

**Identifizierung einer synergistischen zytotoxischen
Kombination metabolischer Inhibitoren auf
Ovarialkarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Julia Stengel
aus Remscheid

Gießen 2024

Identifizierung einer synergistischen zytotoxischen Kombination metabolischer Inhibitoren auf Ovarialkarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Julia Stengel
aus Remscheid

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Biochemie des Fachbereichs Medizin

Gutachter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: PD Dr. med. Gamal André Banat

Tag der Disputation: 07.03.2025

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Hochgradig seröses Ovarialkarzinom	2
1.1.2.1	Entstehung des hochgradig serösen Ovarialkarzinoms	2
1.1.3	Bisherige Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms	3
1.2	Metabolismus	4
1.2.1	Physiologischer Zellmetabolismus – Glykolyse	4
1.2.2	Metabolismus von Tumorzellen	7
1.2.3	Metabolische Veränderungen in Tumorzellen als Angriffspunkte für die Tumorthherapie	10
1.3	Der Zellzyklus	11
1.4	Permanenter Zellzyklusarrest und Zelluntergang	13
1.4.1	Apoptose	13
1.4.2	Zellseneszenz	15
1.4.2.1	Induktion zellulärer Seneszenz	15
1.4.2.2	Phänotypische Zellveränderungen im Zusammenhang mit Seneszenz	17
1.4.2.3	Seneszenz als Antwort auf DNA-Schäden	18
1.4.2.4	Klinische Bedeutung von Seneszenz	19
1.5	Ziel dieser Arbeit	20
2	MATERIAL & METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Antibiotika	21
2.1.2	Antikörper	21
2.1.2.1	Primäre Antikörper	21
2.1.2.2	Sekundäre Antikörper	21

2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Eukaryotische Zelllinien	23
2.1.6	Inhibitoren/Aktivatoren	24
2.1.7	Kits	25
2.1.8	Verbrauchsmaterial und sonstige Reagenzien	25
2.1.9	Software	25
2.1.10	Puffer und Lösungen	25
2.2	Methoden der Molekularbiologie	26
2.2.1	Lentivirale Transduktion zur Generierung der verwendeten Zelllinien	26
2.3	Methoden der Zellbiologie	26
2.3.1	Zellkultur und Zellzählung	26
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	28
2.3.3	Proteinextraktion	28
2.3.4	Zellzyklus-Analyse	29
2.3.5	Messung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	30
2.3.6	Messung der Zellseneszenz	30
2.3.7	Messung der Zellviabilität	31
2.3.8	Immunfluoreszenz	31
2.3.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	32
2.3.10	Inhibitor-Selektion	33
2.3.11	Inhibitor-Testung auf verschiedenen Krebszelllinien	34
2.4	Methoden der Biochemie	35
2.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	35
2.4.2	Western-Blot und Immundetektion	36
3	ERGEBNISSE	37

3.1	Testung metabolischer Inhibitoren auf Ovarialkarzinomzellen	37
3.1.1	Einzelne Metabolismus-Inhibitoren zeigen zytotoxische Effekte	37
3.1.2	Synergistischer zytotoxischer Effekt von (R)-GNE-140 und BMS-986205 unter verschiedenen Bedingungen	38
3.2	Charakterisierung des Effekts spezifischer Metabolismus-Inhibitoren auf Ovarialkarzinomzellen	40
3.2.1	Veränderungen der Zellgröße von Ovarialkarzinomzellen nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	40
3.2.2	Keine Induktion von Apoptose in Ovarialkarzinomzellen nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	42
3.2.3	Seneszenzinduktion in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	43
3.2.4	Akkumulation von Ovarialkarzinomzellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	45
3.2.5	Zellen zeigen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 Zeichen von DNA-Schäden	46
3.2.6	Alternativer Antwortmechanismus der Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf DNA-Schäden	47
3.2.7	Vermehrtes Vorkommen von ROS in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	49
3.2.8	Veränderungen der Mitochondrien in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	50
3.3	Effekte von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf andere Krebszelllinien	53
3.3.1	Die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigt bei mehreren Krebszelllinien einen zytotoxischen Effekt	53
3.3.2	Seneszenzinduktion auch in anderen Krebszelllinien nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	55

3.3.3	Keine Induktion von Apoptose in mehreren Krebszelllinien nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	56
3.3.4	Zellzyklusakkumulation einiger Krebszelllinien nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	57
4	DISKUSSION	60
4.1	Kombinationen von Chemotherapeutika in der Krebstherapie	60
4.1.1	Begründung von Therapiekombinationen	60
4.1.2	Synthetische Letalität durch Chemotherapiekombinationen	61
4.1.3	Metabolische Inhibitoren in der Krebstherapie	62
4.2	Auslösung von Seneszenz nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	63
4.2.1	Seneszenz als Folge des Energiemangels der Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	63
4.2.2	Seneszenz auch als Folge von DNA-Schäden nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	64
4.2.3	Alternativer Mechanismus der Seneszenzinduktion nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	64
4.2.4	Morphologische Veränderungen der Mitochondrien in Krebszellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205	66
4.3	Zytotoxischer Effekt von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auch in anderen Krebszelllinien	68
4.3.1	Heterogene Antworten auf die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 in unterschiedlichen Krebszelllinien	68
4.4	Selektivität der Therapiekombination für Krebszellen	69
4.4.1	Selektivität von (R)-GNE-140 und BMS-986205 für Krebszellen	69
4.4.2	Möglichkeiten für eine verbesserte Krebszellselektivität in der Tumorthherapie	70
4.4.3	Möglichkeiten zur Verringerung der Chemotherapie-assoziierten Toxizität	71

4.5	Ausblick	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	SUMMARY	75
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
8	KOLLABORATIONEN	80
9	ANHANG	81
10	LITERATURVERZEICHNIS	87
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	98
12	DANKSAGUNG	99

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Ovarialkarzinome machen circa ein Drittel aller malignen Neuerkrankungen des weiblichen Genitaltraktes aus, wobei durchschnittlich eine von 76 Frauen im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs erkrankt. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt dabei 69 Jahre. Damit ist das Ovarialkarzinom die häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung nach Brustkrebs. In den meisten Fällen handelt es sich um mäßig bis schlecht differenzierte seröse Adenokarzinome, wobei andere Formen von Ovarialkarzinomen auch bereits in jüngerem Alter auftreten können (Robert Koch-Institut, 2021). Da es bisher keine vorgesehene Früherkennungsuntersuchung gibt, werden die meisten Ovarialkarzinome verhältnismäßig spät diagnostiziert, weshalb die relative 5-Jahres-Überlebensrate derzeit nur bei 42 % liegt (DGGG, 2020). Unterschiedliche Faktoren können das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken erhöhen oder auch reduzieren. Zunehmendes Alter, Adipositas, ovariale Zysten, Mutationen in DNA-Reparaturgenen aber auch hormonelle Einflussfaktoren erhöhen das Risiko (Robert-Koch-Institut, 2021). Bei Einnahme von Ovulationshemmern bzw. bei Multiparität reduziert sich das Risiko eines Ovarialkarzinoms hingegen. Hierbei geht man vor allem davon aus, dass während des Eisprunges ein komplexes Milieu, bestehend aus proinflammatorischen Zytokinen und Sauerstoff-Radikalen, von Zellen des Ovars und umgebendem Stroma sekretiert wird. Dieses Milieu kann DNA-Schäden in allen an diesem Prozess beteiligten Zellen induzieren. Je öfter es bei einer Frau zur Ovulation kommt, desto häufiger entsteht dieses DNA-Schäden induzierende Milieu und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer zellulären Entartung (Ness and Cottreau, 1999; Trabert *et al.*, 2020). Die vermehrte Einnahme von Ovulationshemmern wird daher als ein Grund dafür angesehen, dass die Zahl der Neuerkrankungen in den letzten Jahrzehnten insgesamt rückläufig war (Buttmann-Schweiger and Kraywinkel, 2019). Dieser positive Effekt könnte allerdings durch eine zunehmend adipöse Bevölkerung und den dadurch erhöhten Risikofaktoren wieder aufgehoben werden (Buttmann-Schweiger and Kraywinkel, 2019).

1.1.2 Hochgradig seröses Ovarialkarzinom

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation erfolgt die Einteilung von Ovarialtumoren anhand ihrer Histologie (siehe Tabelle 6). Den Großteil der malignen Neoplasien machen dabei epitheliale Tumoren aus, wobei es sich bei den meisten Tumoren um hochgradig seröse Ovarialkarzinome (HGSOC) handelt (Kaufmann, 2013). Das mittlere Erkrankungsalter für HGSOC liegt bei 63 Jahren, wobei die Diagnose aufgrund fehlender bzw. unspezifischer Symptome meist erst sehr spät erfolgt. Aus diesem Grund liegt bei den meisten Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein HGSOC im Stadium III oder IV vor (siehe Tabelle 7). Bei HGSOC handelt es sich wie oben bereits erwähnt um epitheliale Zellen, welche papilläre, glanduläre und solide Strukturen aufweisen, wobei man in vielen Zellen hochgradige Kernatypien finden kann (Carcangiu *et al.*, 2014). Molekulargenetisch finden sich in vielen Fällen aberrante Expressionsmuster des Tumorsuppressorgens p53 sowie eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 (*breast cancer gene 1/2*), was einen Einfluss auf die Zellproliferation, den Zellzyklus und die genomische Stabilität der Tumorzellen hat (Mullan, Quinn and Harkin, 2006; Carcangiu *et al.*, 2014). Das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose ist besonders relevant für die Prognose von HGSOC-Patientinnen. Da die meisten Tumoren erst in Stadium III oder IV diagnostiziert werden, ist vor allem die Größe des Residualtumors nach operativer Resektion entscheidend, welche im Idealfall weniger als 1 cm betragen sollte (Kaufmann, 2013; Carcangiu *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Entstehung des hochgradig serösen Ovarialkarzinoms

Bei über 95% der hochgradig serösen Ovarialkarzinome liegen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 vor (Ahmed *et al.*, 2010). p53 spielt in der Zelle eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Initiation von Apoptose, des Zellmetabolismus oder der DNA-Reparatur (Zhang *et al.*, 2020). Kommt es nun zu Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53, können diese ihre ursprünglichen Funktionen nicht mehr erfüllen. Im Laufe der Zeit akkumulieren in der Krebszelle verschiedene Mutationen, weshalb zwischen der initialen Zellschädigung und dem letztendlichen Tumoraufreten Jahre bis Jahrzehnte vergehen können (Bielas and Loeb, 2005; Takeshima and Ushijima, 2019).

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass HGSOE von der Oberfläche des Ovars ausgehen. Aktuellere Studien zeigen allerdings, dass sich Vorläuferläsionen des HGSOE auch an den Fimbrien der Tube (*fallopian tube*) nachweisen lassen. Bei diesen Vorläuferläsionen handelt es sich ebenfalls um Mutationen im p53 Gen (p53 Signatur) sowie um serös tubare intraepitheliale Karzinome (STIC) (Kindelberger *et al.*, 2007; Labidi-Galy *et al.*, 2017). STIC lassen sich vor allem bei Frauen mit BRCA-Mutation nachweisen und sind aufgrund der hohen Assoziation mit HGSOE ein hochgradiger Hinweis auf das Vorliegen einer Vollmanifestation des HGSOE, auch wenn die Tumoren zu diesem Zeitpunkt unter Umständen noch verhältnismäßig klein sein können (DGGG, 2020).

1.1.3 Bisherige Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms

Die aktuelle (Stand 2022) leitliniengerechte Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms sieht eine Primäroperation vor, auf die eine anschließende Chemotherapie folgt. Primäres Operationsziel ist hierbei eine makroskopische Tumorfreiheit im Sinne einer möglichst günstigen prognostischen Ausgangslage (DGGG, 2020). Eine Hysterektomie mit Adnexektomie, sprich eine Entfernung von Uterus, Tuben und Ovarien, sind dabei obligate Bestandteile der Primäroperation, um eine möglichst große Menge an Tumorgewebe entfernen zu können (Kaufmann, 2013). Im Anschluss an die Operation erfolgt bei allen Patientinnen mit Tumoren im Stadium II-IV eine adjuvante Polychemotherapie, bestehend aus dem Alkylans Carboplatin und dem Mitosehemmstoff Paclitaxel über 6 Zyklen. Bei Patientinnen mit Tumoren im Stadium III-IV sollte außerdem eine weiterführende Erhaltungstherapie erwogen werden, bestehend beispielsweise aus dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Inhibitor Bevacizumab oder aus Poly (ADP-Ribose) Polymerase [PARP]-Inhibitoren wie zum Beispiel Olaparib (DGGG, 2020). Insbesondere der Einsatz von PARP-Inhibitoren bietet sich bei Patientinnen mit BRCA1/2 Mutationen an, da sowohl BRCA1/2 als auch PARP an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind. Der Grund dafür liegt in der Annahme, dass bei Patientinnen mit einer BRCA1/2 Mutation und zusätzlicher PARP-Inhibition die anfallende Menge an DNA-Schäden so groß wird, dass sie von der Zelle nicht mehr toleriert werden kann, woraufhin der Zelltod in Form von Apoptose eingeleitet wird (Morgan *et al.*, 2018). Da gesunde Zellen keine BRCA1/2 Mutation aufweisen, werden sie weniger stark durch die zusätzliche PARP-Inhibition beeinträchtigt und überleben die Behandlung.

Auch wenn initial bis zu 85% aller Patientinnen mit HGSOE unter anderem auf eine chemotherapeutische Behandlung ansprechen, stellt in den meisten Fällen die Entwicklung von Resistenzen, insbesondere gegenüber den Platin-basierten Chemotherapeutika, die Haupttherapielimitation dar (Cooke and Brenton, 2011). Zu Beginn einer Platin-basierten Chemotherapie mit Cisplatin oder Carboplatin weisen bereits 15%-25% aller Patientinnen Resistenzen gegenüber den genannten Chemotherapeutika auf (Christie and Bowtell, 2017). Liegen zu Beginn der Therapie keine Resistenzen vor, können die bei HGSOE häufig auftretenden Rezidive die weitere Therapie allerdings erschweren, da Rezidive häufig mit der Entstehung von Resistenzen gegenüber Platin-basierten Chemotherapeutika assoziiert sind. Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung hängt dabei mit dem Rezidivzeitpunkt zusammen. Je früher es zu einem Rezidiv kommt, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Patientinnen erneut auf die Platin-basierte Chemotherapie ansprechen. Bei einem Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach dem Ende der Primärtherapie liegt die Wahrscheinlichkeit für ein erneutes Therapieansprechen bei unter 10%, wohingegen noch über 60% der Patientinnen erneut auf Platin-basierte Chemotherapeutika ansprechen, wenn das Rezidiv mehr als 12 Monate nach dem Ende der Primärtherapie auftritt (Cooke and Brenton, 2011). Aufgrund der geschilderten Resistenzsituation ist es daher unter anderem ein Forschungsziel, alternative platinunabhängige Chemotherapeutika zu finden, die ein gutes Therapieansprechen bei HGSOE zeigen und die Prognose von Patientinnen mit einem HGSOE somit verbessern können.

1.2 Metabolismus

1.2.1 Physiologischer Zellmetabolismus – Glykolyse

Um die Funktion von Zellen bzw. des gesamten Organismus aufrechtzuerhalten, ist der Organismus auf die kontinuierliche Zufuhr von Energie angewiesen (Judge and Dodd, 2020). Der Zellmetabolismus basiert dabei vor allem auf der Umwandlung von Energie innerhalb des Systems aus Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindi- (ADP) bzw. Adenosinmonophosphat (AMP), sowie aus Oxidations-Reduktions-Reaktionen beispielsweise mittels des Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) Systems (Mesquita and Rodrigues, 2018). Die Hauptenergiequelle für den Zellmetabolismus stellt Glucose dar, welche nach der Aufnahme in die Zelle über 3 Stoffwechselwege zur Produktion von ATP weiterverwertet wird: Der Glykolyse, dem Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung (Bonora *et al.*, 2012).

Die Glykolyse lässt sich in 2 Phasen unterteilen, wobei in der ersten Phase Energie in die Verstoffwechslung von Glucose investiert werden muss, während in der zweiten Phase Energie in Form von 2 Molekülen ATP gewonnen wird. An der Metabolisierung von Glucose sind insgesamt 10 verschiedene Enzyme beteiligt, wobei es mehrere reversible und irreversible Reaktionsschritte gibt (Abb. 1). Bei den irreversiblen Reaktionsschritten handelt es sich um den ersten Schritt der Glykolyse, der Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P). Am zweiten irreversiblen Reaktionsschritt ist das Enzym Phosphofruktokinase (PFK) beteiligt, welches Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat phosphoryliert. Neben dem ersten Schritt der Glykolyse ist auch der letzte Schritt eine irreversible Enzymreaktion, bei der die Pyruvatkinase (PK) Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat abbaut. Bei den irreversiblen Reaktionen der Glykolyse handelt es sich gleichzeitig um die Reaktionen, welche für die Regulation der Glykolyse eine wichtige Rolle spielen. So werden beispielsweise alle 3 Enzyme über AMP und ADP als Indikatoren für eine erniedrigte Energieversorgung der Zelle aktiviert, wodurch die Glykolyse-Rate hochreguliert werden kann (Akram, 2013; Mesquita and Rodrigues, 2018; Judge and Dodd, 2020).

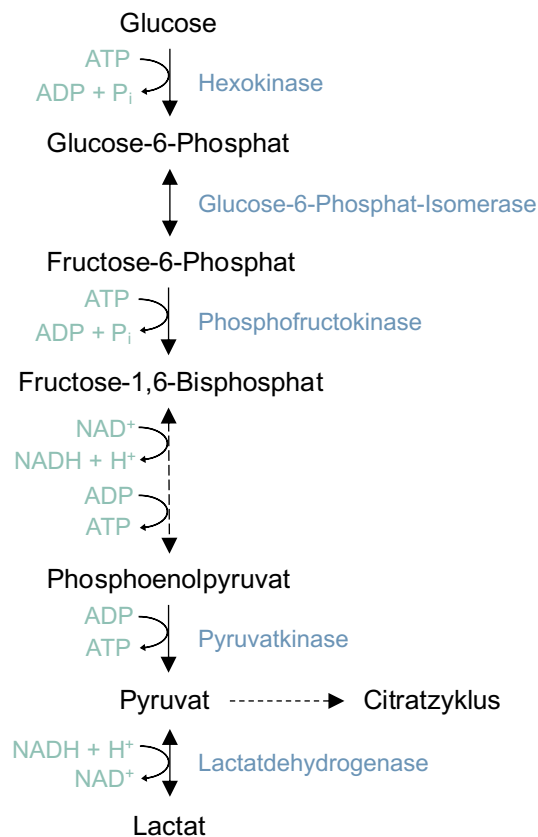


Abb. 1: Schematische Übersicht des Abbaus von Glucose in der Glykolyse.
Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Abb. 1 (Fortsetzung): Schematische Übersicht des Abbaus von Glucose in der Glykolyse. Bei der Glykolyse wird Glucose in mehreren enzymatischen Schritten zu Pyruvat abgebaut, wobei Energie in Form von ATP entsteht. Das Pyruvat kann anschließend in den Citratzyklus eingespeist werden oder über die anaerobe Glykolyse mittels der LDH zu Lactat umgewandelt werden.

Unter aeroben Bedingungen erfolgt die weitere Verstoffwechslung von Pyruvat über die oxidative Phosphorylierung. Unter anaeroben Bedingungen hingegen wird Pyruvat über die Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat weiterverwertet. Einige Enzyme der Glykolyse existieren in mehreren Isoformen, welche zwar alle die gleiche Reaktion katalysieren, sich aber zum Beispiel in der Substratspezifität unterscheiden. So existieren beispielsweise 5 verschiedene LDH Isoenzyme, welche von den 2 separaten Genen A und B kodiert werden (Koukourakis *et al.*, 2009). Das Isoenzym LDHA wird dabei vor allem in vielen Tumorzellen vermehrt exprimiert und dient hier als Marker für einen verstärkten anaeroben Zellmetabolismus, welcher es den Tumorzellen erlaubt, auch unter hypoxischen Bedingungen zu proliferieren (Jurisic, Radenkovic and Konjevic, 2015). Bei der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat kann die in der Glykolyse entstandene reduzierte Form von NAD ($\text{NADH} + \text{H}^+$) wieder zu NAD^+ oxidiert werden, welches anschließend direkt wieder in der Glykolyse verwertet werden kann (Judge and Dodd, 2020).

