal of Medical Genetics*. 2019;56(9):574-580.

18. Harter P, Hauke J, Heitz F, et al. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS one*. 2017;12(10):e0186043.
19. Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(2):80-87.
20. Menon U, Karpinskyj C, Gentry-Maharaj A. Ovarian cancer prevention and screening. *Obstetrics & Gynecology*. 2018;131(5):909-927.
21. Rice MS, Murphy MA, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy and ovarian cancer: a meta-analysis. *Journal of ovarian research*. 2012;5(1):1-16.
22. Kurman RJ, Shih I-M. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(3):433.
23. Cancer CGoESoO. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. *The Lancet*. 2008;371(9609):303-314.
24. Iodice S, Barile M, Rotmensz N, et al. Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis. *European journal of cancer*. 2010;46(12):2275-2284.
25. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983;71(4):717-721.
26. Gong T-T, Wu Q-J, Vogtmann E, Lin B, Wang Y-L. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2013;132(12):2894-2900.
27. Cetin I, Cozzi V, Antonazzo P. Infertility as a cancer risk factor—a review. *Placenta*. 2008;29:169-177.
28. Li D-P, Du C, Zhang Z-M, et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(12):4829-4837.
29. Cancer CGoESoO. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *The Lancet*. 2015;385(9980):1835-1842.
30. Danforth K, Tworoger S, Hecht J, Rosner B, Colditz G, Hankinson S. A prospective study of postmenopausal hormone use and ovarian cancer risk. *British journal of cancer*. 2007;96(1):151-156.
31. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Modern Pathology*. 2005;18(2):S19-S32.
32. Ness RB, Cotteau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(17):1459-1467.
33. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer*. 2007;43(4):690-709.
34. Cancer CGoESoO. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *The lancet oncology*. 2012;13(9):946-956.
35. Reid A, de Klerk N, Musk AWB. Does exposure to asbestos cause ovarian cancer? A systematic literature review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2011;20(7):1287-1295.
36. Yarmolinsky J, Relton CL, Lophatananon A, et al. Appraising the role of previously reported risk factors in epithelial ovarian cancer risk: A Mendelian randomization analysis. *PLoS Med*. 2019;16(8):e1002893-e1002893.
37. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, et al. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2003;97(S10):2631-2642.
38. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv*. 2012;460(3):237-249.



39. Kurman RJ, Shih I-M. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *The American journal of pathology*. 2016;186(4):733-747.
40. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology*. 2004;164(5):1511-1518.
41. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37-40.
42. Reichenbach J, Schmoeckel E, Mahner S, Trillsch F. Diagnostic workup for endometrioid borderline ovarian tumors (eBOT) requires histopathological evaluation of the uterus. *Journal of Ovarian Research*. 2021;14(1):89.
43. Trillsch F, Mahner S, Vettorazzi E, et al. Surgical staging and prognosis in serous borderline ovarian tumours (BOT): A subanalysis of the AGO ROBOT study. *British Journal of Cancer*. 2015;112(4):660-666.
44. Trillsch F, Mahner S, Woelber L, et al. Age-dependent differences in borderline ovarian tumours (BOT) regarding clinical characteristics and outcome: results from a sub-analysis of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) ROBOT study. *Annals of Oncology*. 2014;25(7):1320-1327.
45. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl\_10):x16-x21.
46. Piek JM, Verheijen RH, Kenemans P, Massuger LF, Bulten H, Van Diest PJ. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecologic oncology*. 2003;90(2):491.
47. Kuhn E, Kurman RJ, Vang R, et al. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma—evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *The Journal of pathology*. 2012;226(3):421-426.
48. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(3):165-167.
49. Prat J, Oncology FCoG. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2014;124(1):1-5.
50. Wimberger P, Pfisterer J, du Bois A, et al. Quality of therapy in early ovarian cancer: results of the quality assurance program of the AGO Study Group. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2023;33(7).
51. Harter P, Pfisterer J, Hilpert F, et al. Therapiequalität des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms in Deutschland. *Frauenarzt*. 2020;61(3):182-188.
52. Mahner S, Harter P, Du Bois A, et al. Treatment and outcome of patients with high-grade advanced ovarian cancer (AOC): Real-world data in Germany (QS Ovar of the AGO Study Group). In: American Society of Clinical Oncology; 2022.
53. Trimbos B, Timmers P, Pecorelli S, et al. Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(13):982-987.
54. Fruscio R, Ceppi L, Corso S, et al. Long-term results of fertility-sparing treatment compared with standard radical surgery for early-stage epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 2016;115(6):641-648.
55. Harter P, Sehoul J, Lorusso D, et al. LION: Lymphadenectomy in ovarian neoplasms—A prospective randomized AGO study group led gynecologic cancer intergroup trial. In: American Society of Clinical Oncology; 2017.
56. Ataseven B, Grimm C, Harter P, et al. Prognostic impact of debulking surgery and residual tumor in patients with epithelial ovarian cancer FIGO stage IV. *Gynecol Oncol*. 2016;140(2):215-220.
57. Horowitz NS, Miller A, Rungruang B, et al. Does aggressive surgery improve outcomes? Interaction between preoperative disease burden and complex surgery in patients with advanced-stage ovarian cancer: an analysis of GOG 182. *J Clin Oncol*. 2015;33(8):937-943.