Neben der Glucose als Hauptsubstrat für die Glykolyse können auch andere Metabolite in die Glykolyse eingeschleust werden, ein Beispiel dafür wäre die Aminosäure Tryptophan. Bei Tryptophan handelt es sich um eine gemischt ketogene und glucogene Aminosäure, die im Menschen hauptsächlich über den sog. Kynureninweg abgebaut wird (Abb. 2). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Abbau von Tryptophan ist die Umwandlung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin über das gewebeabhängige Enzym Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO1), welches anschließend über die Kynurenin-Formylase weiter zu Kynurenin abgebaut wird (Löffler *et al.*, 2014; Platten *et al.*, 2019). Im weiteren Abbau von Kynurenin entsteht Alanin, welches über die Umwandlung zu Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse anschließend weiter verstoffwechselt werden kann (Löffler *et al.*, 2014). Eines der Endprodukte im Tryptophanabbau über den Kynureninweg ist Chinolinsäure, welche über mehrere Zwischenschritte in NAD^+ umgewandelt wird und anschließend ebenfalls wieder in der Glykolyse verwendet werden kann (Platten *et al.*, 2019). Die Produktion von NAD^+ spielt daneben allerdings auch in der Tumorphiliferation eine Rolle, da die *de novo* Synthese von NAD^+ über den Kynureninweg mittels IDO1 die Sensibilität von Tumoren beispielsweise gegenüber Chemotherapeutika negativ beeinflussen kann (Vareki *et al.*, 2014; Platten *et al.*, 2019). Dies ist vor allem deshalb von Relevanz, da das Enzym IDO1

in über 58% aller Tumoren exprimiert wird (Théate *et al.*, 2015; Platten *et al.*, 2019). Für Tumoren ist eine Überexpression von IDO1 unter anderem auch durch den immunsuppressiven Effekt des sekretierten Kynurenins, bzw. der sekretierten Metabolite des Kynurenin-Signalwegs, von Vorteil (Munn and Mellor, 2013).

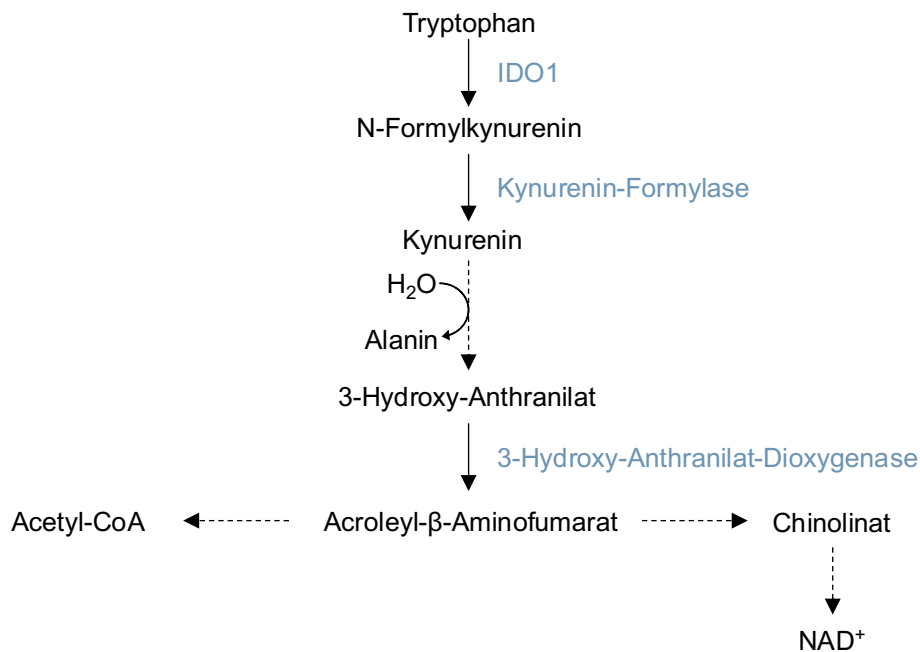


Abb. 2: Schematische Übersicht eines Auszuges des Tryptophan Katabolismus.

Beim Abbau von Tryptophan entstehen Zwischenprodukte wie NAD^+ und Alanin, die in die Glykolyse eingespeist werden können. Acetyl-CoA als mögliches Endprodukt kann ebenfalls zur weiteren Energiegewinnung zum Beispiel im Citratzyklus weiterverwertet werden.

1.2.2 Metabolismus von Tumorzellen

Während der Tumorentstehung kommt es in den Zellen zu einer Reihe von charakteristischen Veränderungen, die zum Beispiel dazu führen, dass sich Tumorzellen der Apoptose entziehen können. Diese charakteristischen Veränderungen, die in nahezu allen Tumorzellen zu finden sind, werden dementsprechend auch als Kennzeichen einer Krebserkrankung bezeichnet (Hanahan and Weinberg, 2000). Neben den bisher bekannten Kennzeichen (Abb. 3) kommen seit einiger Zeit auch metabolischen Veränderungen von Tumorzellen eine tragende Rolle zu, da viele Tumorzellen ihren Metabolismus auf eine für Krebszellen charakteristische Art und Weise anpassen können (Hanahan and Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

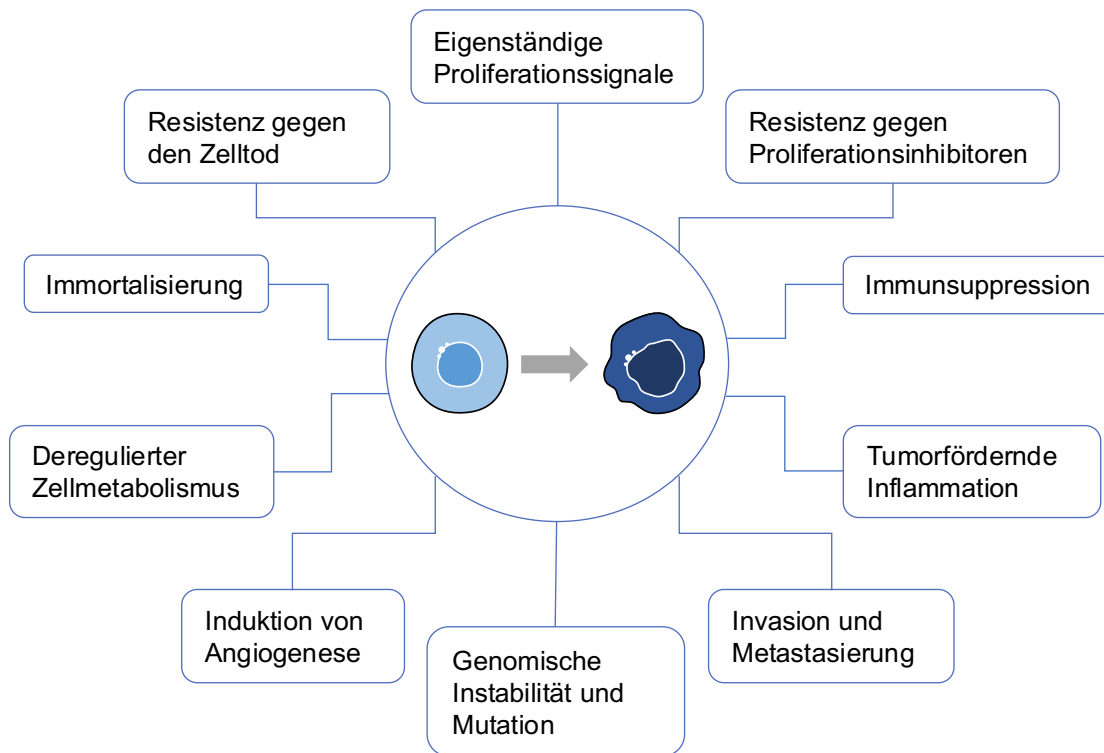


Abb. 3: Kennzeichen von Tumorzellen. Tumorzellen zeichnen sich insbesondere durch die genannten Charakteristika gegenüber gesunden Zellen aus. Die Ausprägung dieser Charakteristika kann sich jedoch von Krebsart zu Krebsart unterscheiden. Je höher die Anzahl an erworbenen Eigenschaften, desto bösartiger der Tumor (verändert nach Hanahan & Weinberg, 2011).

Die metabolische Reprogrammierung von Krebszellen kann über verschiedene Wege erreicht werden (Abb. 4). Einerseits können genetische Veränderungen ursächlich für metabolische Verschiebungen sein, wie sie z.B. für die Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) beschrieben wurden. Das mutierte Enzym ist hier in der Lage α -Ketoglutarat in 2-Hydroxyglutarat (2HG) umzuwandeln, wobei die Akkumulation von 2HG das Risiko für die Entstehung maligner Hirntumoren erhöhen kann (Dang *et al.*, 2009). Zusätzlich können Gene, welche z.B. für Stoffwechsellzyme wie die Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PHGDH) kodieren, amplifiziert werden. Die Amplifikation des PHGDH-Gens treibt die Serin-Biosynthese an, welche für die Zellproliferation bei Brustkrebs und Melanomen essentiell ist (Locasale *et al.*, 2011; Possemato *et al.*, 2011). Andererseits erfolgt die metabolische Reprogrammierung von Krebszellen häufig ohne zugrunde liegende genetische Veränderung als Reaktion auf die Expression von Onkogenen. Onkogene Mutationen von Kras führen bspw. zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und zur Umleitung ihrer Zwischenprodukte in den

Pentosephosphatweg, was die Aufrechterhaltung der DNA- bzw. RNA-Biosynthese gewährleistet (Ying *et al.*, 2012).

Bei vielen Tumorzellen lässt sich im Gegensatz zu den gesunden Zellen feststellen, dass sie auch unter aeroben Bedingungen Energie in Form von ATP über die anaerobe Glykolyse gewinnen, was als „Warburg-Effekt“ nach dem Entdecker Otto Warburg benannt ist (Warburg, Wind and Negelein, 1927). Für Tumorzellen bedeutet dies in gewisser Weise einen Verzicht auf ATP, da die anaerobe Glykolyse nur 2 Moleküle ATP pro Molekül Glucose liefert, die aerobe Glykolyse über die Weiterverwertung von Pyruvat im Citratzyklus und letztendlich der Atmungskette hingegen insgesamt 32 Moleküle ATP pro Molekül Glucose (Löffler *et al.*, 2014). Tumorzellen können allerdings die entsprechend vermehrt anfallenden Intermediate der Glykolyse für verschiedene weitere Biosynthesewege wie zum Beispiel zur Synthese von Aminosäuren verwenden, welche für die verstärkte Proliferationsrate von Tumorzellen benötigt werden (Hanahan and Weinberg, 2011). Des Weiteren sind Tumorzellen in der Lage ihren Metabolismus an die veränderten Anforderungen anzupassen, um beispielsweise genügend Substrate für die gesteigerte Biosyntheseleistung bereitstellen zu können. Eine Möglichkeit dafür wäre die Hochregulation der Expression von Glucosetransportern (GLUT) in der Zellmembran, um mehr Glucose zur Verstoffwechslung aufnehmen zu können. Eine andere, in vielen Tumorzellen zu beobachtende Möglichkeit wäre außerdem die Überexpression bestimmter Enzyme, wie zum Beispiel der bereits erwähnten LDH, um vermehrt anfallendes Substrat schneller umsetzen zu können (Romero-Garcia *et al.*, 2011).

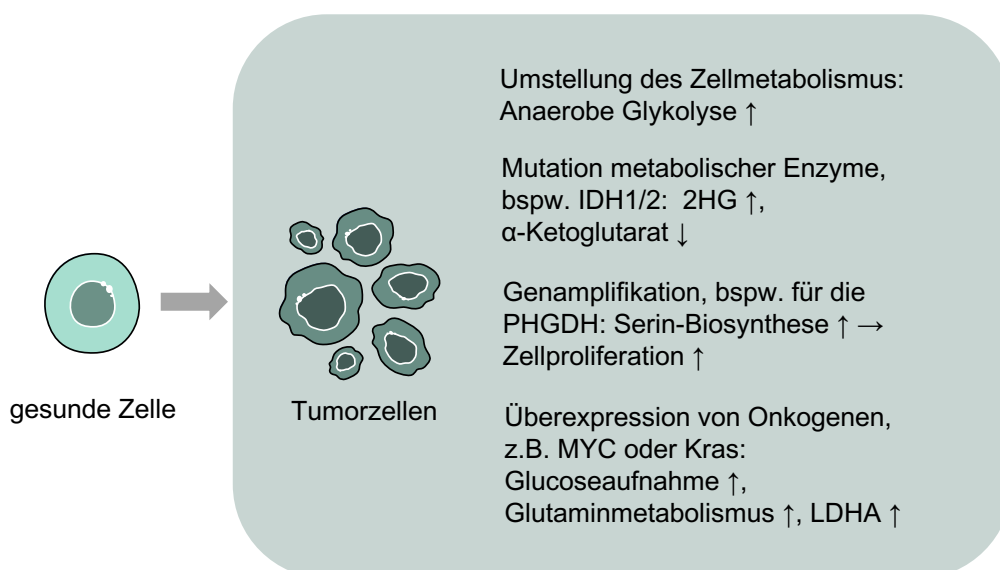


Abb. 4: Metabolische Anpassungen in Tumorzellen. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Abb. 4 (Fortsetzung): Metabolische Anpassungen in Tumorzellen. Einige Tumorzellen sind in der Lage, ihren Metabolismus auf unterschiedliche Art und Weise an bestimmte Gegebenheiten anzupassen und so z.B. ihre Fähigkeit zur Zellproliferation zu optimieren. Die Veränderungen im Metabolismus können dabei von Krebsart zu Krebsart variieren.

1.2.3 Metabolische Veränderungen in Tumorzellen als Angriffspunkte für die Tumorthherapie

Veränderungen im Krebsstoffwechsel spielen in der Diagnostik eine wichtige Rolle, hier sei beispielsweise die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) genannt, bei der z.B. über den Glucose-Metabolismus auf das Vorhandensein von Tumorzellen geschlossen werden kann (Schwenck *et al.*, 2023). Das tumortherapeutische Potenzial der Beeinflussung metabolischer Wege wird durch Metaanalysen von Patientinnen und Patienten unterstützt, welche bereits zugelassene, den Metabolismus beeinflussende Medikamente wie Statine oder Metformin zur Behandlung einer Hypercholesterinämie oder eines Typ-2-Diabetes einnehmen. Entwickelten diese Patientinnen und Patienten zusätzlich Tumoren, führte die Einnahme von Statinen oder Metformin teils zu längeren Überlebensraten und niedrigeren Rückfallraten bei verschiedenen Krebsarten wie Ovarial- oder Mammakarzinomen (Almeida-Nunes *et al.*, 2023; Jia *et al.*, 2023). Zudem schaffen Resistenzen gegen konventionelle Tumor-Therapeutika wie Cisplatin oft metabolische Schwachstellen, die empfindlich auf die Behandlung mit metabolischen Inhibitoren reagieren (Obrist *et al.*, 2018). Metabolische Inhibitoren wie Metformin können außerdem dazu verwendet werden das Tumormikroumfeld neu zu programmieren, wodurch bspw. das Tumorstadium gehemmt werden kann (El Sayed *et al.*, 2021). Auch die veränderten Expressionslevel bestimmter metabolischer Enzyme bieten Angriffspunkte in der Tumorthherapie. So zeigen viele Tumoren bspw. eine Hochregulation der LDH, welche im letzten Schritt der Glykolyse die Reaktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert (Sharma, Singh and Rani, 2022). LDH-Inhibitoren wie Oxamat oder (R)-GNE-140 befinden sich derzeit in präklinischen Studien, wobei z.B. für Oxamat bereits *in vitro* und *in vivo* eine Inhibition der Zellproliferation für nasopharyngeale Karzinome gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2013; Li and Cui, 2023). Auch Inhibitoren der bereits erwähnten und in Tumoren häufig verstärkt exprimierten IDO1 stellen mit der Beeinflussung des Zellmetabolismus eine Option in der Tumorthherapie dar. So befinden sich die IDO1-Inhibitoren Epcadostat und BMS-986205 in mehreren klinischen Phase-I- bis Phase-III-Studien, sowohl in der Mono- als auch in

der Kombinationstherapie mit anderen Arzneimitteln (Tang *et al.*, 2021). In den USA wird BMS-986205 bspw. aktuell in einer Phase-III-Studie zur Therapie des invasiven Harnblasenkarzinoms gemeinsam mit anderen Chemo- bzw. Immuntherapeutika getestet (Sonpavde *et al.*, 2020).

1.3 Der Zellzyklus

Für die Proliferation von Tumoren müssen die einzelnen Zellen den Zellzyklus durchlaufen, welcher aus 4 nacheinander ablaufenden Phasen besteht. Drei der 4 Phasen sind in der Interphase zusammengefasst: Während der G1-Phase (gap-1) kommt es zum Zellwachstum sowie zur Protein- und Nukleotidsynthese, in der nachfolgenden Synthese-Phase (S-Phase) erfolgt die DNA-Replikation. Abschließend folgt die G2-Phase (gap-2), in der sich die Zelle auf die folgende Mitose vorbereitet. In der Mitose-Phase (M-Phase) werden die Chromosomen aufgetrennt und auf zwei Tochterzellen aufgeteilt (Löffler *et al.*, 2014). Während permanent proliferierenden Zellen anschließend wieder in die G1-Phase eintreten, können sich nicht mehr teilende Zellen, wie zum Beispiel Neuronen, in der G0-Phase der Interphase, der sogenannten zellulären Quieszenz verbleiben (Coller, Sang and Roberts, 2006; Frade and Ovejero-Benito, 2015). Der geordnete Ablauf des Zellzyklus wird durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, *cycline-dependent kinases*) gewährleistet. CDK2, CDK4 und CDK6 spielen dabei in der Interphase eine Rolle und CDK1 in der Mitose (Malumbres and Barbacid, 2009). CDKs liegen primär inaktiv vor und können erst durch Bindung der entsprechenden Cycline Effektorfunktion übernehmen. Für den Zellzyklus sind dabei insgesamt 10 verschiedene Cycline aus den Klassen A, B, D und E relevant (Malumbres and Barbacid, 2009). Mit dem Eintritt in die G1-Phase kommt es zur Expression von Cyclin D, welches an CDK4 und CDK6 bindet und somit einen aktiven Cyclin D-CDK4/6-Komplex bildet. Dieser Komplex führt zu einer partiellen Inaktivierung von sogenannten Pocket Proteinen, wie zum Beispiel Retinoblastom Protein (RB), wodurch es zur Expression von Cyclin E kommt (Malumbres and Barbacid, 2009). Cyclin E bindet und aktiviert anschließend CDK2, wobei der Komplex aus CDK2 und Cyclin E die erwähnten Pocket Proteine hyperphosphoryliert und somit gänzlich inaktiviert, was zum Übertritt aus der G1- in die S-Phase führt (Lukas, Bartkova and Bartek, 1996). In der späten S-Phase kommt es zur Aktivierung von CDK2 durch Cyclin A2, wodurch der Zellzyklus aus der S-Phase in die G2-Phase voranschreitet. Am Ende der Interphase kommt es zur Aktivierung von CDK1 durch Cyclin A, wobei es mit dem Zerfall der Kernlamina während der Mitose zu einer

Degradation von Cyclin A kommt. Außerdem formiert sich der Cyclin B-CDK1-Komplex, welcher die Zelle abschließend durch die Mitose führt (Malumbres and Barbacid, 2009).

Um einen korrekten und fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten sind innerhalb des Zellzyklus verschiedene Kontrollpunkte (*Checkpoints*) vorhanden, an denen überprüft wird, ob alle Schritte der jeweiligen Phasen in korrekter Weise abgelaufen und ob DNA-Schäden vorhanden sind (Nurse, 2000). Diese Kontrollpunkte liegen jeweils in der späten G1- und G2-Phase, innerhalb der S-Phase sowie am Ende der M-Phase vor. Werden an den Kontrollpunkten Abweichungen wie eine zu geringe Zellgröße oder DNA-Schäden festgestellt, wird der Zellzyklus angehalten bzw. verlangsamt (Abb. 5) (Paulovich and Hartwell, 1995; Löffler *et al.*, 2014; Iyer and Rhind, 2017). Dieser Zellzyklusarrest sorgt zum einen für eine Reduzierung des natürlichen DNA-Schadens, welcher während der DNA-Replikation entsteht, beispielsweise durch die Korrektur von fälschlicherweise eingebauten Nukleotiden mittels der Endonukleaseaktivität des Enzyms FEN-1. Zum anderen wird der Zelle Zeit verschafft, um vorliegende Schäden oder Defizite zu bewältigen, sodass alle physiologischen Prozesse während der einzelnen Phasen des Zellzyklus fehlerfrei ablaufen können (Löffler *et al.*, 2014).

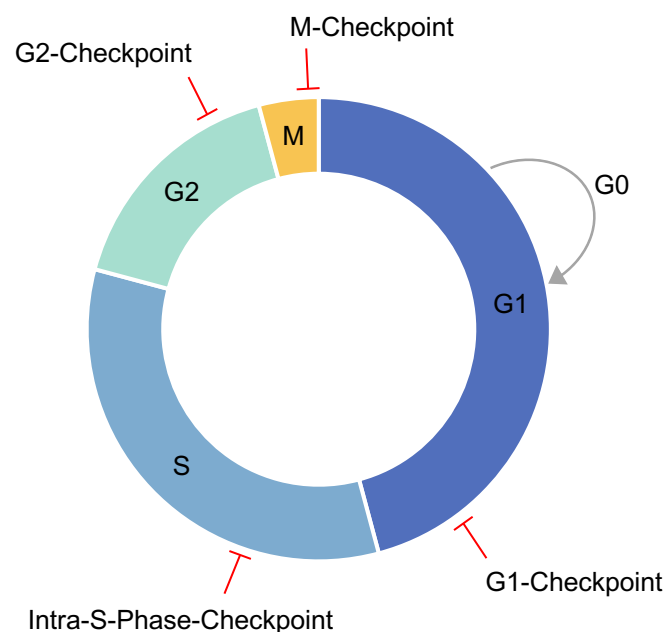


Abb. 5: Schematische Darstellung eines physiologischen Zellzyklus. Der Zellzyklus proliferierender Zellen teilt sich in 4 Phasen, bestehend aus G1-, S-, G2- und M-Phase. In den einzelnen Phasen gibt es jeweils einen Kontrollpunkt, an welchem der Status des korrekten Voranschreitens der Zellteilung, zum Beispiel im Hinblick auf DNA-Schäden, überprüft wird. Werden keine Schäden festgestellt, durchläuft die Zelle den weiteren Zellzyklus, andernfalls kommt es zum Zellzyklusarrest. Nicht mehr proliferierende Zellen können den Zellzyklus in der G1-Phase verlassen und in einen ruhenden Zustand innerhalb der G0-Phase eintreten.

Werden im Rahmen des G1-Kontrollpunktes DNA-Schäden festgestellt, kommt es zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53. Diese Aktivierung führt anschließend zu einer gesteigerten Expression des CDK-Inhibitors p21 (Li and Zou, 2005). Durch die Inhibition der Cyclin-CDK-Komplexe kommt es dann zu einem Arrest des Zellzyklus am G1/S-Übergang (Müller-Esterl, 2018).

CDKs können durch Phosphorylierungen an Tyrosinen inaktiviert sowie durch Dephosphorylierungen durch die Tyrosin Phosphatasen Cdc25A (*cell division cycle*), Cdc25B und Cdc25C anschließend wieder aktiviert werden. Treten innerhalb der S-Phase DNA-Schäden auf, wird eine Signalkaskade induziert, bei der es zu einer Chk1 (*Checkpoint Kinase 1*)-abhängigen Phosphorylierung von bspw. Cdc25A kommt, woraufhin es zur Degradation von Cdc25A kommt. Da CDKs in der Folge nicht mehr durch Cdc25A aktiviert werden können, kommt es zu einem Zellzyklusarrest am Übergang zwischen S/G2-Phase (Li and Zou, 2005). Chk1 selbst wird initial mittels einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase ATR (*Ataxia teleangiectasia and Rad3-Related*) aktiviert. ATR gehört mit ATM zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen und spielt gemeinsam mit ATM eine zentrale Rolle in der Initiierung der Antwort auf DNA-Schäden im Rahmen der Zellzyklus-Kontrollpunkte (Li and Zou, 2005; Barnum and O'Connell, 2014).

1.4 Permanenter Zellzyklusarrest und Zelluntergang

1.4.1 Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um eine Form des kontrollierten Zelltodes, bei dem die Zelle fragmentiert und anschließend phagozytiert wird. Die Induktion der Apoptose kann über verschiedene Wege erfolgen und ist abhängig von Cysteinyl-Aspartyl-Proteasen, den sogenannten Caspasen. Man unterscheidet zwei Gruppen von Caspasen, die Initiatorcaspasen (Caspasen 8 und 9) sowie die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7), wobei die Effektorcaspasen über die Initiatorcaspasen aktiviert werden (Löffler *et al.*, 2014). Apoptose kann zum einen durch die Zelle selbst initiiert werden, beispielsweise nach der Detektion eines Zellschadens, man spricht dann vom intrinsischen Signalweg. Alternativ kann die Apoptose der Zelle auch rezeptorabhängig von außen induziert werden, wobei dann vom extrinsischen Signalweg gesprochen wird (Löffler *et al.*, 2014; D'Arcy, 2019).

Der intrinsische Apoptoseweg, auch mitochondrialer Weg genannt, beginnt mit der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol als Reaktion auf zellulären Stress. Anschließend bildet Cytochrom C gemeinsam mit dem Apoptose-auslösenden Faktor 1 (Apaf-1, *apoptotic protease activating factor 1*) das Apoptosom im Cytosol. Nachfolgend wird die inaktive Procaspase 9 durch das Apoptosom proteolytisch gespalten. Die daraus resultierende aktive Caspase 9 spaltet und aktiviert im Anschluss weitere Effektorcaspasen, wie Caspase 3. Caspase 3 zählt, wie auch die Caspasen 6 und 7, zu den Effektorcaspasen, welche unter anderem für die DNA-Fragmentierung verantwortlich sind. Neben Cytochrom C setzen die Mitochondrien auch weitere pro-apoptische Proteine frei, wie zum Beispiel den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF, *apoptosis-inducing factor*). AIF translokiert daraufhin in den Zellkern und fördert dort die DNA-Fragmentierung sowie die Kondensation des Chromatins (Löffler *et al.*, 2014; Nirmala and Lopus, 2020).

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird rezeptorvermittelt über sog. Todesrezeptoren (DR, *death receptor*,) initiiert, zum Beispiel dem Fas-Rezeptor (FasR) oder dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNFR-1). TNFR-1 und FasR weisen intrazellulär eine sogenannte Todesdomäne (DD, *death domain*) auf, mit der sie nach Bindung der Liganden das Adapterprotein *Fas associated death domain containing protein* (FADD) rekrutieren, welches ebenfalls eine Todesdomäne besitzt (Löffler *et al.*, 2014). Diese DD dienen dann als Bindestellen für Initiatorcaspasen wie Procaspase 8. Procaspase 8 und FADD bilden gemeinsam den *death-inducing signaling complex* (DISC), durch welchen die inaktive Procaspase 8 in die aktive Caspase 8 überführt wird (Nirmala and Lopus, 2020). Caspase 8 kann dann im Verlauf weitere Effektorcaspasen, wie Caspase 3, Caspase 6 oder Caspase 7 aktivieren, welche z.B. essenzielle zelluläre Proteine abbauen, wodurch es wie beim intrinsischen Signalweg zu einem weiteren Voranschreiten der Apoptose kommt (Löffler *et al.*, 2014; Nirmala and Lopus, 2020).

Wie bereits erwähnt ist Apoptose essenziell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase eines Organismus, weshalb Fehlregulationen oft drastische Auswirkungen haben können. Kommt es im Organismus beispielsweise zu einer Hochregulation anti-apoptotischer Signalwege, ist die Entstehung von Krebserkrankungen häufig die Folge (Green and Llambi, 2015).

1.4.2 Zellseneszenz

Neben der Apoptose als definitivem Zelltod kann eine Zelle auch in einen permanenten Zellzyklusarrest eintreten, der Zellseneszenz (Collado, Blasco and Serrano, 2007). Bei der Seneszenz handelt es sich um einen Zustand, der sowohl physiologische als auch pathologische Eigenschaften aufweist. Zellen in Seneszenz können sich zwar nicht mehr teilen, sind aber nach wie vor metabolisch aktiv und können zum Beispiel über die Generierung eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) und der daraus folgenden Sekretion verschiedener Zytokine das umliegende Gewebe nach wie vor beeinflussen (He and Sharpless, 2017). Für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase im Rahmen der Wundheilung spielt die Seneszenz beispielsweise eine wichtige Rolle, da die Seneszenzinduktion infolge eines Gewebeschadens zur Elimination geschädigter Zellen beiträgt. Da ein Hauptcharakteristikum von Seneszenz in vielen Fällen ein permanenter Zellzyklusarrest ist, kann dessen Induktion auch zur Tumorsuppression beitragen (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Kommt es allerdings zur Persistenz seneszenten Zellen im Gewebe, kann im Laufe der Zeit ein gegenteiliger Effekt auftreten. Seneszente Zellen können das umliegende Gewebe durch die Sekretion von proinflammatorischen Molekülen beeinflussen, was wiederum zur Krebsentstehung beiträgt (Lecot *et al.*, 2016).

1.4.2.1 Induktion zellulärer Seneszenz

Bei der Seneszenz handelt es sich um eine Zellantwort auf multiple Stressoren (Abb. 6), wie zum Beispiel dem Verlust von Telomeren im Rahmen von Alterungsprozessen, oxidativem Stress, DNA-Schäden infolge von UV-Strahlung sowie einigen Chemotherapeutika (TIS, *therapy-induced senescence*) (Calcinotto *et al.*, 2019). Diese Stressoren führen häufig zu einer Aktivierung des Tumorsuppressors p53 sowie zu einer Aktivierung von CDK-Inhibitoren (CDKi) p16, p15, p21 und p27 (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Der p53/p21 Signalweg wird häufig im Rahmen der *DNA Damage Response* (DDR) aktiviert. p53 wird durch die Proteinkinase ATM (*Ataxia teleangiectasia mutated*) phosphoryliert und damit stabilisiert, was zu einer Expressionssteigerung antiproliferativer Gene führt (Kumari and Jat, 2021). Die Hauptfunktion von p53 ist hier die Induktion der Transkription des CDKi p21, welcher bspw. CDK2 inhibiert und somit über eine Hypophosphorylierung von RB zu einem Zellzyklusarrest führt (d'Adda di Fagnana, 2008; Herranz and Gil, 2018). Während p21 überwiegend für die Induktion der

Zellseneszenz verantwortlich ist und daher nicht dauerhaft in seneszenten Zellen exprimiert wird, ist der CDKi p16 hingegen für die Aufrechterhaltung der Seneszenz in den Zellen verantwortlich (He and Sharpless, 2017; Kumari and Jat, 2021).

Seneszenz über den p16/RB Signalweg wird vor allem durch epigenetische Veränderungen induziert (Petrova *et al.*, 2016). p16 inhibiert als CDKi die Bildung der Cyclin D-CDK4/6-Komplexe über eine direkte Bindung an CDK4/6 und hemmt so die Phosphorylierung von RB. Ist RB dephosphoryliert bzw. hypophosphoryliert bindet es an E2Fs, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, und bildet einen repressiven RB-E2F Komplex. Dieser Komplex bindet inhibitorisch an Promotoren der entsprechenden abhängigen Gene und verhindert so die Transkription von für den Progress des Zellzyklus relevanten Genen (Kumari and Jat, 2021).

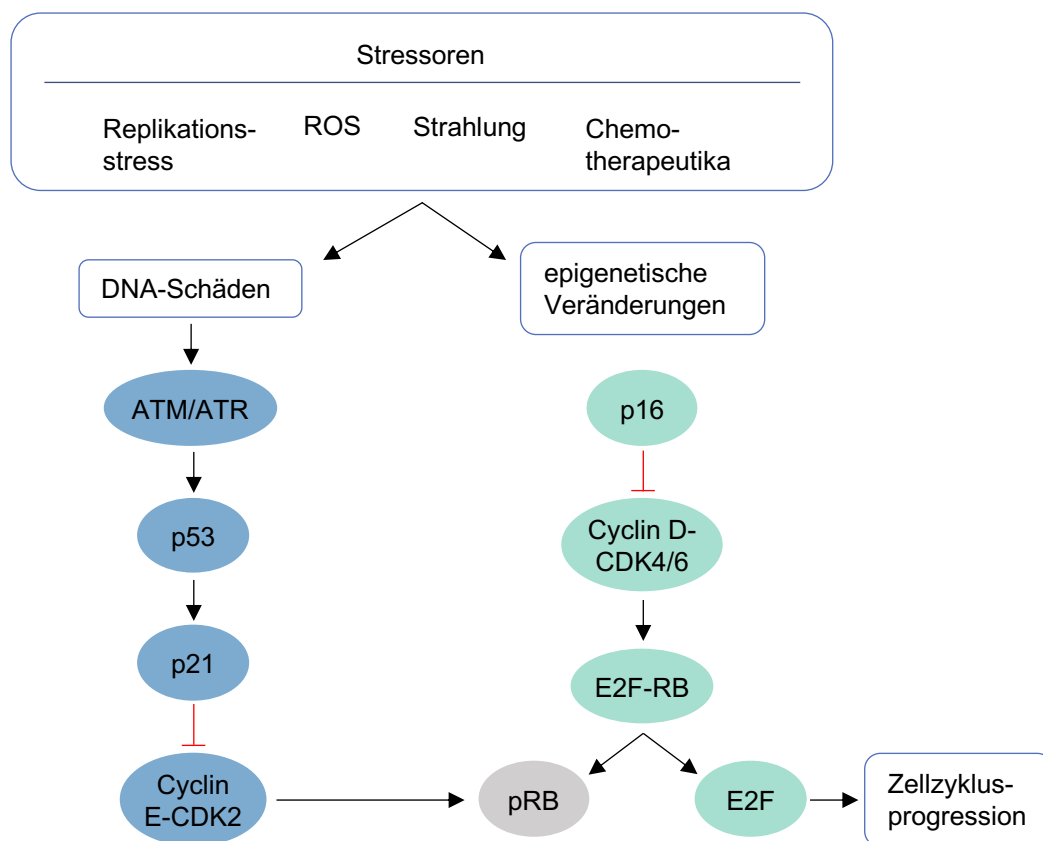


Abb. 6: Schematische Darstellung des Signalwegs zur Seneszenzinduktion in Abhängigkeit verschiedener Stressoren. Verschiedene Stressoren können in Zellen die Induktion von Seneszenz bewirken und im Anschluss über mehrere Signalwege zu einem Zellzyklusarrest führen.

1.4.2.2 Phänotypische Zellveränderungen im Zusammenhang mit Seneszenz

Seneszente Zellen generieren einen bestimmten Phänotyp, anhand dessen die Identifikation seneszenter Zellen erleichtert wird. Charakteristisch für seneszente Zelle ist beispielsweise die dauerhafte Aktivierung einer DDR, die Aktivierung von CDK-Inhibitoren und eine verstärkte Sekretion proinflammatorischer Faktoren im Rahmen des SASP. Des Weiteren zeigen seneszente Zellen typische morphologische Veränderungen, eine veränderte Zusammensetzung der Plasmamembran, die Akkumulation von Mitochondrien und Lysosomen, sowie Abweichungen im Nukleus. Zusätzlich lassen sich in seneszenten Zellen auch Abweichungen im Zellmetabolismus feststellen. (Hernandez-Segura, Nehme and Demaria, 2018).

Die Entstehung eines SASP ist eines der Hauptmerkmale der Seneszenz. Dabei werden hauptsächlich Interleukine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Komponenten der extrazellulären Matrix sekretiert (Coppé *et al.*, 2010). Die Induktion des SASP kann zum einen über DDR erfolgen, zum anderen aber auch über NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*). NF- κ B fördert durch die Bindung an bestimmte Promotoren proinflammatorischer Gene wie Interleukin-6 (IL-6) und IL-8 deren Transkription, und trägt darüber zur Entstehung des SASP bei (Faget, Ren and Stewart, 2019). Die genaue Zusammensetzung der im Rahmen des SASP sekretierten Faktoren ist dabei abhängig vom seneszenten Zelltyp und der Seneszenzursache. Ebenso sind die jeweiligen Effekte des SASP auf die benachbarten Zellen vielfältig und unter anderem abhängig vom umgebenden Gewebe (Herranz and Gil, 2018).

Seneszente Zellen zeigen morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel eine Zunahme der Zellgröße bzw. eine Veränderung der Zellform. Diese Veränderungen kommen unter anderem durch eine verstärkte Produktion von Vimentinfilamenten zustande, welche in seneszenten Zellen beobachtet werden konnte (Nishio *et al.*, 2001). Neben morphologischen Veränderungen der Zelle selbst kommt es auch zu Veränderungen des Zellinhalts, zum Beispiel zu einem Anstieg des Anteils an lysosomalen Zellorganellen. Dies lässt sich durch eine verstärkte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (SA β -Gal), einem lysosomalen Enzym, nachweisen (Kurz *et al.*, 2000). Diese ubiquitäre Eigenschaft wird auch zum Nachweis seneszenter Zellen genutzt. Neben der Akkumulation von lysosomalen Organellen steigt in seneszenten Zellen auch der Anteil an mitochondrialer Masse (Korolchuk *et al.*, 2017). Durch die verstärkte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (PDH) kommt es in den Zellen zu einem vermehrten Umsatz von Pyruvat über den Citratzyklus, was sich durch die erhöhten Level reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) zeigt (Kaplun *et al.*, 2013). Bei den akkumulierenden Mitochondrien handelt es sich sehr wahrscheinlich um dysfunktionale Zellorganellen, da die Mitochondrien in seneszenten Zellen neben den erhöhten Werten für ROS auch ein vermindertes Membranpotenzial zeigen. Dieser Umstand wird auch als Seneszenz-assoziierte mitochondriale Dysfunktion (SAMD) bezeichnet (Passos *et al.*, 2007, 2010; Korolchuk *et al.*, 2017).

Im Verlauf der Seneszenzwerdung wird der zelluläre Metabolismus stark umprogrammiert, bleibt jedoch hoch aktiv. So steigt zum Beispiel das Verhältnis von AMP zu ATP als ein Indikator für einen zellulären Energiemangel, wodurch die AMP-abhängige Kinase (AMPK) aktiviert wird (Hernandez-Segura, Nehme and Demaria, 2018). Die Hauptfunktion von AMPK ist die Regulation des zellulären Energiehaushalts durch eine Reduktion ATP-verbrauchender Stoffwechselwege bzw. einer Steigerung ATP-generierender Stoffwechselwege wie zum Beispiel der Fettsäureoxidation (Carling, 2004). In seneszenten Zellen kann es zu einer Stabilisierung von p53 kommen, welches den Metabolismus seneszenten Zellen ebenfalls beeinflussen kann. In Abhängigkeit von p53 kommt es beispielsweise zu einer Verminderung der Glykolyse sowie zu einer Steigerung des Citratzyklus, der oxidativen Phosphorylierung sowie der Fettsäureoxidation (Maddocks and Vousden, 2011; Hernandez-Segura, Nehme and Demaria, 2018).

1.4.2.3 Seneszenz als Antwort auf DNA-Schäden

Die DDR als Antwort auf DNA-Schäden ist einer der Hauptgründe für den Weg von Zellen in die Seneszenz (McHugh and Gil, 2018; Schumacher *et al.*, 2021), wobei die Hauptaktivatoren der DDR vor allem DNA-Einzelstrangbrüche bzw. -Doppelstrangbrüche darstellen (d'Adda di Fagagna, 2008). Diese werden von spezialisierten Komplexen erkannt, welche zur Rekrutierung der Proteinkinasen ATM und ATR an die jeweiligen Stellen der DNA-Läsion führen (Shiloh, 2006; d'Adda di Fagagna, 2008). Während ATM primär durch DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) aktiviert wird, kann ATR von einer Vielzahl von DNA-Schäden aktiviert werden. Dazu gehören neben den DSBs auch Replikationsstress (Marechal and Zou, 2013). Nach der Rekrutierung von ATM und ATR an die Stellen der DNA-Läsionen kommt es zu einer ATM- und ATR-abhängigen Phosphorylierung der Histonvariante H2A.X an Serin 139, anschließend γ H2A.X genannt (Shiloh, 2003). Die Phosphorylierung von H2A.X führt zum einen zur Rekrutierung weiterer Reparaturenzyme, zum anderen aber auch in Form eines sich selbst

verstärkenden Mechanismus zur Rekrutierung weiterer ATM Komplexe, was die Aktivität von ATM steigert und so wiederum zu einer weiteren Generierung von γ H2A.X führt (Celeste *et al.*, 2002; d'Adda di Fagagna, 2008). Die Akkumulation von ATM und ATR über einen bestimmten Punkt hinaus ist dabei nötig, um weitere Schritte im Signalweg der DDR ablaufen zu lassen (d'Adda di Fagagna, 2008).