58. Chang SJ, Hodeib M, Chang J, Bristow RE. Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2013;130(3):493-498.
59. Collinson F, Qian W, Fossati R, et al. Optimal treatment of early-stage ovarian cancer. *Annals of oncology*. 2014;25(6):1165-1171.
60. Du Bois A, Lück H-J, Meier W, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(17):1320-1329.
61. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, et al. Phase III randomized trial of docetaxel–carboplatin versus paclitaxel–carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(22):1682-1691.
62. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(26):2484-2496.
63. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(26):2473-2483.
64. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(26):2495-2505.
65. DiSilvestro P, Banerjee S, Colombo N, et al. Overall Survival With Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients With Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial. *J Clin Oncol*. 2023;41(3):609-617.
66. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;381(25):2416-2428.
67. du Bois A, Kristensen G, Ray-Coquard I, et al. Standard first-line chemotherapy with or without nintedanib for advanced ovarian cancer (AGO-OVAR 12): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(1):78-89.
68. Du Bois A, Floquet A, Kim J-W, et al. Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer. *Journal of clinical oncology*. 2014;32(30):3374-3382.
69. Vergote I, Coens C, Nankivell M, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. *The Lancet Oncology*. 2018;19(12):1680-1687.
70. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2015;386(9990):249-257.
71. Vergote I, Tropé CG, Amant F, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(10):943-953.
72. Reuss A, Du Bois A, Harter P, et al. TRUST: Trial of Radical Upfront Surgical Therapy in advanced ovarian cancer (ENGOT ov33/AGO-OVAR OP7). *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2019;29(8).
73. Zeimet AG, Marth C. Intraperitoneale Chemotherapie in der Behandlung des Ovarial- und Tubenkarzinoms. In: *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Springer; 2019:131-140.
74. Wenzel LB, Huang HQ, Armstrong DK, Walker JL, Cella D. Health-related quality of life during and after intraperitoneal versus intravenous chemotherapy for optimally debulked ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(4):437-443.
75. Monk B, Chan J. Is intraperitoneal chemotherapy still an acceptable option in primary adjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer? *Annals of Oncology*. 2017;28(suppl\_8):viii40-viii45.