ATM beispielsweise phosphoryliert p53 an einem Serinrest, was zur Stabilisierung und Aktivitätssteigerung von p53 führt (Banin *et al.*, 1998; Shiloh, 2003). Neben der direkten Phosphorylierung von p53 führt ATM auch indirekt zu einer Aktivitätssteigerung von p53. ATM phosphoryliert und aktiviert dazu die Checkpoint Kinase Chk2, welche p53 ebenfalls an einem anderen Serinrest phosphoryliert, wodurch unter anderem dessen Abbau verhindert wird (Ryan, Phillips and Vousden, 2001; Shiloh, 2003). Anschließend kommt es zu einem p53-induzierten Zellzyklusarrest. Abhängig von ATM und Chk2 kommt es auch zu einer Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25A bzw. Cdc25C, was zu deren Degradation führt. Durch das fehlende Cdc25C kann CDK1 nicht mehr aktiviert werden, was den Übertritt aus der G2- in die M-Phase verhindert (Shiloh, 2003).

Während der DDR-Signalweg über ATM vor allem für die initiale Antwort auf DNA-Schäden verantwortlich ist, wird ATR erst später aktiviert und ist vor allem für die Aufrechterhaltung der Phosphorylierung von Zielsubstraten verantwortlich (Shiloh, 2003). ATR phosphoryliert und aktiviert dazu die Proteinkinase Chk1 an mehreren Serinresten (Zhao and Piwnicka-Worms, 2001). Wichtige Zielproteine von Chk1 sind dabei ebenfalls die bereits erwähnten Phosphatasen Cdc25A und Cdc25C. Chk1 bewirkt wie Chk2 eine Phosphorylierung und damit Inhibierung von Cdc25A bzw. Cdc25C, woraus in der Folge ein G2/M-Arrest oder S-Phasenarrest, in Abhängigkeit der nachfolgend inhibierten CDKs (Rundle *et al.*, 2017), resultieren kann.

1.4.2.4 Klinische Bedeutung von Seneszenz

Seneszente Zellen zeigen in der Klinik ein sehr heterogenes Spektrum an positiven sowie negativen Effekten bspw. auf die umliegenden Zellen. Auf der einen Seite haben seneszente Zellen z.B. einen antitumoralen Einfluss, indem sie mittels SASP und direkter Zell-Zell-Interaktion auch angrenzende Zellen in die Seneszenz treiben können (Acosta *et al.*, 2013; Schmitt, Wang and Demaria, 2022). Auf der anderen Seite tragen seneszente Zellen insb. im alternden Organismus zur Entstehung bzw. zum Fortschreiten bestimmter Erkrankungen wie Cholangiopathien oder der pulmonalen Fibrose bei (Schafer *et al.*, 2017; Ferreira-Gonzalez *et al.*, 2018). Auch im Rahmen einer Chemotherapie-induzierten

Seneszenz kann es im Langzeitverlauf zu negativen Folgen wie dem verfrühten Auftreten bspw. kardiopulmonaler Erkrankungen kommen (Demaria *et al.*, 2017; Schmitt, Wang and Demaria, 2022). Um die negativen Folgen der Seneszenzinduktion vermeiden bzw. abmildern zu können gibt es therapeutische Anstrengungen, wie z.B. die Entwicklung von Senolytika bzw. Senomorphika, welche sich z.T. bereits in klinischen Studien befinden (Wang, Lankhorst and Bernards, 2022). Während die Senolytika auf eine direkte Eliminierung der seneszenten Zellen abzielen, ist es das Ziel der Senomorphika, die Ausschüttung von Faktoren des SASP zu reduzieren (Schmitt, Wang and Demaria, 2022).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Der veränderte Metabolismus von Krebszellen birgt die Möglichkeit einer selektiven Intervention. Ziel dieser Arbeit ist es, eine Kombination von metabolischen Inhibitoren zu identifizieren, welche primär auf Krebszellen wirkt. Hierfür wird ein schon bestehendes zelluläres Modell verwendet, bei dem nicht-krebsartige Eierstockzellen zu krebsartigen Eierstockzellen entartet wurden. Im Anschluss daran soll die identifizierte Inhibitor-Kombination auf phänotypischer und funktionaler Ebene charakterisiert werden. Diese Ergebnisse sollen die Grundlage für weitere Studien schaffen, um langfristig Patientinnen mit HGSOE zusätzliche und auf neuen Wirkprinzipien beruhende Therapieoptionen zu ermöglichen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Name	Konzentration	Selektion	Hersteller
Penicillin/ Streptomycin	100 U/mL / 100 µg/mL	Prokaryoten	Thermo Fischer

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Zielprotein (Klon Nr.)	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Caspase 3 (9662)	Kaninchen mAb	Cell Signaling	1:1000
Cleaved Caspase-3 (9664)	Kaninchen mAb	Cell Signaling	1:1000
Chk2 T68ph (C13C1)	Kaninchen pAb	Cell Signaling	1:1000
ERK1/2 T202/Y204ph	Kaninchen mAb	Cell Signaling	1:2000
Cyclin B1 (V152)	Maus mAb	Cell Signaling	1:2000
H2A.X S139ph (JBW301)	Maus mAb	Millipore	1:1000
Histon H3	Kaninchen pAb	Abcam	1:5000
p16 (G175-1239)	Maus mAb	BD Biosciences	1:500
p21WAF1 (EA10)	Maus mAb	Calbiochem	1:1000
p38 T180/Y182ph	Kaninchen pAb	Cell Signaling	1:1000
Vinculin	Maus mAb	Sigma	1:1000
α-Tubulin (12G10)	Maus mAb	DSHB	1:1000
β-Aktin	Kaninchen pAb	Abcam	1:1000
β-Tubulin (E7)	Maus mAb	DSHB	1:1000

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Ziel (Klon)	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Maus IgG	HRP	Dianova	1:5000
Ziege-anti-Hase IgG	HRP	Dianova	1:5000
Ziege-anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	Dianova	1:5000
Ziege-anti-Hase IgG	Alexa Fluor 594	Dianova	1:5000

2.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
2-propanol (Isopropanol)	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Merck/Sigma
5-bromo-4-chloro-3-indoyl β -D-galactopyranosid (X- β Gal)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck/Sigma
Aprotinin	Merck/Sigma
beta-Mercaptoethanol	Roth
Bromphenol Blau	Merck/Sigma
Dimehylsulfoxid (DMSO)	Merck/Sigma
Ethanol	Merck/Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck/Sigma
Formaldehyd	Roth
Glutardialdehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hoechst 33342	Thermo Fischer
Igepal CA-630	Merck/Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kalium-Hexacyanoferrat (II) Trihydrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	ICN Biomedicals
Kalium-Hexacyanoferrat (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	Merck/Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck/Sigma
Kristallviolett ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$)	Sigma
Leupeptin	Merck/Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck/Sigma
Methanol	Sigma
MitoSOX™ Rot Reagenz	Thermo Fischer
Mowiol 4-88	Merck/Sigma
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natrium orthovanadat (Na_3VO_4)	Merck/Sigma
Natriumazid (NaN_3)	Merck/Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck/Sigma

Natriumdeoxycholat	Merck/Sigma
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
Natriumfluorid (NaF)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Merck/Sigma
Propidiumiodid (PI)	Merck/Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck/Sigma
Trypan-Blau	Merck/Sigma
Tween 20	Gerbu
Zitronensäure	Merck/Sigma

2.1.4 Enzyme

Name	Hersteller
RNase A	Thermo Fischer
Trypsin/0.05% (v/v) EDTA	Life Technologies

2.1.5 Eukaryotische Zelllinien

Name	Zelltyp	Quelle
Empty Vector	iFTSEC transduziert mit pLenti CMV Blast empty (w263-1)	J. Dreute (Addgene Plasmid#: 17486)
H1975	humane Lungenadenokarzinomzellen (NSCLC)	M.L. Schmitz
HCT-116	humane Colonkarzinomzellen	M.L. Schmitz
HeLa	humane Cervixkarzinomzellen	M.L. Schmitz
HT-29	humane Colonkarzinomzellen	M.L. Schmitz
iFTSEC	immortalisierte sekretorische Epithelialzellen des Eileiters (hTERT;shp53;CDK4 ^{R24C})	Karst and Drapkin et al. (PMID: 21502498)
LN229	humane Glioblastomzellen	M.L. Schmitz
MCF-7	humane Mammakarzinomzellen	M.L. Schmitz

KRAS ^{G12V} /MYC	iFTSEC (Kras ^{G12V} ;c-MYC) transduziert mit pLenti CMV Kras ^{G12V} -P2A-c-MYC Blasti	J. Dreute
OVCAR4	humane Ovarialkarzinomzellen	E. Pogge von Strandmann
PC9	humane Lungenadenokarzinomzellen (NSCLC)	M.L. Schmitz
RPE-1	immortalisierte humane retinale Pigmentepithelzellen	M.L. Schmitz
SW620	humane Colonkarzinomzellen	M.L. Schmitz
U2OS	humane Osteosarkomzellen	M.L. Schmitz

2.1.6 Inhibitoren/Aktivatoren

Name	Wirkmechanismus	Bestandskonzentration	Hersteller
(±)-3-Methyl-2-oxovaleriansäure Natriumsalz	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Substrat	100 mM	Merck/Sigma
Antimycin A	Komplex III-Inhibitor	1 μM	Agilent
AZD3965	MCT1-Inhibitor	1 mM	Selleckchem
BCH	LAT1-Inhibitor	10 mM	Tocris
BMS-986205	IDO1-Inhibitor	10 mM	MedChemExpress
CB-839	Glutaminase-Inhibitor	5 mM	Selleckchem
Cytochalasin B	GLUT-Inhibitor	5 mM	Santa Cruz
Dichloracetat	PDK-Inhibitor	190 mM	Merck/Sigma
Eflornithin	ODC-Inhibitor	1 mM	Tocris
Etomoxir	CPT1-Inhibitor	100 mM	Merck/Sigma
Etoposid	Topoisomerase-II-Inhibitor	10 mM	Biotrend
H3B-120	CPS1-Inhibitor	10 mM	Merck/Sigma
Indoximod	IDO-/TDO-Inhibitor	1 mM	Selleckchem
Metformin	AMPK-Aktivator	200 mM	Invivogen
PFK15	PFKFB3-Inhibitor	10 mM	Merck/Sigma
(R)-GNE-140	LDHA/B-Inhibitor	10 mM	MedChemExpress
TVB-2640	FASN-Inhibitor	1 mM	Merck/Sigma

V-9302	ASCT2-Inhibitor	10 mM	MedChemExpress
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	MCT1-Inhibitor	10 mM	Merck/Sigma

2.1.7 Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce

2.1.8 Verbrauchsmaterial und sonstige Reagenzien

Name	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck/Sigma
DMEM, high glucose + GlutaMAX	Life Technologies
DMEM/Ham's-F-12 + GlutaMAX	Life Technologies
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Magermilchpulver	Merck/Sigma
RPMI 1640 + GlutaMAX	Life Technologies
Western Lightning ECL Lösungen	Perkin Elmer
Zellkulturmaterialien	Sarstedt
Zellkultur 96-Well-Platte	Greiner-Bio-One

2.1.9 Software

Name	Verwendung
BD CellQuestPro	Generierung und Analyse von FACS-Daten
Fiji	Analyse und Bearbeitung von Bildern
GraphPad Prism9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)	Erstellen von Graphen und Abbildungen
MS-Office	Datenaufbereitung
NIS Elements AR 3.00	Bilderfassung

2.1.10 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders aufgeführt, in frisch deionisiertem Milli-Q-Wasser angesetzt. Die jeweilige Pufferzusammensetzung wird im Folgenden immer zu Beginn der zugehörigen Methode im Methodenteil beschrieben. Für Experimente in der Zellkultur wurde autoklaviertes Milli-Q-Wasser verwendet.

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 Lentivirale Transduktion zur Generierung der verwendeten Zelllinien

Um Untersuchungen über das Verhalten von Krebszellen machen zu können, wurden Zellen einer immortalisierten Zelllinie, *immortalized fallopian tube secretory epithelial cells* (iFTSEC), als Ausgangszellen für die folgenden Versuche verwendet. Diese Zellen wurden von Jan Dreute im Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen mittels einer lentiviralen Transduktion so modifiziert, dass sie stabil die Gene für KRAS und MYC exprimieren und somit die in Absatz 2.1.5 erwähnte Krebszelllinie KRAS^{G12V}/MYC darstellen. Um einen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf das Verhalten der Krebszellen auszuschließen, wurden die iFTSEC von Jan Dreute erneut mittels einer lentiviralen Transduktion modifiziert, wobei die verwendeten Plasmide dieses Mal nicht die erwähnten Gene KRAS und MYC enthielten. Die dadurch generierten *Empty Vector* (EV) Zellen dienten in den folgenden Versuchen als Kontrollzellen gegenüber der KRAS^{G12V}/MYC Zellen.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Zellkultur und Zellzählung

PBS:	137 mM NaCl; 1.5 mM KH ₂ PO ₄ ; 2.7 mM KCL; 8.0 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
DMEM (suppl.):	DMEM mit 4.5 g/L Glucose; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
DMEM/Ham's-F-12 (suppl.):	DMEM/Ham's-F-12; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
RPMI 1640 (suppl.):	RPMI; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und einer atmosphärischen CO₂-Konzentration von 5% in 75 cm² sowie in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Für das Wachstum der Zellen wurde abhängig von der Zelllinie das Medium entspr. der Tabelle 1 verwendet, wobei die

Zellen alle 2-3 Tage in frisches Medium passagiert wurden. Für die Passage von Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Grund der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinierung wurde anschließend durch Zugabe des entsprechenden Mediums gestoppt. Die jetzt inadhärenten Zellen wurden in den nun in dem in der Zellkulturflasche vorhandenen Medium aufgenommen und in ein Falcon überführt. Ein Teil der Zellsuspension wurden im Anschluss gemeinsam mit frischem Medium in eine neue 175 cm² Zellkulturflasche überführt und erneut für 2-3 Tage kultiviert.

Tabelle 1: Kultivierungsmedien der unterschiedlichen Zelllinien

Name	Kultivierungsmedium
Empty Vector	DMEM/Ham's-F12
H1975	DMEM
HCT-116	DMEM
HeLa	DMEM
HT-29	RPMI 1640
iFTSEC	DMEM/Ham's-F12
LN229	DMEM
MCF-7	DMEM
KRAS ^{G12V} /MYC	DMEM/Ham's-F12
OVCAR4	RPMI 1640
PC9	DMEM
RPE-1	DMEM/Ham's-F12
SW620	RPMI 1640
U2OS	DMEM

Zur Aussaat einer definierten Zellmenge erfolgte eine Zählung der Zellzahl. Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL Trypan-Blau-Farbstoff gemischt und im automatisierten Zellzähler LUNA-IITM (Logos Biosystems) gezählt, wobei die Zählung auf dem Trypan-Blau-Ausschlussverfahren basiert. Im Rahmen der Zellzählung wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, Raumtemperatur, 3 Minuten) und der Überstand im Anschluss abgenommen. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde anschließend mit dem entsprechenden Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/mL eingestellt.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Einfrier-Medium: 10% (v/v) DMSO in FCS

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurde nach den oben genannten Waschschrritten ein durch Zentrifugation generiertes Zellpellet in Einfrier-Medium resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Dieses wurde anschließend zuerst bei -80 °C eingefroren und nach 24 Stunden in einen -150 °C-Schrank überführt. Die bei -150 °C in Kryo-Röhrchen eingefrorenen Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend mit 10 mL des entsprechenden Mediums vermischt. Das im Einfrier-Medium enthaltene DMSO wurde durch Zentrifugation (300 x g, Raumtemperatur, 3 Minuten) mit anschließender Resuspendierung des Zellpellets in der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Medium entfernt. Die Zellsuspension wurde dann in eine neue Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C kultiviert.

2.3.3 Proteinextraktion

RIPA-Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7.4); 150 mM NaCl;
0.5% (w/v) Na-Deoxycholat; 0.1% (w/v) SDS;
1% (v/v) Igepal CA-630; 1 mM EDTA
frisch hinzugefügt: 10 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 10 µg/mL
Aprotinin; 5 µg/mL Leupeptin; 1 mM PMSF

5x SDS Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl (pH 6.8); 10% (w/v) SDS;
40% (v/v) Glycerin; 15% (v/v) β-Mercaptoethanol;
0.1% (w/v) Bromphenol Blau

Zur Präparation von Proteinextrakten wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen und anschließend mittels eines Zellschabers geerntet. Nach der folgenden Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 2 Minuten) wurde das Zellpellet in RIPA-Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Menge des verwendeten RIPA-Puffers entsprach dabei in etwa dem 5-fachen Volumen des vorhandenen Zellpellets. Im Anschluss wurde das Lysat zuerst erneut zentrifugiert (16.000 x g, 4 °C, 15 Minuten) und anschließend zum weiteren Zellaufschluss sonifiziert. Entsprechend der Herstellerinformationen wurde nachfolgend die Proteinkonzentration der jeweiligen Lysate durch Verwendung des BCA Protein Assay Kits (ThermoFischer) bestimmt. Zur Generierung einer definierten Proteinkonzentration pro µL Lysat wurde das vorhandene Zelllysate anschließend mit

RIPA-Puffer verdünnt und mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt. Durch das anionische Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt (ca. 1.4 μg SDS pro 1 μg Protein), was zu einer insgesamt negativen Ladung der Proteine führt. Abschließend wurde das Zelllysate durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

2.3.4 Zellzyklus-Analyse

PI-Färbelösung: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propidiumiodid; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A;
0.1% (v/v) Triton-X-100 in PBS

Die Verteilung des Zellzyklus innerhalb einer Zellpopulation wurde in einem FACSCalibur (BD Biosciences) Durchflusszytometer mittels einer Propidiumiodid (PI)-Färbung analysiert. PI interkaliert in die DNA und emittiert dabei ein rotes Fluoreszenzsignal, welches direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge ist. Da der DNA-Gehalt innerhalb einer Zelle während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus variiert ($G_0/G_1 < S < G_2/M$), erlaubt die detektierte Fluoreszenzintensität einen Rückschluss auf den Anteil der sich in der jeweiligen Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen in 10 cm Schalen kultiviert. Am Ende der jeweiligen Behandlungsdauer wurden die Zellen mit Trypsin aus den Schalen geerntet und in PBS aufgenommen. Nach der folgenden Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 3 Minuten) wurde das Zellpellet in 300 μL PBS resuspendiert, anschließend wurde zur Zellfixierung 1 mL 70% (v/v) Ethanol hinzugegeben. Um die Entstehung von Zellaggregaten zu vermeiden, wurde das Ethanol tropfenweise und unter ständiger Durchmischung hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit der Zellen von mindestens 1 Stunde bei 4 °C wurde das Ethanol mit PBS ausgewaschen, anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (300 x g, 4 °C, 3 Minuten) und das entstandene Zellpellet in 300 μL bzw. 500 μL PI-Färbelösung resuspendiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen lichtgeschützt für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion anschließend durch das Lagern der Proben auf Eis abgestoppt. Das PI-Signal wurde im Durchflusszytometer im roten Farbkanal (FL2) detektiert und die entstandenen Daten mittels der BD CellQuestPro Software aufgezeichnet und evaluiert.

2.3.5 Messung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

MitoSOX™-Färbelösung: 5 μ M MitoSOX™-Lösung in PBS

Zur Bestimmung der Level mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden die Zellen mit dem MitoSOX™-Fluoreszenzfarbstoff (ThermoFisher) gefärbt. Der zellmembranpermeable Farbstoff akkumuliert in Mitochondrien, wo er von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert wird. Dies lässt sich durch ein rotes Fluoreszenzsignal detektieren. Um die mitochondrialen ROS-Level zu bestimmen, wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend durch Trypsinierung geerntet. Nach der Aufnahme in Medium und nachfolgender Zentrifugation (3 x 300 g, Raumtemperatur, 3 Minuten) wurde das entstandene Zellpellet in 300 μ L Medium resuspendiert. Anschließend wurde eine 5 μ M MitoSOX™-Färbelösung hinzugegeben und die Zellen lichtgeschützt für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (250 x g, Raumtemperatur, 3 Minuten) und das Zellpellet in 300 μ L PBS aufgenommen. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal im Durchflusszytometer detektiert und die entstandenen Daten mittels der BD CellQuestPro Software aufgezeichnet und evaluiert.

2.3.6 Messung der Zellseneszenz

Fixierlösung: 2% (v/v) Formaldehyd; 0.2% (v/v) Glutardialdehyd
X-gal Färbelösung: 20 mM Zitronensäure; 40 mM Natriumhydrogensulfat;
150 mM NaCl; 5 mM Kalium-Hexacyanoferrat (II)
Trihydrat; 5 mM Kalium-Hexacyanoferrat (III);
2 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat; 1 mg/ml X-gal

Die Messung der Zellseneszenz erfolgte über eine Färbemethode, welche die Aktivität der β -Galaktosidase anzeigt, einem lysosomalen Enzym, dessen Expression in seneszenten Zellen deutlich ansteigt. Die zuvor in 6 bzw. 12-Well-Platten ausgesäten und dem Experiment entsprechend behandelten Zellen wurden zu Beginn der Färbung zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 3 Minuten in der Fixierlösung inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C unter CO₂-Ausschluss in der Färbelösung inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut zwei Mal in PBS und anschließend einmal in Methanol gewaschen. Die folgende

Trocknung der Platten erfolgte bei Raumtemperatur. β -Galaktosidase-positive Zellen konnten im Anschluss durch den Nachweis einer Blaufärbung im Lichtmikroskop detektiert werden.

2.3.7 Messung der Zellviabilität

Kristallviolett-

Färbelösung: 0.5% (w/v) Kristallviolett in 25% (v/v) Methanol

SDS-Pufferlösung: 2% (w/v) SDS

Zur Messung der Zellviabilität wurde eine Kristallviolett-Färbung durchgeführt, wobei der Farbstoff alle noch in der Well-Platte adhärenen Zellen anfärbt. Zu Beginn wurden die zuvor in 96-Well-Platten ausgesäten und entsprechend vorbehandelten Zellen auf Eis gelagert und zwei Mal in kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Fixierung in -20°C kaltem Methanol, welches am Ende der Inkubationszeit vorsichtig aus den Platten geklopft wurde. Nachdem die 96-Well-Platten ausreichend getrocknet waren, erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit der Kristallviolett-Färbelösung, welche anschließend durch 3-maliges Waschen in deionisiertem Wasser wieder aus den Platten herausgewaschen wurde. Nach erneuter ausreichender Trocknung der Platten wurde die Kristallviolett-Färbung durch eine 30-minütige Inkubation der Zellen in $150\ \mu\text{L}$ SDS-Pufferlösung wieder aus den Zellen herausgelöst. Bei allen Pipettierschritten wurde darauf geachtet, die Lösung nicht direkt auf die Zellen zu pipettieren. Die Farbstoffmenge konnte anschließend anhand der Absorption des Kristall-Violett Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 600 nm im GloMax[®]-Photometer (Promega) gemessen werden.

2.3.8 Immunfluoreszenz

Fixierlösung: 3.7% (v/v) Formaldehyd in PBS

Permeabilisierungs-

/Blockier-Lösung: 3% (w/v) BSA; 0.3% (v/v) Triton in PBS

Wasch-Lösung: 0.3% (v/v) Triton in PBS

Antikörperlösung

(1:1000): Siehe Permeabilisierungs-/Blockierlösung

Mowiol Mounting

Medium: 67 mM Tris/HCl; 33.4% (v/v) Glycerin;
13.4% (w/v) Mowiol 4-88

Die Immunfluoreszenz diente der Darstellung der intrazellulären Lokalisation und des Vorkommens individueller Proteine. Die Zellen wurden dazu in 6-Well-Platten auf 18 mm großen Deckgläschen ausgesät und dem geplanten Experiment entsprechend behandelt. Am Ende des gewünschten Behandlungszeitraums wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in der Fixierlösung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS folgte eine 30-minütige Inkubation in der Permeabilisierungslösung. Nach dem Absaugen der Permeabilisierungslösung wurden 100 μ L der Primärantikörperlösung auf die Zellen gegeben, in welcher die Zellen im Anschluss über Nacht bei 4 °C inkubierten. Am nächsten Tag wurden die Zellen zu Beginn zwei Mal für 1 bzw. für 15 Minuten in der Wasch-Lösung gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation in der Sekundärantikörperlösung unter Lichtausschluss für 1 Stunde. Nachfolgend wurden die Zellen erneut zwei Mal wie bereits beschrieben in der Wasch-Lösung gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Inkubation und Anfärbung der Zellen mit 100 μ L PBS, welches 1 μ g/mL Hoechst 33342 enthielt. Die Hoechst-Lösung wurde nachfolgend durch 10-minütiges Waschen der Zellen in PBS wieder entfernt und die Deckgläschen anschließend mit Mowiol Mounting Medium auf Objektträgern befestigt. Nachdem die Deckgläschen auf den Objektträgern über Nacht ausgehärtet waren, konnten Bilder am Eclipse TE2000-E Mikroskop (Nikon) mittels der NIS Elements AR 3.00 Software (Nikon) in der gewünschten Vergrößerung aufgenommen werden.

2.3.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Fixierlösung: 1.5% (v/v) Glutardialdehyd; 1.5% (v/v) Formaldehyd;
0.15 M HEPES/KOH

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde zur Herstellung hoch-auflösender Einzelzellbilder durchgeführt. Vor der Durchführung der TEM wurde die Zellen entsprechend des Experimentierplans in 10 cm Schalen behandelt. Am Ende des Behandlungszeitraums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Nach der folgenden Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 2 Minuten) wurde das entstandene Zellpellet in der Fixierlösung resuspendiert und anschließend bis zur Einbettung bei 4 °C gelagert. Die Präparation der Proben erfolgte im Anschluss durch Tamara Papadakis (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen). Die mittels eines Reichert Ultracut E Ultramicrotome

(Leica Microsystems) hergestellten Ultradünnschnitte der Zellen wurden anschließend in einem Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss AG) begutachtet. Die folgende Analyse der TEM erfolgte in Kooperation mit PD Dr. Ulrich Gärtner (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen).

2.3.10 Inhibitor-Selektion

Um den zytotoxischen Effekt verschiedener Inhibitoren beurteilen zu können, wurden Zellen in einer Dichte von 500 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und anschließend am nächsten Tag wie in Tabelle 2 beschrieben mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. Bei der Behandlung wurden alle Inhibitoren untereinander jeweils in einer Zweierkombination miteinander kombiniert. Nach einem Behandlungszeitraum von 72 Stunden wurde der zytotoxische Effekt der Inhibitorkombination mittels eines Zellviabilitäts-Assays (siehe Seite 31) überprüft und anschließend mit GraphPad Prism9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) interpretiert und ausgewertet.

Tabelle 2: Pipettierschema der Inhibitor-Selektion

Substanz	Lösungsmittel	Bestandskonzentration	Behandlungskonzentration
(±)-3-Methyl-2-oxovaleriansäure Natriumsalz	H ₂ O	100 mM	1 mM
AZD3965	DMSO	1 mM	5 µM
BCH	DMSO	10 mM	10 µM
BMS-986205	DMSO	10 mM	6 µM
CB-839	DMSO	5 mM	10 µM
Cytochalasin B	DMSO	5 mM	0.2 µM
Dichloracetat	DMSO	190 mM	1 mM
Eflornithin	H ₂ O	1 mM	60 µM
Etomoxir	DMSO	100 mM	50 µM
H3B-120	DMSO	10 mM	20 µM
Indoximod	DMSO	1 mM	2 µM
Metformin	H ₂ O	200 mM	10 mM
PFK15	DMSO	10 mM	0.75 µM
(R)-GNE-140	DMSO	10 mM	7.5 µM
TVB-2640	DMSO	1 mM	0.3 µM

V-9302	DMSO	10 mM	3 μ M
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	H ₂ O	10 mM	1 mM

2.3.11 Inhibitor-Testung auf verschiedenen Krebszelllinien

Um den zytotoxischen Effekt ausgewählter Inhibitoren auf verschiedenen Krebszelllinien beurteilen zu können, wurden Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät (Zellzahl/Well in Tabelle 3 enthalten) und anschließend am nächsten Tag wie in Tabelle 3 beschrieben behandelt. Nach einem Behandlungszeitraum von 72 Stunden wurde der zytotoxische Effekt der Inhibitorkombination mittels eines Zellviabilitäts-Assays (siehe Abschnitt 2.3.7) überprüft und anschließend mit GraphPad Prism9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) interpretiert und ausgewertet.

Tabelle 3: Pipettierschema der Inhibitor-Testung auf verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl/Well	Behandlungs- konzentration (R)-GNE-140	Behandlungs- konzentration BMS-986205
H1975	4500	30 μ M	2.5 μ M
HCT-116	3000	20 μ M	8 μ M
HeLa	1500	15 μ M	10 μ M
HT-29	4500	20 μ M	6 μ M
LN229	4500	20 μ M	20 μ M
MCF-7	3000	15 μ M	6 μ M
OVCAR4	1500	7.5 μ M	6 μ M
PC9	4500	10 μ M	10 μ M
RPE-1	1000	8 μ M	15 μ M
SW620	4500	10 μ M	6 μ M
U2OS	3000	30 μ M	10 μ M

2.4 Methoden der Biochemie

2.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Sammelgel:	4% (v/v) Acrylamid; 125 mM Tris/HCl (pH 6.8); 0.1% (w/v) SDS; 0.1% (v/v) APS; 0.1% (v/v) TEMED
Trenngel:	6-15% (v/v) Acrylamid; 375 mM Tris/HCl (pH 8.8); 0.1% (w/v) SDS; 0.05% (v/v) APS; 0.05% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 1% (w/v) SDS

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) erlaubt eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einer Acrylamid-Gelmatrix. Die durch die Zellyse (siehe Abschnitt 2.3.3) generierten Lysate wurden zu Beginn zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Denaturierung durch Erhitzen und das Überdecken der Eigenladung der Proteine mithilfe des negativ geladenen SDS führten zu einer Linearisierung der Proteine. Für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese wurden zwei unterschiedliche Gele verwendet. Durch das obere Sammelgel wurden die Proteine aufkonzentriert und konnten so alle gleichzeitig in das untere Trenngel einlaufen. Die Aufkonzentrierung der Proteine erfolgte hierbei durch die im Laufpuffer enthaltenen Glycin-Ionen. In die beiden äußeren Sammelgeltaschen wurde ein vorgefärbter Molekulargewicht-Marker aufgeladen, welcher als Referenz für das Molekulargewicht der Proteinbanden diente. Im unterhalb des Sammelgels gelegenen Trenngel konnten die Proteine nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, wobei die Auftrennung abhängig von der Porengröße des Trenngels war. Die Porengröße des Trenngels wurde durch den Acrylamidanteil der Gelmatrix bestimmt (siehe Tabelle 4). Die Gelelektrophorese wurde im Anschluss mit einer konstanten Spannung von 85 V über 2.5 Stunden durchgeführt.

Tabelle 4: Gelprozentigkeit abhängig von der Proteingröße

Molekulargewicht [kDa]	Acrylamidanteil [%]
12-45 kDa	15%
10-70 kDa	12.5%
15-100 kDa	10%
25-200 kDa	8%

2.4.2 Western-Blot und Immundetektion

Transfer-Puffer:	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0.04% (w/v) SDS
TBS-T (<i>Tris Buffered Saline</i>):	25 mM Tris; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM CaCl ₂ ; 0.1 mM MgCl ₂ ; 0.1% (v/v) Tween 20
Blockpuffer:	5% (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBS-T
Primärantikörperlösung:	1% (w/v) Magermilchpulver oder 2% (w/v) BSA in TBS-T; 0.05% (v/v) NaN ₃
Sekundärantikörper- lösung:	1% (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBS-T

Nach der SDS-PAGE folgte die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidene Difluorid) Membran unter semi-dry Western-Blot Bedingungen bei einer konstanten Spannung von 24 V über 2.5 Stunden in einer Bio-Rad Blot-Kammer. Das für die Übertragung notwendige sogenannte Western-Blot Sandwich bestand dabei von unten nach oben aus folgenden Schichten: Anode – 2x Whatman Papier – PVDF Membran – SDS-Gel – 1x Whatman Papier – Kathode. Um die Proteine korrekt aufnehmen zu können, wurde die PVDF-Membran vor dem Übertrag für 30 Sekunden mit Methanol aktiviert. Nach dem Proteintransfer wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der PVDF-Membran mit Magermilch- oder BSA-Blockpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Membranen in der Primärantikörperlösung für 16 Stunden bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nachfolgend wurden die Membranen erneut drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die anschließende Proteindetektion erfolgte mittels des ChemiDoc Touch imaging Systems (Bio-Rad), wobei eine frisch vorbereitete enhanced chemiluminescence Lösung (ECL) zur Detektion verwendet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Testung metabolischer Inhibitoren auf Ovarialkarzinomzellen

3.1.1 Einzelne Metabolismus-Inhibitoren zeigen zytotoxische Effekte

Um neue und platinunabhängige Therapiemöglichkeiten von Ovarialkarzinomen zu erforschen, wurden Kombinationen von Inhibitoren unterschiedlicher metabolischer Wege auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen getestet (siehe Pipettierschema in Abschnitt 2.3.10). Um zunächst geeignete Konzentrationen für insgesamt 17 Inhibitoren zu ermitteln, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven anhand eines Zellviabilitätstests erstellt (siehe Anhang, Abb. 24). Anschließend wurden Kombinationen aus jeweils 2 Inhibitoren auf ihre Effektivität hin untersucht. Die Inhibitoren wurden dabei in subletalen Konzentrationen (IC₇₅) eingesetzt. Bei 2 Wirkstoffstoffkombinationen aus (R)-GNE-140 und Metformin bzw. aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 konnte eine erhöhte Zytotoxizität über den additiven Effekt hinaus festgestellt werden (Abb. 7).

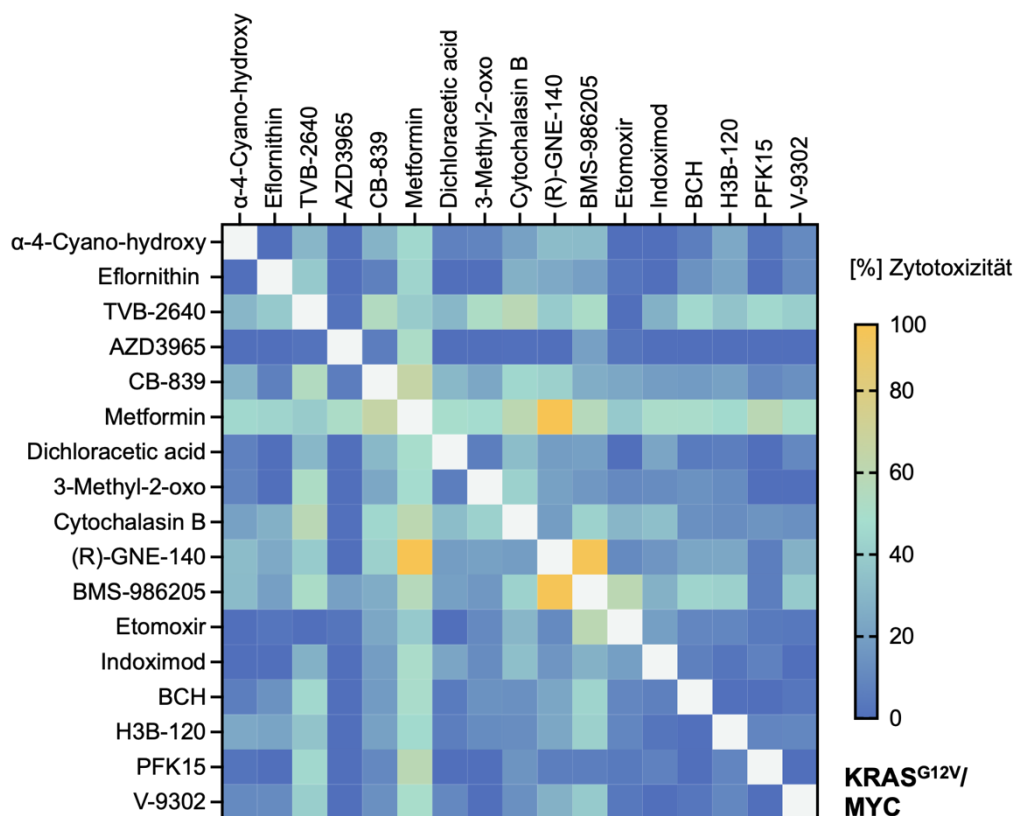


Abb. 7: Wirkstoff-Screening auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit 2 Treffern bei insgesamt 136 Kombinationen von Metabolismus-Inhibitoren. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Abb. 7 (Fortsetzung): Wirkstoff-Screening auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit 2 Treffern bei insgesamt 136 Kombinationen von Metabolismus-Inhibitoren. Subletale Konzentrationen der angegebenen Wirkstoffe wurden miteinander kombiniert und die synergistische Zytotoxizität [%] nach einer Inkubationszeit von 72 h mittels eines Kristallviolett-Zellviabilitätstests quantifiziert. Wirkstoffkonzentrationen und Pipettierschema sind in Tabelle 3 in Abschnitt 2.3.10 zu finden.

Zur genaueren Charakterisierung des Effekts dieser Kombinationen wurden beide Kombinationen, neben der Testung auf den KRAS^{G12V}/MYC Zellen, auch auf den nicht onkogen transformierten *Empty Vector* (EV) Kontrollzellen getestet. Es wurde deutlich, dass die Kombination von (R)-GNE-140 und BMS-986205 im Vergleich zur Kombination von (R)-GNE-140 und Metformin eine höhere Selektivität für die KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen aufweist (Abb. 8). Aufgrund dieser Selektivität wurde die Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 im Folgenden genauer charakterisiert.

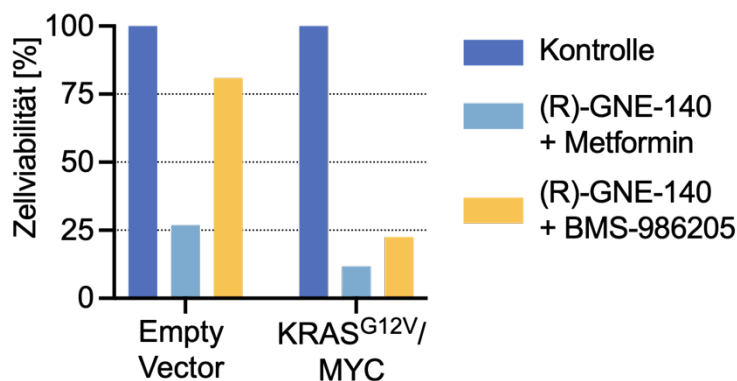


Abb. 8: Die Kombinationsbehandlung aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigt eine selektive Zytotoxizität gegenüber KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen. Die subletalen Konzentrationen der beiden angegebenen Medikamentenkombinationen ((R)-GNE-140 7.5 µM; BMS-986205 6 µM; Metformin 10 mM) wurden auf *Empty Vector* Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen getestet und der zytotoxische Effekt nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mittels eines Kristallviolett-Zellviabilitätstests quantifiziert.

3.1.2 Synergistischer zytotoxischer Effekt von (R)-GNE-140 und BMS-986205 unter verschiedenen Bedingungen

Zur Überprüfung des zytotoxischen Effekts der Kombination des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205, wurde die entsprechende Kombination auf 3 unterschiedlichen Zellsystemen getestet. Neben den schon bereits untersuchten Krebszellen (KRAS^{G12V}/MYC) und den Kontrollzellen (*Empty Vector*) wurden auch die nicht transfizierten Ausgangszellen (iFTSEC) getestet. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationstherapie im Vergleich mit dem kalkulierten additiven Effekt der

(R)-GNE-140 und BMS-986205 Einzelbehandlung bei der Doppelbehandlung synergistisch wirkt (Abb. 9). Die größte zytotoxische Wirkung zeigte die Kombinationsbehandlung jedoch auf die KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen, hier wiesen bereits die Einzelsubstanzen zytotoxische Wirkungen auf. Zudem zeigte sich, dass die *Empty Vector* Zellen sowie die eigentlichen gesunden iFTSEC Kontrollzellen weitgehend identisch auf die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 reagieren, weshalb im Folgenden die *Empty Vector* Zellen als alleinige Kontrolle der KRAS^{G12V}/MYC Zellen verwendet wurden.

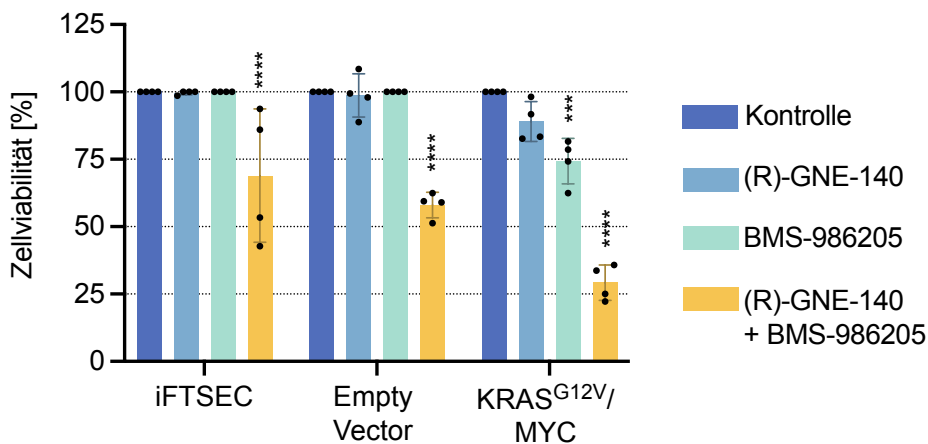


Abb. 9: Die zytotoxische Wirkung der Kombination aus dem LDHA-Inhibitor (R)-GNE-140 und dem IDO1-Inhibitor BMS-986205 bleibt auch bei der Behandlung verschiedener Zelllinien weitgehend synergistisch. Die Zytotoxizität der Einzel- sowie Doppelbehandlung von (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) wurde auf iFTSEC (3000 Zellen/Well), Empty Vector (3000 Zellen/Well) und KRAS^{G12V}/MYC Zellen (1500 Zellen/Well) untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden erfolgte die Quantifizierung mittels eines Kristallviolett-Zellviabilitätstests. Gezeigt wird der Mittelwert ± SD von 4 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung im Vergleich zur Kontrolle erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse nach Dunnett (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

Um weiterhin zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt der Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 auch unter veränderten experimentellen Bedingungen auftritt, wurden Versuche mit veränderter Zelldichte und Behandlungsdauer durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der synergistische Effekt der genannten Kombinationstherapie unabhängig von der ausgesäten Zellzahl (500 Zellen/Well bzw. 5000 Zellen/Well) oder Behandlungsdauer (72 h bis 120 h) weitgehend unverändert bleibt (Abb. 10).