76. Walker J, Brady M, DiSilvestro P, et al. A phase III trial of bevacizumab with IV versus IP chemotherapy for ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma: an NRG Oncology Study. *Gynecologic Oncology*. 2016;141:208.
77. Harter P, Du Bois A, Mahner S, et al. Statement of the AGO Kommission Ovar, AGO Study Group, NOGGO, AGO Austria and AGO Switzerland regarding the use of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2016;76(02):147-149.
78. Pignata S, C Cecere S, Du Bois A, Harter P, Heitz F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28:viii51-viii56.
79. Eisenhauer E, Vermorken J, Van Glabbeke M. Predictors of response to subsequent chemotherapy in platinum pretreated ovarian cancer: a multivariate analysis of 704 patients. *Annals of oncology*. 1997;8(10):963-968.
80. Hilpert F, Harter P, Rochon J, et al. Experiences from the German quality assurance program QS OVAR in partially platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Cancer Breaking News*. 2015;3(1):31-37.
81. Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol*. 1991;9(3):389-393.
82. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *The lancet*. 2009;374(9698):1371-1382.
83. Harter P, Sehouli J, Vergote I, et al. Randomized trial of cytoreductive surgery for relapsed ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(23):2123-2131.
84. Harter P, Sehouli J, Reuss A, et al. Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2011;21(2).
85. Harter P, Beutel B, Alesina PF, et al. Prognostic and predictive value of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) score in surgery for recurrent ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2014;132(3):537-541.
86. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2039-2045.
87. Pignata S, Lorusso D, Joly F, et al. Carboplatin-based doublet plus bevacizumab beyond progression versus carboplatin-based doublet alone in patients with platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(2):267-276.
88. Poveda A, Floquet A, Ledermann JA, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(5):620-631.
89. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: the AURELIA open-label randomized phase III trial. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2014;69(7):402-404.
90. Cooke SL, Brenton JD. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer. *The lancet oncology*. 2011;12(12):1169-1174.
91. Trillsch F, Mahner S, Hilpert F, et al. Prognostic and predictive effects of primary versus secondary platinum resistance for bevacizumab treatment for platinum-resistant ovarian cancer in the AURELIA trial. *Annals of Oncology*. 2016;27(9):1733-1739.
92. Penson R, Valencia RV, Colombo N, et al. Final overall survival results from SOLO3: Phase III trial assessing olaparib monotherapy versus non-platinum chemotherapy in heavily pretreated patients with germline BRCA1-and/or BRCA2-mutated platinum-sensitive relapsed ovarian cancer (026). *Gynecologic Oncology*. 2022;166:S19-S20.

93. Lindemann K, Gibbs E, Åvall-Lundqvist E, et al. Chemotherapy vs tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomised, multicentre trial (Ovaresist). *British journal of cancer*. 2017;116(4):455-463.
94. du Bois A, Meier W, Lück H, et al. Chemotherapy versus hormonal treatment in platinum-and paclitaxel-refractory ovarian cancer: a randomised trial of the German Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) Study Group Ovarian Cancer. *Annals of oncology*. 2002;13(2):251-257.
95. Gershenson DM, Bodurka DC, Coleman RL, Lu KH, Malpica A, Sun CC. Hormonal maintenance therapy for women with low-grade serous cancer of the ovary or peritoneum. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(10):1103.
96. Brown AP, Jhingran A, Klopp AH, Schmeler KM, Ramirez PT, Eifel PJ. Involved-field radiation therapy for locoregionally recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2013;130(2):300-305.
97. Albuquerque K, Patel M, Liotta M, et al. Long-term benefit of tumor volume-directed involved field radiation therapy in the management of recurrent ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2016;26(4).
98. Gershenson DM, Miller A, Brady WE, et al. Trametinib versus standard of care in patients with recurrent low-grade serous ovarian cancer (GOG 281/LOGS): an international, randomised, open-label, multicentre, phase 2/3 trial. *The Lancet*. 2022;399(10324):541-553.
99. Rustin G. Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer has major implications for treatment outcome and trial performances and should not be routinely performed. *Annals of Oncology*. 2011;22:viii45-viii48.
100. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*. 2007;33(1):9-23.
101. Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-480.
102. Barghout SH, Zepeda N, Xu Z, Steed H, Lee C-H, Fu Y. Elevated  $\beta$ -catenin activity contributes to carboplatin resistance in A2780cp ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;468(1):173-178.
103. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-999.
104. Shang S, Hua F, Hu Z-W. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*. 2017;8(20):33972.
105. Nagaraj AB, Joseph P, Kovalenko O, et al. Critical role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget*. 2015;6(27):23720.
106. Kim H, Wu R, Cho KR, et al. Comparative proteomic analysis of low stage and high stage endometrioid ovarian adenocarcinomas. *PROTEOMICS—Clinical Applications*. 2008;2(4):571-584.
107. Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, Peng C. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of ovarian research*. 2019;12(1):1-17.
108. Gatliffe T, Monk B, Planutis K, Holcombe R. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2008;18(5).
109. McMellen A, Woodruff ER, Corr BR, Bitler BG, Moroney MR. Wnt Signaling in Gynecologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4272.
110. Rivard C, Geller M, Schnettler E, et al. Inhibition of epithelial ovarian cancer by Minnelide, a water-soluble pro-drug. *Gynecologic Oncology*. 2014;135(2):318-324.
111. Boone JD, Arend RC, Johnston BE, et al. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in primary ovarian cancer with the porcupine inhibitor WNT974. *Laboratory Investigation*. 2016;96(2):249-259.
112. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn JM, Buchsbaum DJ. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecologic Oncology*. 2013;131(3):772-779.
113. Morris S-AL, Huang S. Crosstalk of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway with other pathways in cancer cells. *Genes & Diseases*. 2016;3(1):41-47.

114. Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, Bialasek M, Krol M. Wnt signaling pathway in development and cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2018;69(2):185-196.
115. Ford CE, Henry C, Llamas E, Djordjevic A, Hacker N. Wnt signalling in gynaecological cancers: A future target for personalised medicine? *Gynecologic Oncology*. 2016;140(2):345-351.
116. Huang SM, Mishina YM, Liu S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009;461(7264):614-620.
117. Li J, Yang S, Su N, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR leads to chemoresistance by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human ovarian cancer. *Tumor Biology*. 2016;37(2):2057-2065.
118. Wu X, Luo F, Li J, Zhong X, Liu K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *International journal of oncology*. 2016;48(4):1333-1340.
119. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science*. 2003;116(7):1175-1186.
120. Cao Q, Lu X, Feng Y-J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell research*. 2006;16(7):671.
121. Schulz L, Pries R, Lanka AS, Drenckhan M, Rades D, Wollenberg B. Inhibition of GSK3 $\alpha/\beta$  impairs the progression of HNSCC. *Oncotarget*. 2018;9(45):27630.
122. Domoto T, Pyko IV, Furuta T, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer science*. 2016;107(10):1363-1372.
123. Li X-J, Jiang Z-Z, Zhang L-y. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;155(1):67-79.
124. Ziaei S, Halaby R. Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: A mini review. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2016;6(2):149.
125. Bao S, Yi M, Xiang B, Chen P. Antitumor mechanisms and future clinical applications of the natural product triptolide. *Cancer Cell International*. 2024;24(1):150.
126. Shao H, Ma J, Guo T, Hu R. Triptolide induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism associated with the Wnt/?? catenin signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(2):505-508.
127. Zhao H, Yang Z, Wang X, et al. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. *Experimental & molecular medicine*. 2012;44(11):633.
128. Reno TA, Tong S-W, Wu J, et al. The triptolide derivative MRx102 inhibits Wnt pathway activation and has potent anti-tumor effects in lung cancer. *BMC cancer*. 2016;16(1):439.
129. Yang S, Chen J, Guo Z, et al. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors1. *Molecular cancer therapeutics*. 2003;2(1):65-72.
130. Li X, Lu Q, Xie W, Wang Y, Wang G. Anti-tumor effects of triptolide on angiogenesis and cell apoptosis in osteosarcoma cells by inducing autophagy via repressing Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;496(2):443-449.
131. Bohrens BC, Hamilton TC, Masuda H, et al. Characterization of ac/s-Diamrinedichloroplatinum (II)-resistant Human Ovarian Cancer Cell Line and Its Use in Evaluation of Platinum Analogues1. *CANCER RESEARCH*. 1987;47:418.
132. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
133. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. *Cell viability assays*. Bethesda (MD), USA: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016.
134. Van Diest PJ, Brugal G, Baak J. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of clinical pathology*. 1998;51(10):716.
135. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2004;15(9):1319-1329.

136. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. Paper presented at: Proc West Pharmacol Soc2011.
137. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2012;12(9):12347-12360.
138. Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration*. 2014;8(5):440-451.
139. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329.
140. Hulkower KI, Herber RL. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*. 2011;3(1):107.
141. Farahmand L, Darvishi B, Majidzadeh AK, Madjid Ansari A. Naturally occurring compounds acting as potent anti-metastatic agents and their suppressing effects on Hedgehog and WNT/beta-catenin signalling pathways. *Cell proliferation*. 2017;50(1).
142. Ascione F, Caserta S, Guido S. The wound healing assay revisited: A transport phenomena approach. *Chemical Engineering Science*. 2017;160:200-209.
143. Anantharam V, Kitazawa M, Wagner J, Kaul S, Kanthasamy AG. Caspase-3-Dependent Proteolytic Cleavage of Protein Kinase C $\delta$  Is Essential for Oxidative Stress-Mediated Dopaminergic Cell Death after Exposure to Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(5):1738.
144. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(16):7162-7166.
145. WANG G, LI X, HUANG F, et al. Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *Cellular and molecular life sciences*. 2005;62(7-8):881-893.
146. Ramiro-Ibáñez F, Ortega A, Escribano JM, Alonso C. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *Journal of general virology*. 1996;77(9):2209-2219.
147. Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schitteck B, et al. Combined Inhibition of MAPK and mTOR Signaling Inhibits Growth, Induces Cell Death, and Abrogates Invasive Growth of Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(8):2013-2023.
148. Kaltofen T, Preinfalk V, Schwertler S, et al. Potential of platinum-resensitization by Wnt signaling modulators as treatment approach for epithelial ovarian cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2020;146(10):2559-2574.
149. Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal*. 1993;12(2):803-808.
150. Westfall SD, Nilsson EE, Skinner MK. Role of triptolide as an adjunct chemotherapy for ovarian cancer. *Chemotherapy*. 2008;54(1):67-76.
151. Patel S, Woodgett J. Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop? *Cancer cell*. 2008;14(5):351-353.
152. Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, et al. Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition against human glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(3):887-897.
153. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  participates in nuclear factor  $\kappa$ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer research*. 2005;65(6):2076-2081.
154. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *British journal of cancer*. 2019;120(1):45-53.
155. Fridman W, Remark R, Goc J, et al. The immune microenvironment: a major player in human cancers. *International archives of allergy and immunology*. 2014;164(1):13-26.

156. Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 2012;3(2):117.
157. EMBI N, RYLATT DB, COHEN P. Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*. 1980;107(2):519-527.
158. HEMMINGS BA, YELLOWLEES D, C. KERNOHAN J, COHEN P. Purification of Glycogen Synthase Kinase 3 from Rabbit Skeletal Muscle. Copurification with the Activating Factor (FA) of the (Mg-ATP) Dependent Protein Phosphatase. *European Journal of Biochemistry*. 1981;119(3):443-451.
159. Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(7):2099-2110.
160. Mai W, Kawakami K, Shakoori A, et al. Deregulated GSK3 $\beta$  sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(22):6810-6819.
161. Nardi I, Reno T, Yun X, et al. Triptolide inhibits Wnt signaling in NSCLC through upregulation of multiple Wnt inhibitory factors via epigenetic modifications to Histone H3. *Int J Cancer*. 2018;143(10):2470-2478.
162. Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013;752(1):10-24.
163. Li R, Dong T, Hu C, Lu J, Dai J, Liu P. Salinomycin repressed the epithelial–mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells via downregulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:1317.
164. Saegusa M, Okayasu I. Frequent nuclear  $\beta$ -catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2001;194(1):59-67.
165. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Lopes CS. Loss of  $\beta$ -catenin is associated with poor survival in ovarian carcinomas. *International journal of gynecological pathology*. 2004;23(4):337-346.
166. Chugh R, Sangwan V, Patil SP, et al. A preclinical evaluation of Minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer. *Science translational medicine*. 2012;4(156):156ra139-156ra139.
167. Kitzen J, De Jonge M, Lamers C, et al. Phase I dose-escalation study of F60008, a novel apoptosis inducer, in patients with advanced solid tumours. *European journal of cancer*. 2009;45(10):1764-1772.
168. Skorupan N, Ahmad MI, Steinberg SM, et al. A phase II trial of the super-enhancer inhibitor Minnelide™ in advanced refractory adenosquamous carcinoma of the pancreas. *Future Oncology*. 2022;18(20):2475-2481.
169. Chen S-R, Dai Y, Zhao J, Lin L, Wang Y, Wang Y. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:104.
170. Noel P, Von Hoff DD, Saluja AK, Velagapudi M, Borazanci E, Han H. Triptolide and its derivatives as cancer therapies. *Trends in pharmacological sciences*. 2019;40(5):327-341.
171. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008;5(12):e232.
172. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PloS one*. 2013;8(9):e72162.
173. Moore KN, Angelergues A, Konecny GE, et al. Phase III MIRASOL (GOG 3045/ENGOT-Ov55) study: mirvetuximab soravtansine vs. investigator's choice of chemotherapy in platinum-resistant, advanced high-grade epithelial ovarian, primary peritoneal or fallopian tube cancers with high folate receptor-alpha (FR $\alpha$ ) expression. *J Clin Oncol*. 2023;41:abstrLBA5507.

174. Meric-Bernstam F, Makker V, Oaknin A, et al. Efficacy and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-expressing solid tumors: primary results from the DESTINY-PanTumor02 phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42(1):47.