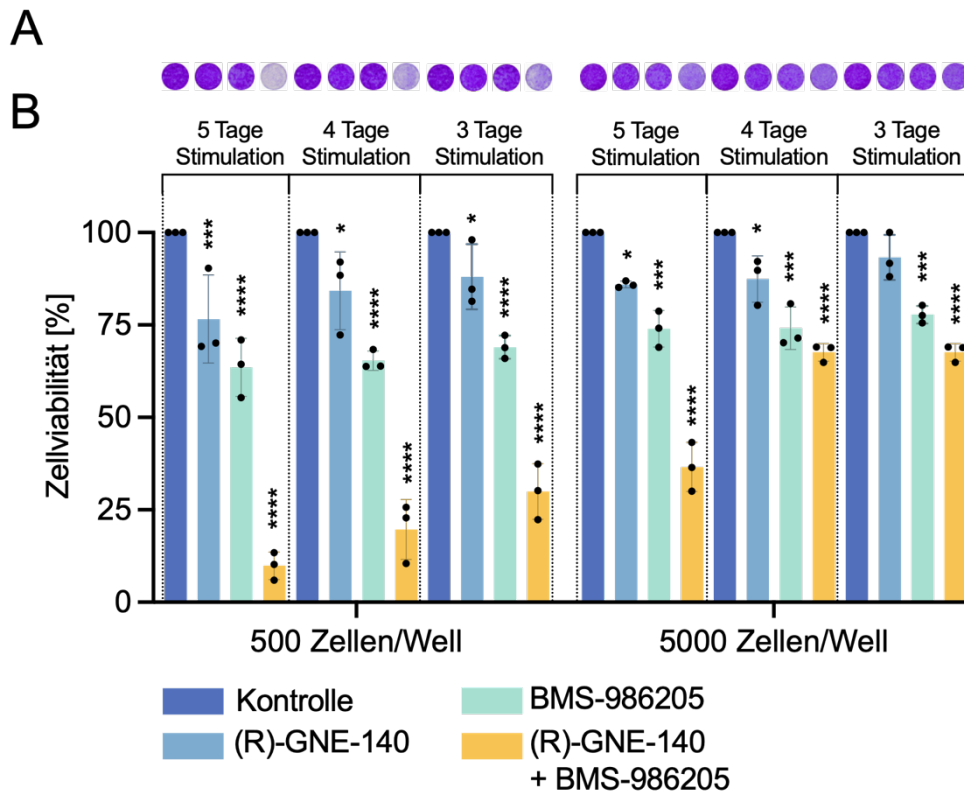


Abb. 10: Die zytotoxische Wirkung des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205 bleibt in Kombinationstherapie auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen unter verschiedenen Bedingungen weitgehend gleichbleibend. Die Viabilität von 500 bzw. 5000 ausgesäten Zellen 3-5 Tage nach der Behandlung mit den angegebenen Inhibitoren wurde mit Hilfe des Kristallviolett-Zellviabilitätstests quantifiziert. **(A)** Repräsentative Zellfärbung von DMSO-Kontrolle und Wirkstoff-stimulierten Zellen mit Kristallviolett. **(B)** Quantifizierung des zytotoxischen Effekts von (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) nach Mono- und Kombinationsbehandlung. Gezeigt wird der Mittelwert ± SD von 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse nach Dunnett (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

3.2 Charakterisierung des Effekts spezifischer Metabolismus-Inhibitoren auf Ovarialkarzinomzellen

3.2.1 Veränderungen der Zellgröße von Ovarialkarzinomzellen nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 über 48 h konnte eine augenscheinliche Vergrößerung der Zellen beobachtet werden. Um dies zu quantifizieren, wurde die Zellgröße anhand von Aktin/Tubulin Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt (Abb. 11 A). Dabei zeigte sich eine Zunahme der Zellgröße nur nach der Doppel-, nicht

aber nach der Einzelbehandlung der Zellen. Die relative Vergrößerung der Zellen war dabei bei den anfangs kleineren KRAS^{G12V}/MYC Zellen ausgeprägter als bei den *Empty Vector* Zellen (Abb. 11 B).

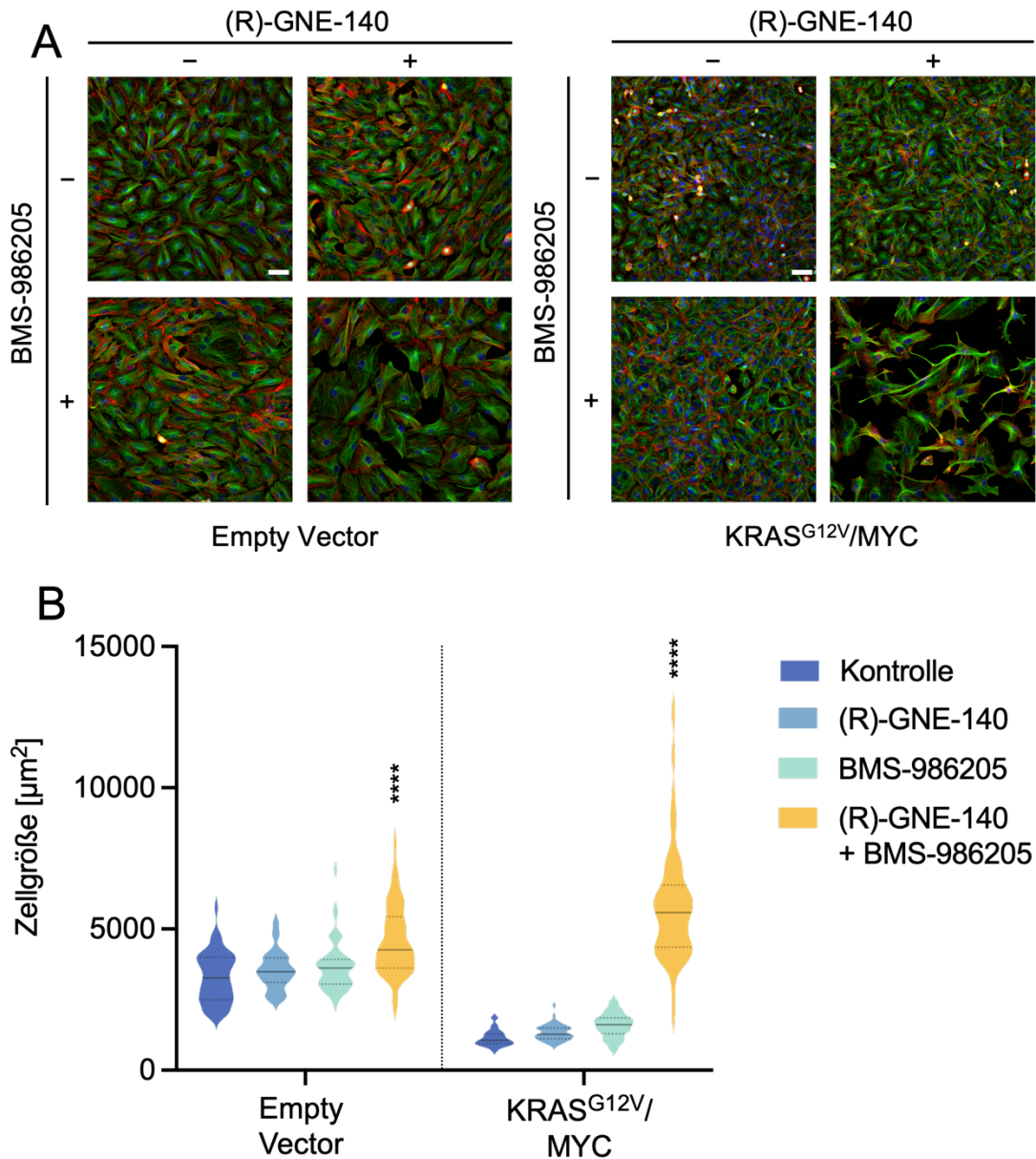


Abb. 11: Die Kombinationsbehandlung mittels des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205 führt nach einem Behandlungszeitraum von 48 Stunden zu einer signifikanten Zunahme der Zellgröße. (A) 75.000 ausgesäte Empty Vector Zellen bzw. KRAS^{G12V}/MYC Zellen wurden für 48 Stunden mit (R)-GNE-140 (7.5 μM) und BMS-986205 (6 μM) in der Einzel- oder Doppeltherapie behandelt und anschließend mittels Aktin/Tubulin Immunfluoreszenz analysiert (Skala = 100 μm). **(B)** Quantifizierung der Zellgröße von Empty Vector Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der oben genannten Behandlung und Inkubationszeit. Gezeigt wird der Mittelwert \pm SD von 200 Zellen aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung im Vergleich zur Kontrolle erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse nach Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.2.2 Keine Induktion von Apoptose in Ovarialkarzinomzellen nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Um zu untersuchen, ob die Doppelbehandlung von KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zur Induktion der Apoptose führt, wurden mittels eines Western Blots die Proteinmengen der geschnittenen Caspase 3 (*cleaved* Caspase 3) bestimmt. Bei Caspase 3 handelt es sich um eine Effektorcaspase, welche eine Schlüsselrolle im Ablauf der Apoptose spielt und die durch Initiatorcaspasen mittels Abspaltung eines Teils des Enzyms aktiviert wird (Asadi *et al.*, 2022). Wie in (Abb. 12) dargestellt, wurden KRAS^{G12V}/MYC Zellen gleichzeitig mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 behandelt und nach den angegebenen Zeiträumen (0 – 72 h) geerntet. Unabhängig vom Behandlungszeitraum konnte kein Anstieg des Proteinlevels von *cleaved* Caspase 3 als Marker für die Induktion von Apoptose festgestellt werden. Als Positivkontrolle dienten KRAS^{G12V}/MYC Zellen, welche in verschiedenen Konzentrationen mit Etoposid behandelt wurden. Bei Etoposid handelt es sich um einen Topoisomerase-II-Inhibitor, welcher über die Generierung und Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Apoptose führt (Hande, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 bei KRAS^{G12V}/MYC Zellen nicht zur Induktion der Apoptose führt.

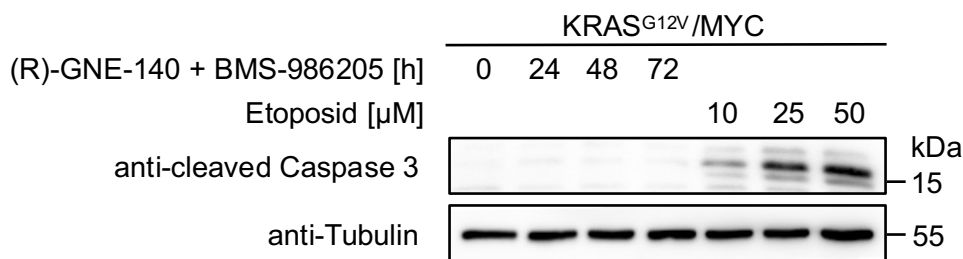


Abb. 12: Die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 induziert keine Apoptose. KRAS^{G12V}/MYC Zellen wurden mit der Kombination aus (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Als Marker für Apoptose wurde gespaltene Caspase 3 detektiert, Tubulin diente als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurden KRAS^{G12V}/MYC Zellen verwendet, die für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Etoposid behandelt wurden. Die Position der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

3.2.3 Seneszenzinduktion in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Die beschriebene Größenzunahme von Zellen könnte ein Indikator für zelluläre Seneszenz sein (Kuilman *et al.*, 2010). Zur Überprüfung der Seneszenzinduktion wurde sowohl mit den *Empty Vector* Zellen als auch mit den KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Mono- bzw. Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 für 48 h ein β -Galaktosidase-Test durchgeführt. Die detektierte Blaufärbung dient hier dem Nachweis einer vermehrten β -Galaktosidase-Aktivität, wie sie charakteristischerweise in seneszenten Zellen beobachtet werden kann (Hernandez-Segura, Nehme and Demaria, 2018). In der statistischen Auswertung der anschließend angefertigten Hellfeld-Aufnahmen (Abb. 13 A), konnte ein signifikanter Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität ausschließlich in doppelbehandelten KRAS^{G12V}/MYC Zellen festgestellt werden (Abb. 13 B). Im Vergleich dazu konnte in den einzeln bzw. unbehandelten Kontrollzellen sowie den *Empty Vector* Zellen kein signifikanter Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass es lediglich in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen zu einer selektiven Seneszenzinduktion nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 kommt.

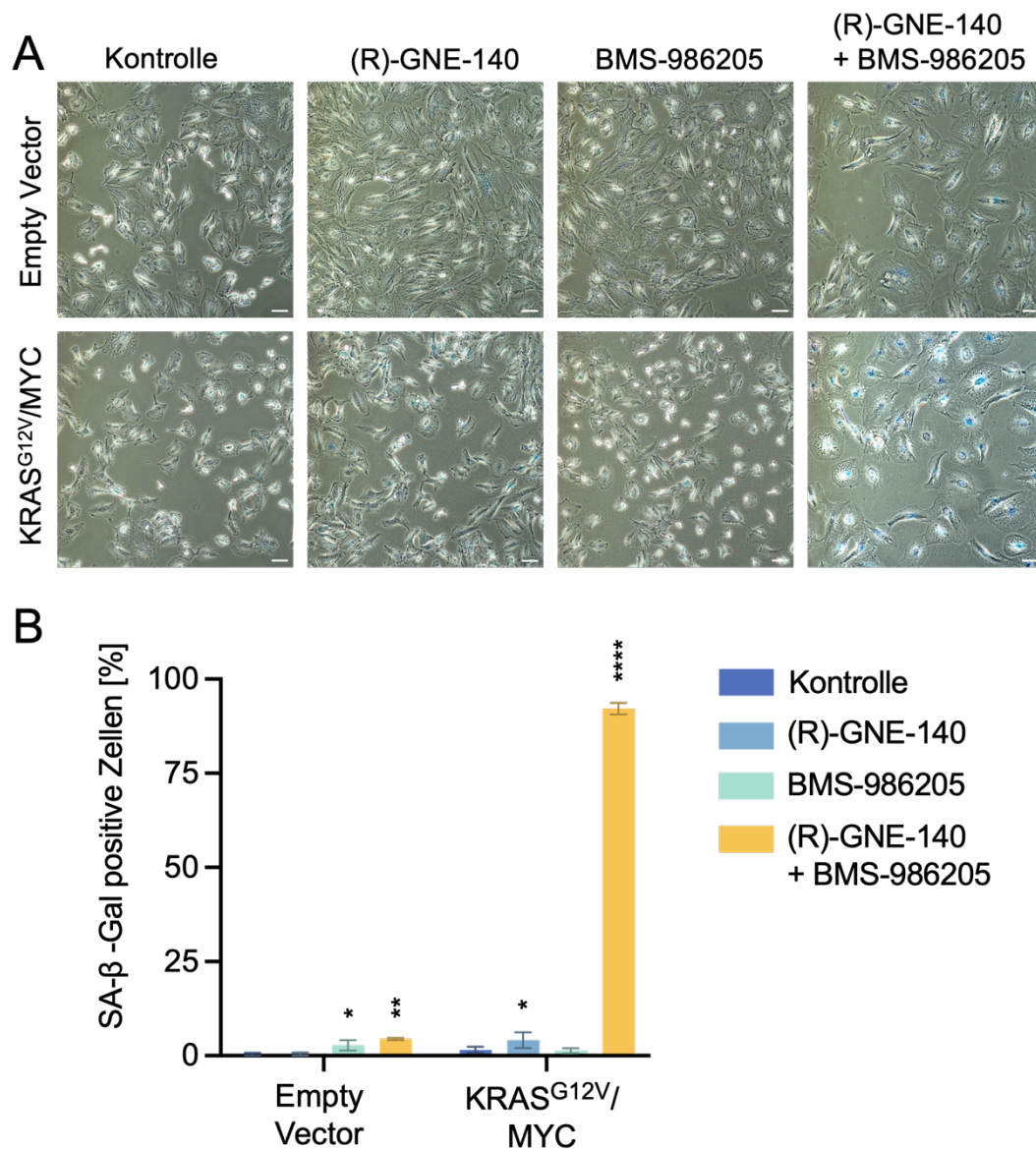


Abb. 13: Die Kombination des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205 führt zu einer selektiven Seneszenzinduktion in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen. Nach einer Aussaat von 75×10^3 Zellen wurde nach 48 Stunden ein β -Galaktosidase-Test mit zwei verschiedenen Zelllinien unter unterschiedlichen Therapiekonditionen durchgeführt. **(A)** Aufnahmen von unbehandelten sowie für 48 Stunden mit BMS-986205 ($6 \mu\text{M}$) und (R)-GNE-140 ($7.5 \mu\text{M}$) in Mono- und Kombinationstherapie behandelten Empty Vector Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach dem β -Galaktosidase-Test (Skala = $100 \mu\text{m}$). **(B)** Quantifizierung des Anteils β -Galactosidase positiver Empty Vector Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen von den gesamten Zellen pro Bild. Gezeigt wird der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung im Vergleich zur Kontrolle erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse nach Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.2.4 Akkumulation von Ovarialkarzinomzellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Da seneszente Zellen häufig einen Zellzyklusarrest zeigen (Gire and Dulić, 2015), wurde die Zellzyklusverteilung in mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 behandelten KRAS^{G12V}/MYC Zellen untersucht. 2 Tage nach Zugabe der Inhibitoren wurde die Zellzyklus Verteilung mittels Durchflusszytometrie und PI-Färbung bestimmt (Abb. 14). Dabei zeigte sich, dass die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu einer Akkumulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus führte. Auch bei den *Empty Vector* Zellen ließ sich eine Akkumulation in der G2/M-Phase beobachten. Dieser Zellzyklusarrest könnte hier bspw. eine Antwort auf mögliche DNA-Schäden nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 darstellen.

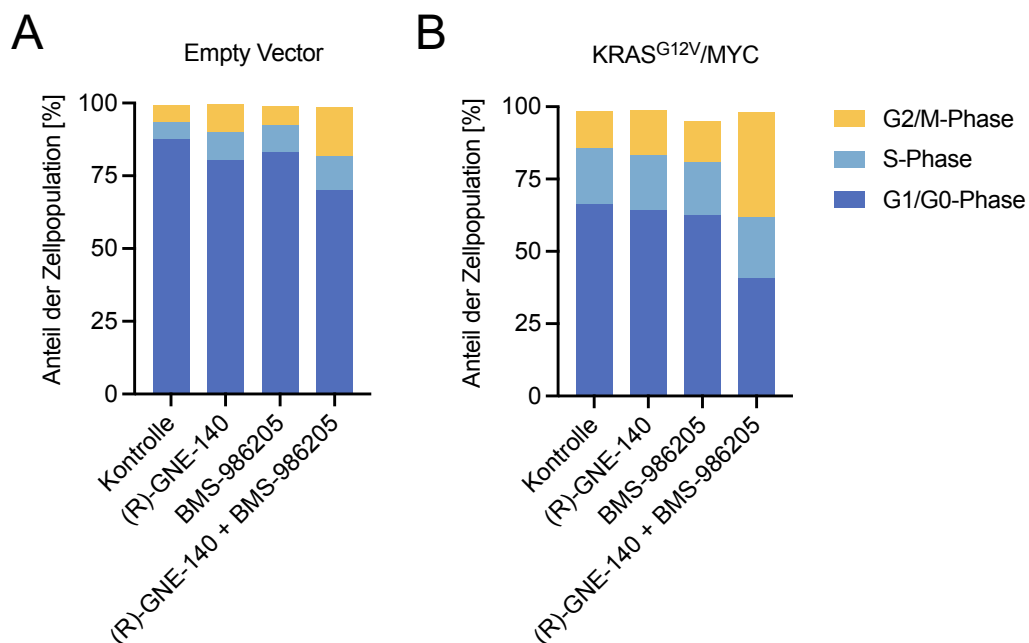


Abb. 14: Akkumulation von KRAS^{G12V}/MYC Zellen im Zellzyklus nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Quantifizierung der Zellzyklusverteilung von Empty Vector Zellen (**A**) und KRAS^{G12V}/MYC Zellen (**B**) nach Mono- bzw. Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) mittels Propidium Iodid Färbung. Nach Aussaat erfolgte die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 am darauffolgenden Tag für jeweils 48 Stunden bis zur Zellernte (Durchflusszytometrie-Profile in Abb. 27 im Anhang enthalten).