## 9 Anhang

### Ergebnisse des Zellviabilitäts-Testes (MTT) und des

Es folgen die Ergebnisse des MTT-Assays ausgewertet anhand einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche:

#### A2780

<b>SB216763</b>	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,2% DMSO
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,3768	0,1429 bis 0,6107	0,0008	Ja	77
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,4202	0,1863 bis 0,6541	0,0002	Ja	73
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,3453	0,1114 bis 0,5792	0,0021	Ja	78
<b>100 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,3930	0,1591 bis 0,6269	0,0005	Ja	74

**Tabelle 15: Ergebnisse von SB216763 im MTT-Test der A2780 Zellen**

<b>XAV939</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,5% DMSO
<b>6,25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,1348	-0,2191 bis 0,4887	0,7342	Nein	94
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,2296	-0,1244 bis 0,5835	0,3002	Nein	87
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,1319	-0,2220 bis 0,4858	0,7480	Nein	95
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,5361	0,1822 bis 0,8900	0,0016	Ja	66

**Tabelle 16: Ergebnisse von XAV939 im MTT-Test der A2780 Zellen**

<b>Triptolid</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,7816	0,6325 bis 0,9306	<0,0001	Ja	50
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,225	1,076 bis 1,374	<0,0001	Ja	23
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,412	1,263 bis 1,561	<0,0001	Ja	12

<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,521	1,372 bis 1,670	<0,0001	Ja	5
---------------------------------------	-------	-----------------	---------	----	---

**Tabelle 17: Ergebnisse des Triptolides im MTT-Test der A2780 Zellen**

### A2780cis

<b>SB216763</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,2% DMSO
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	-0,02733	-0,3392 bis 0,2845	0,9981	Nein	104
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,1047	-0,2072 bis 0,4165	0,8079	Nein	87
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,1810	-0,1308 bis 0,4928	0,3948	Nein	76
<b>100 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,2310	-0,08083 bis 0,5428	0,1989	Nein	69

**Tabelle 18 Ergebnisse von SB216763 im MTT-Test der A2780cis Zellen**

<b>XAV939</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,5% DMSO
<b>6,25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,1033	-0,5312 bis 0,3245	0,9281	Nein	111
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,03233	-0,4602 bis 0,3955	0,9989	Nein	100
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5%DMSO	-0,1102	-0,5381 bis 0,3176	0,9117	Nein	112
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,2316	-0,1963 bis 0,6594	0,4561	Nein	69

**Tabelle 19: Ergebnisse von XAV939 im MTT-Test der A2780 Zellen**

<b>Triptolid</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,2461	0,03329 bis 0,4589	0,0190	Ja	73
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,5108	0,2980 bis 0,7236	<0,0001	Ja	45
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,7478	0,5350 bis 0,9606	<0,0001	Ja	19
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,8452	0,6324 bis 1,058	<0,0001	Ja	7

**Tabelle 20: Ergebnisse des Triptolides im MTT-Test der A2780 Zellen**

### **Ergebnisse des Zellproliferations-Testes (BrdU)**

Es folgen die Ergebnisse des BrdU-Assays, nach Analyse anhand einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche:

### **A2780**

<b>SB216763</b>	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,2% DMSO
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,2078	-0,3386 bis 0,7542	0,7352	Nein	91
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,1490	-0,3974 bis 0,6954	0,8947	Nein	94
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,2529	-0,2935 bis 0,7993	0,5899	Nein	90
<b>100 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,1187	-0,4278 bis 0,6651	0,9494	Nein	95

**Tabelle 21: Ergebnisse von SB216763 im BrdU-Test der A2780 Zellen**

<b>XAV939</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,5% DMSO
<b>6,25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,01133	-0,5385 bis 0,5612	>0,9999	Nein	99
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,008333	-0,5582 bis 0,5415	>0,9999	Nein	100
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5%DMSO	0,02489	-0,5250 bis 0,5748	0,9998	Nein	98
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	0,1358	-0,4141 bis 0,6857	0,9228	Nein	94

**Tabelle 22: Ergebnisse von XAV939 im BrdU-Test der A2780 Zellen**

<b>Triptolid</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	0,6214	0,1233 bis 1,120	0,0104	Ja	75
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,289	0,7906 bis 1,787	<0,0001	Ja	47
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,583	1,085 bis 2,081	<0,0001	Ja	36
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	2,076	1,578 bis 2,574	<0,0001	Ja	17

**Tabelle 23: Ergebnisse des Triptolide im BrdU-Test der A2780 Zellen**

### **A2780cis**

<b>SB216763</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die
-----------------	--------------------	-----------	------------------	-------------	-------------------

					Kontrolle mit 0,2% DMSO
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,04111	-0,2491 bis 0,3313	0,9889	Nein	96
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,3200	0,02983 bis 0,6102	0,0267	Ja	87
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2%DMSO	0,4887	0,1985 bis 0,7788	0,0004	Ja	81
<b>100 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	0,3636	0,07339 bis 0,6537	0,0100	Ja	86

**Tabelle 24: Ergebnisse von SB216763 im BrdU-Test der A2780cis Zellen**

<b>XAV939</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle mit 0,5% DMSO
<b>6,25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,2701	-0,5506 bis 0,01033	0,0619	Nein	110
<b>12,5 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,3583	-0,6388 bis - 0,07789	0,0084	Ja	112
<b>25 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5%DMSO	-0,3240	-0,6044 bis - 0,04356	0,0191	Ja	116
<b>50 µM</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	-0,1028	-0,3832 bis 0,1777	0,7584	Nein	104

**Tabelle 25: Ergebnisse von XAV939 im BrdU-Test der A2780cis Zellen**

<b>Triptolid</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant	% bezogen auf die Kontrolle ohne DMSO
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,548	1,389 bis 1,706	<0,0001	Ja	49
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	1,869	1,710 bis 2,027	<0,0001	Ja	25
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	2,075	1,916 bis 2,233	<0,0001	Ja	18
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	2,142	1,983 bis 2,300	<0,0001	Ja	9

**Tabelle 26: Ergebnisse des Triptolides im BrdU-Test der A2780cis Zellen**

## Ergebnis des Zellmigrations-Assays

Folgend werden die Ergebnisse, nach Auswertung anhand einer zweifaktoriellen ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, präsentiert:

### A2780

<b>100 µM SB216763</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	160800	1927 bis 319674	0,0467	Ja
24 h	-151890	-310764 bis 6983	0,0641	Nein
48 h	-332271	-491144 bis -173398	<0,0001	Ja
72 h	-396228	-555101 bis -237355	<0,0001	Ja

**Tabelle 27: Ergebnisse von SB216763 im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen**

<b>50 µM XAV939</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	-57928	-272232 bis 156375	0,9147	Nein
24 h	-39429	-253732 bis 174874	0,9776	Nein
48 h	-77685	-291989 bis 136618	0,7919	Nein
72 h	-155815	-370119 bis 58488	0,2138	Nein

**Tabelle 28: Ergebnisse von XAV939 im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen**

<b>50 nM Triptolid</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	54401	-42074 bis 150875	0,4361	Nein
24 h	34213	-62261 bis 130688	0,8043	Nein
48 h	-154105	-250579 bis -57630	0,0015	Ja
72 h	-250032	-346507 bis -153558	<0,0001	Ja

**Tabelle 29: Ergebnisse des Triptolid im Zellmigrations-Assay der A2780 Zellen**

### **A2780cis**

<b>100 µM SB216763</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	48181	-214773 bis 311136	0,9779	Nein
24 h	82597	-180357 bis 345552	0,8629	Nein
48 h	-114222	-377177 bis 148732	0,6680	Nein
72 h	-161475	-424430 bis 101479	0,3566	Nein

**Tabelle 30: Ergebnisse von SB216763 im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen**

<b>50 <math>\mu</math>M XAV939</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	-45721	-271104 bis 179661	0,9681	Nein
24 h	146920	-78463 bis 372302	0,3030	Nein
48 h	-21121	-246504 bis 204261	0,9983	Nein
72 h	-9565	-234947 bis 215818	>0,9999	Nein

**Tabelle 31: Ergebnisse von XAV939 im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen**

<b>50 nM Triptolid</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
0 h	15248	-180259 bis 210755	0,9992	Nein
24 h	36772	-158735 bis 232279	0,9757	Nein
48 h	-169240	-364747 bis 26268	0,1052	Nein
72 h	-223791	-419298 bis -28283	0,0217	Ja

**Tabelle 32: Ergebnisse des Triptolid im Zellmigrations-Assay der A2780cis Zellen**

## Ergebnis der Immunzytologischen $\beta$ -Catenin- und GSK-3- $\beta$ -Färbungen

Nachfolgend sind die Ergebnisse, ausgewertet mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit Sidak's Post-hoc-Test für multiple Vergleiche, anhand der Prozentzahl der Zellen mit nukleärer Lokalisation des  $\beta$ -Catenin dargestellt (n = 3).

### A2780

<b>100 <math>\mu</math>M SB216763</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
Zellkern	53,83	43,23 bis 64,43	<0,0001	Ja
Membran	-53,83	-64,43 bis -43,23	<0,0001	Ja

**Tabelle 33: Ergebnisse von SB216763 in der  $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780 Zellen**

<b>50 <math>\mu</math>M XAV939</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
Zellkern	59,33	42,08 bis 76,59	<0,0001	Ja
Membran	-59,00	-76,25 bis -41,75	<0,0001	Ja

**Tabelle 34: Ergebnisse von XAV939 in der  $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780 Zellen**

### A2780cis

<b>100 <math>\mu</math>M SB216763</b> vs. Kontrollen mit 0,2% DMSO	Mittlere Differenz	95% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
Zellkern	57,33	11,48 bis 103,2	0,0178	Ja
Membran	-57,33	-103,2 bis -11,48	0,0178	Ja

**Tabelle 35: Ergebnisse von SB216763 in der  $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780cis Zellen**

<b>50 <math>\mu</math>M XAV939</b> vs. Kontrollen mit 0,5% DMSO	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
Zellkern	74,00	56,10 bis 91,90	<0,0001	Ja
Membran:	-74,00	-91,90 bis -56,10	<0,0001	Ja

**Tabelle 36: Ergebnisse von XAV939 in der  $\beta$ -Catenin-Färbung der A2780cis Zellen**

## **Ergebnisse des Cell Death Detection ELISA und der**

Erneut werden die Ergebnisse nach Auswertung mittels einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche präsentiert:

### A2780

<b>Triptolid</b>	Mittlere Differenz	95,00% KI	P-Wert angepasst	Signifikant
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,06650	-0,2046 bis 0,07165	0,5413	Nein
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,07433	-0,2125 bis 0,06382	0,4459	Nein
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,1293	-0,2675 bis 0,008816	0,0711	nein
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-3,378	-3,523 bis -3,233	<0,0001	Ja

**Tabelle 37: Ergebnisse des Triptolid in dem Cell Death Detection ELISA der A2780 Zellen**

**A2780cis**

<b>Triptolid</b>	<b>Mittlere Differenz</b>	<b>95,00% KI</b>	<b>P-Wert angepasst</b>	<b>Signifikant</b>
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,1070	-0,2910 bis 0,07703	0,3793	Nein
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,2260	-0,4100 bis -0,04197	0,0130	Ja
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,6293	-0,8134 bis -0,4453	<0,0001	Ja
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-2,887	-3,080 bis -2,694	<0,0001	Ja

**Tabelle 38: Ergebnisse des Triptolid in dem Cell Death Detection ELISA der A2780cis Zellen**

**Ergebnisse der M30-CytoDEATH-Färbung**

Es folgt die Darstellung der Ergebnisse, analysiert anhand einer einfaktoriellen ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test für multiple Vergleiche:

**A2780**

<b>Triptolid</b>	<b>Mittlere Differenz</b>	<b>95,00% KI</b>	<b>P-Wert angepasst</b>	<b>Signifikant</b>
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-2,667	-10,13 bis 4,797	0,6980	Nein
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-19,67	-27,13 bis -12,20	<0,0001	Ja
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-43,00	-50,46 bis -35,54	<0,0001	Ja
<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-96,33	-103,8 bis -88,87	<0,0001	Ja

**Tabelle 39: Ergebnisse des Triptolid in der M30CytoDEATH-Färbung der A2780 Zellen**

**A2780cis**

<b>Triptolid</b>	<b>Mittlere Differenz</b>	<b>95,00% KI</b>	<b>P-Wert angepasst</b>	<b>Signifikant</b>
<b>6,25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-0,6667	-15,64 bis 14,31	0,9998	Nein
<b>12,5 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-4,667	-19,64 bis 10,31	0,7801	Nein
<b>25 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-25,67	-40,64 bis -10,69	0,0020	Ja



<b>50 nM</b> vs. Kontrollen ohne DMSO	-51,67	-66,64 bis -36,69	<0,0001	Ja
---------------------------------------	--------	----------------------	---------	----

**Tabelle 40: Ergebnisse des Triptolid in der M30CytoDEATH-Färbung der A2780cis Zellen**