3.2.5 Zellen zeigen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 Zeichen von DNA-Schäden

Um zu untersuchen, inwieweit der Zellzyklusarrest durch DNA-Schäden initiiert wird, wurden Immunfluoreszenzbilder der behandelten Zellen zum Nachweis einer Akkumulation von γ H2A.X, einem Marker für DNA-Doppelstrangbrüche, angefertigt. Sowohl in den *Empty Vector* Zellen als auch in $KRAS^{G12V}/MYC$ Zellen konnte eine Akkumulation von γ H2A.X spezifisch nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 (24 – 48 h) detektiert werden (Abb. 15 A).

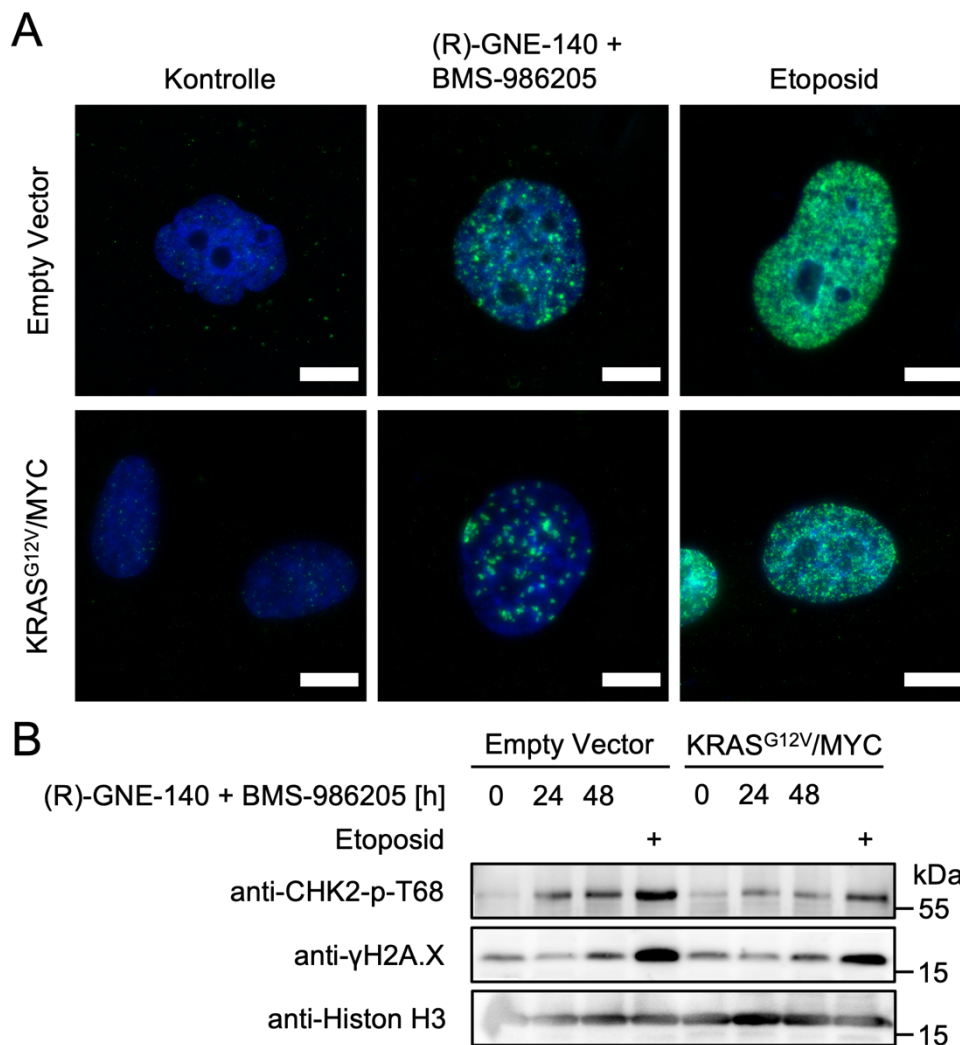


Abb. 15: γ H2A.X-Nachweis in Empty Vector und $KRAS^{G12V}/MYC$ Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Abb. 15 (Fortsetzung): γ H2A.X-Nachweis in Empty Vector und KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. (A) Empty Vector bzw. KRAS^{G12V}/MYC Zellen wurden für 48 Stunden mit (R)-GNE-140 (7.5 μ M) und BMS-986205 (6 μ M) behandelt und anschließend mittels Immunfluoreszenz auf ein vermehrtes Vorkommen von γ H2A.X hin analysiert. Für eine Positivkontrolle wurden die Zellen für 24 Stunden mit Etoposid (10 μ M) behandelt. Immunfluoreszenzbilder der Einzelbehandlung sind im Anhang enthalten (Skala = 10 μ m). (B) Empty Vector bzw. KRAS^{G12V}/MYC Zellen wurden wie in (A) beschrieben mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Als Marker für DNA-Schäden wurden die angegebenen Antikörper verwendet, Histon H3 diente als Ladekontrolle. Zur Positivkontrolle (+) wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 μ M Etoposid behandelt. Die Position der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

Die Akkumulation von γ H2A.X war neben der Immunfluoreszenz auch auf Proteinebene im in Abb. 15 B gezeigten Western Blot nachweisbar. Hier zeigte sich abhängig von der Behandlungsdauer mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 ein Anstieg der γ H2A.X-Level sowohl bei den *Empty Vector* Zellen als auch bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen im den Immunfluoreszenzbildern entsprechenden Maße.

Wie bereits erläutert, kann die Phosphorylierung von γ H2A.X ATM- bzw. ATR-abhängig erfolgen. Neben γ H2A.X kann ATM als Antwort auf DNA-Schäden auch die Checkpoint Kinase Chk2 über eine Phosphorylierung aktivieren, welche im Verlauf über mehrere Zwischenschritte den Übertritt aus der G2- in die M-Phase verhindern kann. Zudem kann Chk2 die Phosphatase Cdc25C über eine Phosphorylierung inhibieren. Dies führt zu einer verminderten Aktivierung des CDK1/Cyclin B Komplexes und verhindert den Übergang der Zellen von der G2- in die M-Phase (Sanchez *et al.*, 1997; Carrassa *et al.*, 2004; Malumbres and Barbacid, 2009). Nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 konnte wie in Abb. 15 B gezeigt, die Phosphorylierung von Chk2 nachgewiesen werden.

3.2.6 Alternativer Antwortmechanismus der Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf DNA-Schäden

Wird eine Zelle Stressoren ausgesetzt welche DNA-Schäden induzieren, kann sie über verschiedene Wege darauf reagieren. Zwei typische Antwortmechanismen auf DNA-Schäden stellt die Aktivierung von p21 bzw. p16 zum Beispiel über p53 bzw. RB1 dar, woraufhin es zu einer Seneszenzinduktion in den Zellen kommen kann. Ein anderer alternativer Mechanismus, mit dem eine Zelle auf DNA-Schäden reagieren kann, ist die Aktivierung der Kinase p38, welche über mehrere Schritte einen G2/M-Arrest bewirken kann (Bulavin *et al.*, 2001). In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass

KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 sowohl eine Akkumulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus, als auch DNA-Schäden aufweisen. Um zu überprüfen, ob der Zellzyklusarrest mit einem Anstieg von p21 bzw. p16 einhergeht, wurde die Expression beider Proteine per Western Blot (Abb. 16 A) nach Doppelbehandlung der Zellen mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 untersucht. Dabei zeigte sich jedoch, dass nach der genannten Doppelbehandlung der KRAS^{G12V}/MYC Zellen keine verstärkte Expression von p16 oder p21 nachgewiesen werden konnte. Um nun zu überprüfen, ob der G2/M-Arrest über den alternativen p38-Weg aktiviert wird, wurden auch hier Expressionsmuster nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 per Western Blot analysiert (Abb. 16 B). Hier zeigte sich, dass es abhängig von der Behandlungsdauer mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu einem verstärkten Vorkommen der aktivierenden Phosphorylierung von p38 in KRAS^{G12V}/MYC Zellen kommt.

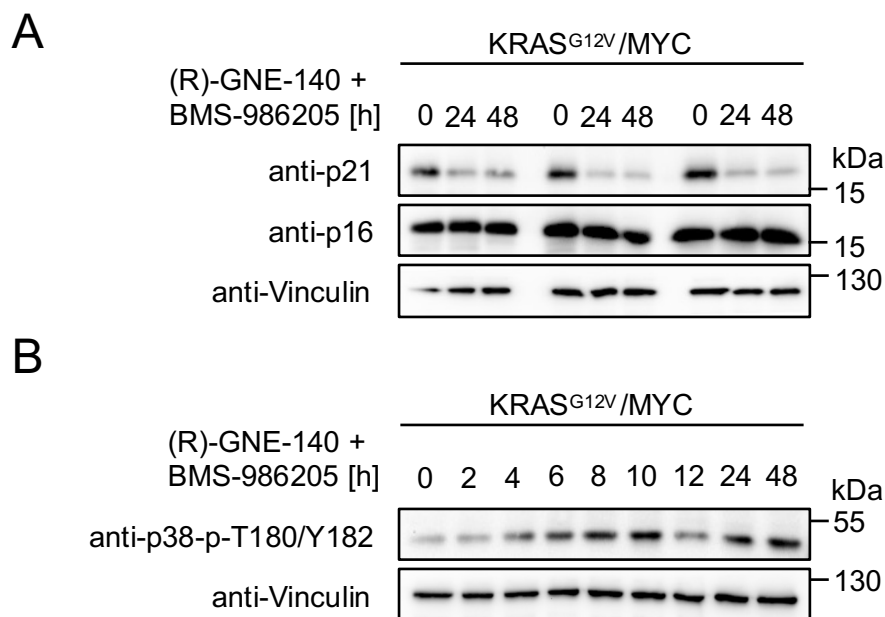


Abb. 16: Alternativer Antwortmechanismus nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf mögliche DNA-Schäden in KRAS^{G12V}/MYC Zellen. KRAS^{G12V}/MYC Zellen wurden mit der Kombination aus (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. **(A)** Als Marker für häufige Signalwege nach DNA-Schäden wurden die angegebenen Antikörper verwendet. **(B)** Der angegebene Antikörper wurde als Marker für einen möglichen alternativen Signalweg in Zellen nach DNA-Schäden verwendet. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die Position der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

3.2.7 Vermehrtes Vorkommen von ROS in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können zu einem DNA-Schaden induzieren und sind zum anderen auch wichtige Mediatoren in der Antwort auf DNA-Schäden (Srinivas *et al.*, 2019). In Abschnitt 3.2.5 wurden DNA-Schäden nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 beschrieben. Da die verwendeten Inhibitoren die metabolische Aktivität beeinflussen, könnte ein Anstieg von endogenen ROS vor allem aus der Atmungskette als Hauptproduktionsort von ROS, zu den beobachteten DNA-Schäden führen (Franco *et al.*, 2008; Aggarwal *et al.*, 2019). Um zu überprüfen, ob es nach der Doppelbehandlung der Zellen mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu einer vermehrten Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien kommt, wurden die ROS-Level von mono- bzw. doppelbehandelten *Empty Vector* und KRAS^{G12V}/MYC Zellen mittels MitoSOXTM-Fluoreszenzfarbstoff per Durchflusszytometrie bestimmt. Wie aus Abb. 17 hervorgeht, konnte dabei insbesondere bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen ein vermehrtes Vorkommen von mitochondrialen ROS spezifisch nach (R)-GNE-140 und BMS-986205 Doppelbehandlung detektiert werden.

Zur Positivkontrolle wurden *Empty Vector* und KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit Antimycin A behandelt, welches über die Hemmung von Komplex III der Atmungskette der Mitochondrien die Entstehung von ROS fördert (Panduri *et al.*, 2004). Dementsprechend zeigte sich in der Durchflusszytometrie sowohl bei den *Empty Vector* als auch bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Behandlung mit Antimycin A ein deutlicher Anstieg der ROS-Level.

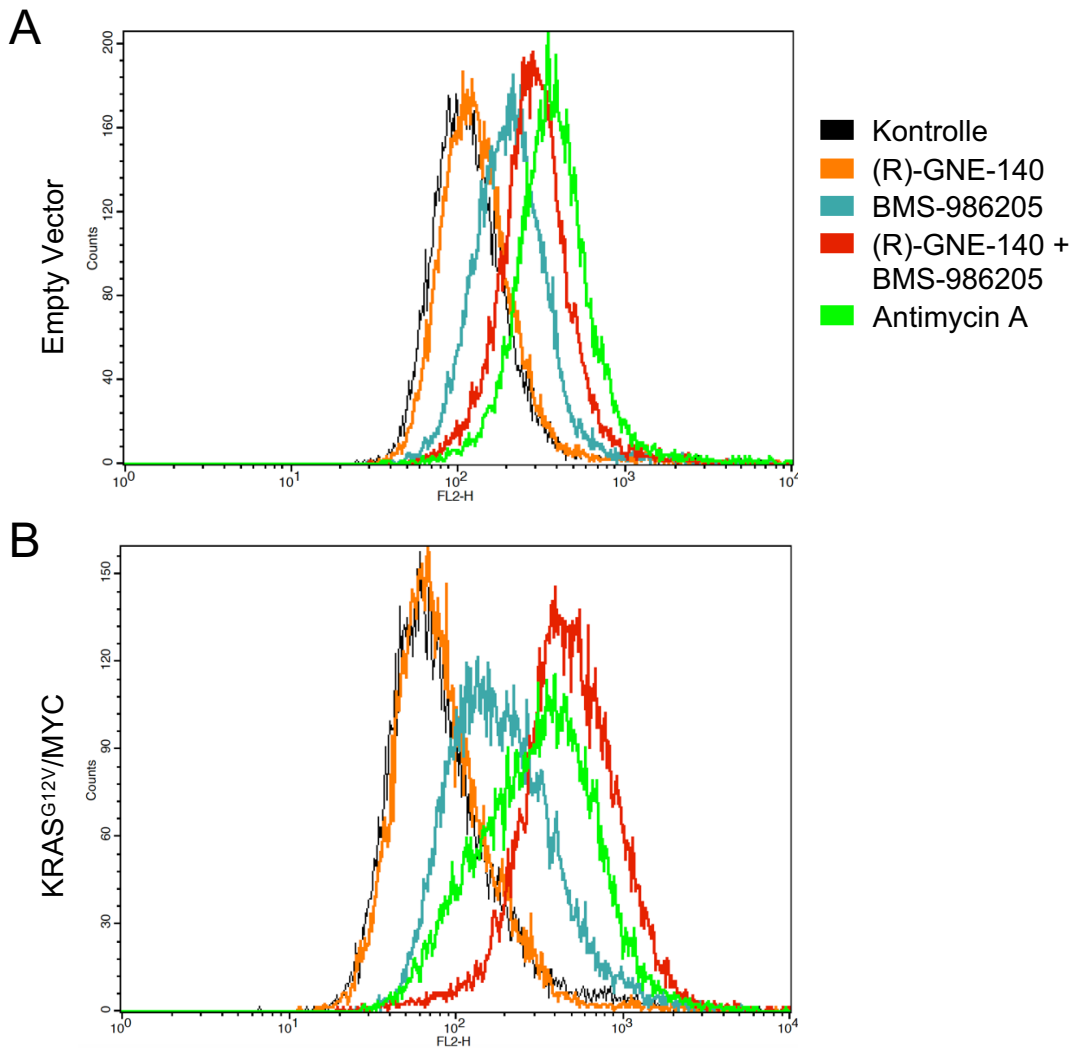


Abb. 17: Anstieg von ROS-Leveln in KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Empty Vector Zellen (A) bzw. KRAS^{G12V}/MYC Zellen (B) wurden mit (R)-GNE-140 (7.5 μ M) und BMS-986205 (6 μ M) einzeln sowie in Kombination behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Zum Nachweis von ROS-Leveln wurden die Zellen anschließend für 12 Minuten mit dem MitoSOX-Fluoreszenzfarbstoff (5 μ M) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen für 10 Minuten mit Antimycin A (10 μ M) behandelt.

3.2.8 Veränderungen der Mitochondrien in Ovarialkarzinomzellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

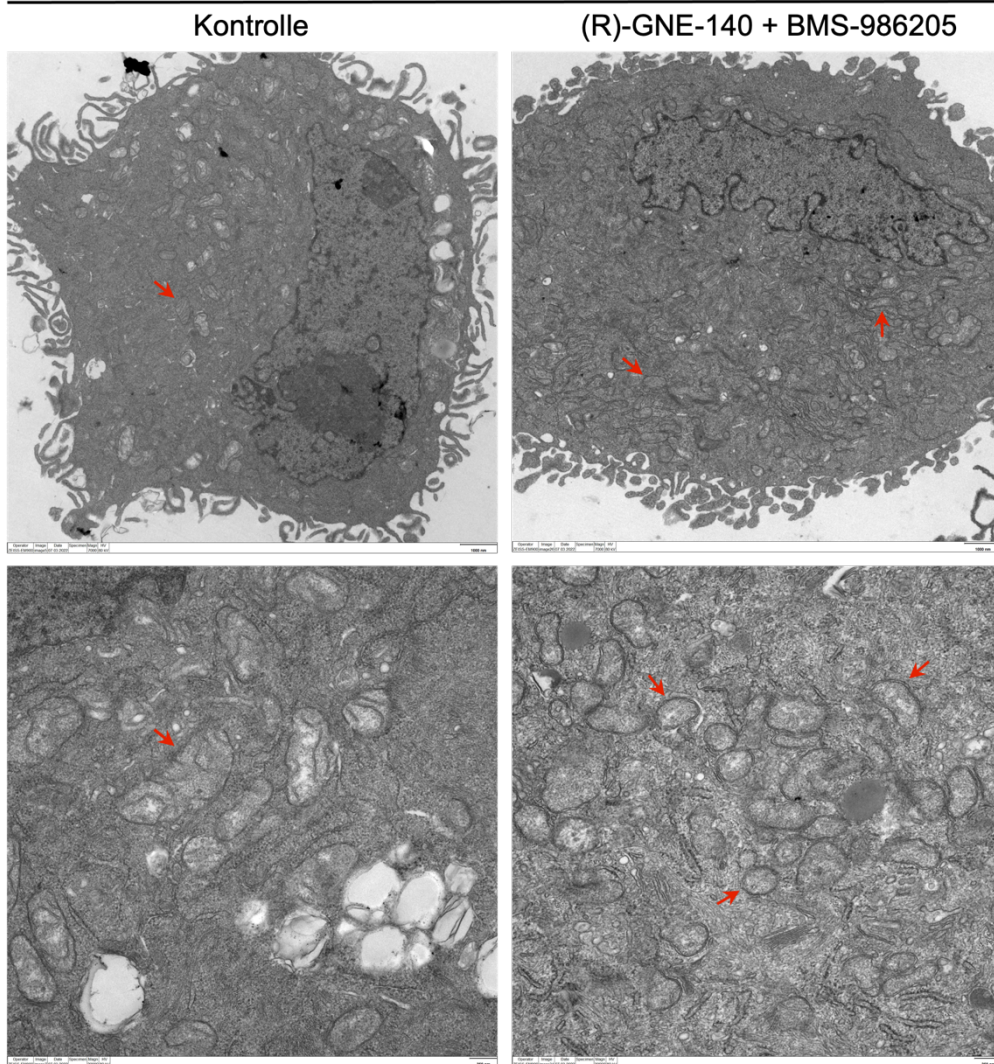
Aufgrund des im vorherigen Abschnitt festgestellten vermehrten Vorkommens von ROS nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 wurden im Folgenden die Mitochondrien der behandelten bzw. unbehandelten *Empty Vector* Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen genauer betrachtet. In Kooperation mit dem Institut für Anatomie

und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden die Zellen dazu nach der Behandlung fixiert und anschließend elektronenmikroskopisch analysiert.

Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder konnte festgestellt werden, dass insbesondere die KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 mitochondriale Veränderungen aufweisen (Abb. 18). Nach der genannten Doppelbehandlung zeigten die Zellen Veränderungen bezogen auf Mitochondrienanzahl, -größe und -form. Nach der Doppelbehandlung erschienen die Mitochondrien der KRAS^{G12V}/MYC Zellen insgesamt zahlreicher vorhanden zu sein, außerdem wirkten sie verglichen mit den Mitochondrien der unbehandelten KRAS^{G12V}/MYC Zellen kleiner und länglicher. Zudem schien die äußere Membran der Mitochondrien der doppelt behandelten KRAS^{G12V}/MYC Zellen dunkler, und somit elektronendichter zu sein als die äußere Membran der Mitochondrien der unbehandelten Zellen.

Auch in den *Empty Vector* Zellen ließen sich nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 mitochondriale Veränderungen nachweisen, allerdings nicht in dem Ausmaß, wie sie bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen in Erscheinung traten (siehe Anhang, Abb. 25). Verglichen mit den Mitochondrien der unbehandelten *Empty Vector* Zellen erschienen die Mitochondrien der doppelt behandelten Zellen nur geringfügig zahlreicher im Zytoplasma vorzuliegen und in der Größe kaum verändert. Verglichen mit den Mitochondrien der doppelt behandelten KRAS^{G12V}/MYC Zellen schienen aber auch die Mitochondrien der *Empty Vector* Zellen nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 eine elektronendichtere äußere Membran aufzuweisen.

KRAS^{G12V}/MYC



In Kollaboration mit Dr. U. Gärtner –
Institut für Anatomie und Zellbiologie (JLU)

Abb. 18: Mitochondriale Veränderungen in KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) ließen sich in KRAS^{G12V}/MYC Zellen elektronenmikroskopisch sowohl eine Zunahme der Mitochondrienzahl als auch strukturelle Veränderungen der Mitochondrien erkennen (siehe Pfeile). Die Skala entspricht 1000 nm bzw. 250 nm.

3.3 Effekte von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf andere Krebszelllinien

3.3.1 Die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigt bei mehreren Krebszelllinien einen zytotoxischen Effekt

Viele chemotherapeutische Regime werden nicht nur bei einer bestimmten Art von Karzinom angewendet, sondern können bei einer Vielzahl von Krebsarten zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. In den Experimenten aus Abschnitt 3.1 und 3.2 wurde die Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 nur auf Ovarialkarzinomzellen eingesetzt. Um zu testen, ob auch andere Krebszelllinien mit einem ähnlichen Effekt wie KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen reagieren, wurde die Zellviabilität nach der genannten Doppelbehandlung daher an verschiedenen Krebszelllinien getestet.

Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zeigten dabei, dass nicht nur KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit einem zytotoxischen Effekt auf die Doppelbehandlung aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 reagieren, sondern auch eine Vielzahl anderer Krebszelllinien (Abb. 19 A). Interessanterweise zeigten insbesondere MCF-7 Zellen als Mammakarzinomzellen sowie HeLa Zellen als Zervixkarzinomzellen als weitere gynäkologischen Krebszelllinien neben den bisher getesteten Ovarialkarzinomzellen die ausgeprägtesten synergistischen zytotoxischen Effekte (Abb. 19 B) nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Neben den gynäkologischen Krebszelllinien zeigten aber auch HT-29 Zellen, SW620 Zellen sowie HCT-116 Zellen als Kolonkarzinomzelllinien, ebenso wie RPE-1 Zellen als immortalisierte Zellen des retinalen Pigmentepithels synergistische zytotoxische Effekte nach der Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Bei anderen Krebszelllinien, wie z.B. den H1975 Zellen und PC9 Zellen als Zelllinien aus Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non small cell lung cancer*, NSCLC), ließ sich hingegen kein synergistischer zytotoxischer Effekt nachweisen (Abb. 19 C).

Vor der Testung der Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 wurden auf allen in Abb. 19 genannten Zelllinien verschiedene Konzentrationen beider Inhibitoren getestet und die Zytotoxizität anschließend anhand eines Zellviabilitätstests bewertet (siehe Anhang, Abb. 26). Die anschließend verwendeten Konzentrationen wurden anhand der IC₇₅-Werte bestimmt. Die abschließend verwendeten Konzentrationen sind im Pipettierschema in Abschnitt 2.3.11 enthalten.

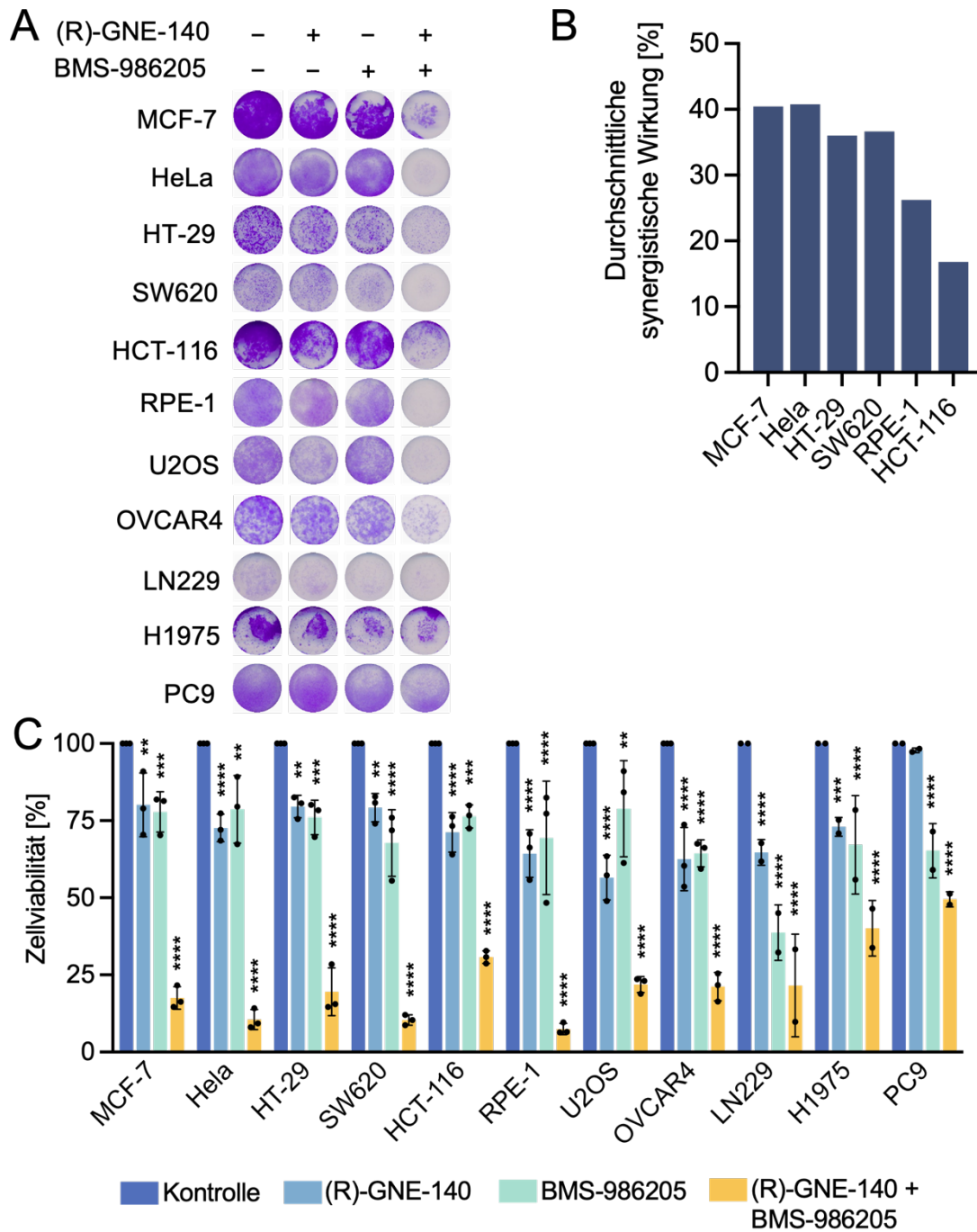


Abb. 19: Die Kombinationsbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigt bei einer Vielzahl von Zelllinien einen synergistischen Effekt. Fortsetzung auf der folgenden Seite

Abb. 19 (Fortsetzung): Die Kombinationsbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigt bei einer Vielzahl von Zelllinien einen synergistischen Effekt. Nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden mit (R)-GNE-140 (7.5–30 μ M) und BMS-986205 (2.5–20 μ M) [entspr. Tabelle 3] wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt. Dabei ließ sich in einer Vielzahl von Krebszelllinien ein signifikanter synergistischer zytotoxischer Effekt der Kombinationsbehandlung zeigen. **(A)** Repräsentative Zellfärbung mit Kristallviolett von DMSO-Kontrolle und behandelten Zellen. **(B)** Quantifizierung der synergistischen Wirkung von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf 6 verschiedene Krebszelllinien. **(C)** Quantifizierung des zytotoxischen Effekts von (R)-GNE-140 und BMS-986205 in unterschiedlichen fixen Konzentrationen je nach Zelllinie nach Mono- und Kombinationsbehandlung. Gezeigt wird der Mittelwert \pm SD aus ≥ 2 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung verglichen mit der jeweiligen Kontrolle erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse nach Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.3.2 Seneszenzinduktion auch in anderen Krebszelllinien nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Nachdem bereits festgestellt werden konnte, dass nicht nur KRAS^{G12V}/MYC Zellen, sondern auch andere Krebszelllinien mit einem zytotoxischen Effekt auf die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 reagieren, sollte nun herausgefunden werden, ob andere therapiesensible Krebszelllinien ebenso wie die KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit einer Seneszenzinduktion auf die genannte Doppelbehandlung reagieren. Dazu wurde mit den Zellen ein β -Galaktosidase-Aktivitätstest durchgeführt, die Beurteilung erfolgte anschließend per Hellfeldmikroskopie.

Bei den in Abb. 20 dargestellten Ergebnissen ließ sich feststellen, dass RPE-1 Zellen eine vermehrte Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test aufwiesen, und somit ebenfalls eine Seneszenzinduktion nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zeigten. Neben den RPE-1 Zellen wiesen außerdem auch MCF-7 Zellen nach dem β -Galaktosidase-Test eine leicht vermehrte Blaufärbung bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen auf. Bei allen anderen in Abb. 20 dargestellten Zellen ließ sich nach dem β -Galaktosidase-Test keine vermehrte Blaufärbung im Mikroskop und somit auch keine Induktion von Seneszenz als Antwort auf die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 nachweisen.

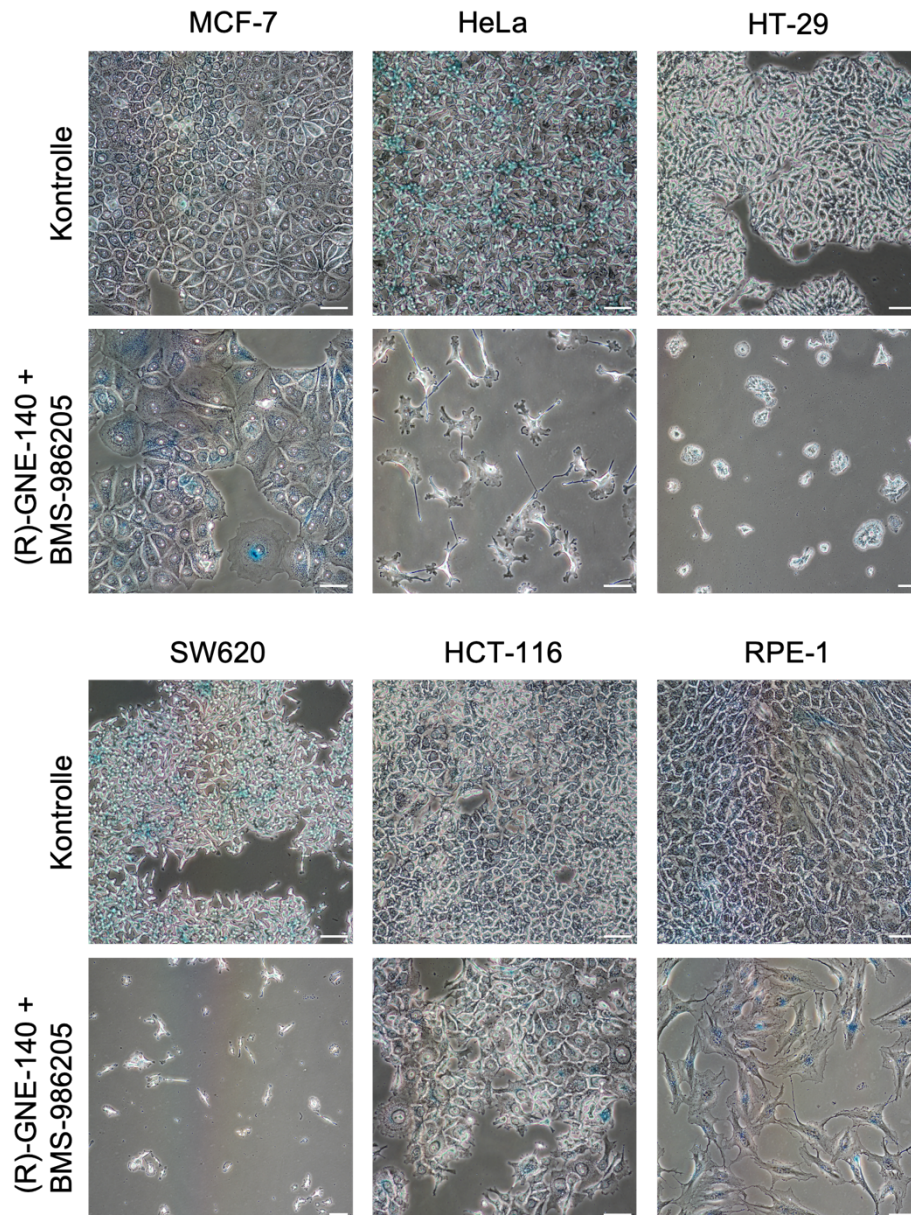


Abb. 20: Seneszenzinduktion in RPE-1-Zellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Die ausgesäten Zellen wurden für 48 Stunden mit (R)-GNE-140 (7.5–30 μM) und BMS-986205 (2.5–20 μM) [entspr. Tabelle 3] behandelt und anschließend nach Durchführung eines β -Galaktosidase-Aktivitätstests per Hellfeldmikroskopie betrachtet. Die Skala entspricht 100 μm .

3.3.3 Keine Induktion von Apoptose in mehreren Krebszelllinien nach Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Die Induktion von Seneszenz nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 konnte bisher nur in einer weiteren Krebszelllinie deutlich nachgewiesen werden. Da wie bereits beschrieben allerdings in mehreren Zelllinien ein zytotoxischer Effekt der genannten Doppelbehandlung gezeigt werden konnte, wurde im folgenden

Experiment untersucht, ob die Zellen anstelle der Seneszenzinduktion alternativ eine vermehrte Expression von Apoptosemarkern aufweisen. Unterschiedliche Zellen wurden mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 behandelt und die Spaltung der Caspase 3 wurde mittels Western Blot gemessen. In keiner der analysierten Zelllinien konnte die gespaltene Caspase 3 detektiert werden (Abb. 21). MCF-7 Zellen zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur keine Caspase 3 Expression (Jänicke, 2009), sodass in diesem Zellsystem keine Rückschlüsse auf die Caspase-Aktivität möglich sind. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass es in keiner der analysierten Zellen zu einer Induktion der Caspase-Aktivität und damit der Apoptose kommt, während für die MCF-7 Zellen keine Rückschlüsse möglich sind.

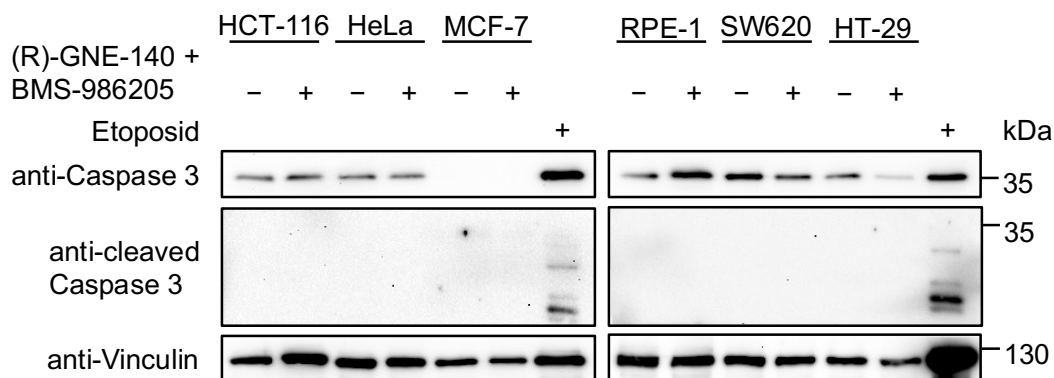


Abb. 21: Die Kombinationsbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 führt bei mehreren Krebszelllinien nicht zur Induktion von Apoptose. Die aufgeführten Zellen wurden mit (R)-GNE-140 (7.5 – 30 μ M) und BMS-986205 (2.5 – 20 μ M) [entspr. Tabelle 3] behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Als Marker für Apoptose wurden die angegebenen Antikörper verwendet, Vinculin diente als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurden mit Etoposid (10 μ M) behandelte KRAS^{G12V}/MYC Zellen verwendet.

3.3.4 Zellzyklusakkumulation einiger Krebszelllinien nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob sich in anderen Krebszelllinien trotz der bisher fehlenden Seneszenz- oder Apoptoseinduktion ebenfalls der bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen beobachtete Zellzyklusarrest nachweisen lässt. Unterschiedliche Zellen wurden dazu gemeinsam mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 behandelt und nach 2 Tagen bezüglich der Zellzyklusverteilung mittels PI-Färbung im Durchflusszytometer untersucht.

Die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse zeigen dabei, dass der Arrest von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 neben den KRAS^{G12V}/MYC Zellen auch in anderen Krebszelllinien nachweisbar war. Dabei handelt es sich interessanterweise nicht nur um RPE-1 Zellen, bei denen ebenfalls im β -Galaktosidase-Test die Induktion von Seneszenz beobachtet werden konnte, sondern auch um andere Krebszelllinien, wie z.B. HeLa Zellen oder SW620 Zellen. In anderen Zelllinien, wie z.B. MCF-7 Zellen, ließen sich nach der Doppelbehandlung hingegen kaum Veränderungen im Zellzyklus nachweisen.

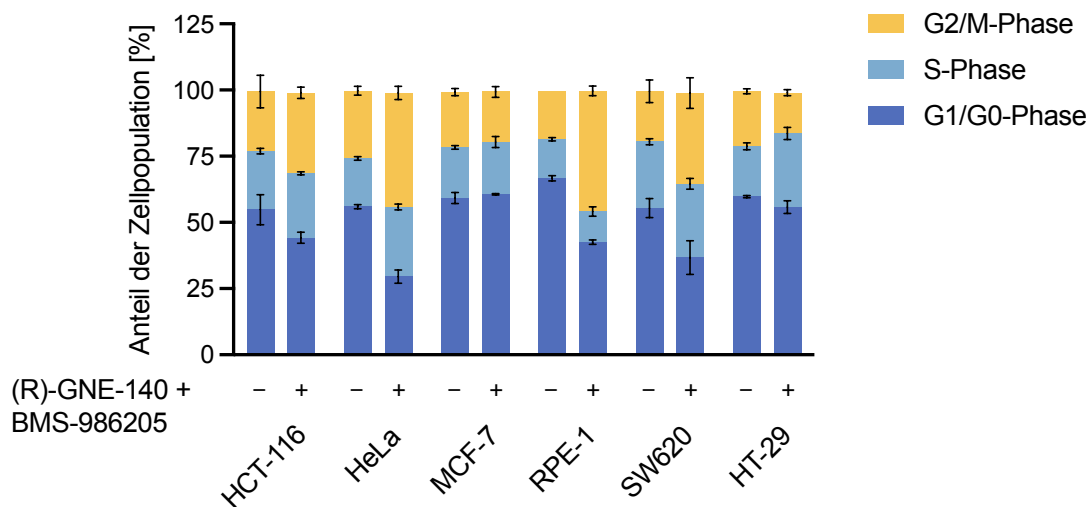


Abb. 22: Die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 bewirkt bei mehreren Krebszelllinien eine Akkumulation von Zellen in einer Phase des Zellzyklus. Quantifizierung der sich im jeweiligen Zellzyklusabschnitt befindlichen Zellen mittels Propidium-Iodid Färbung und nachfolgender Analyse der Zellen per Durchflusszytometrie. Die aufgeführten Zellen wurden mit (R)-GNE-140 (7.5 – 30 μ M) und BMS-986205 (2.5 – 20 μ M) [entspr. Tabelle 3] behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Gezeigt wird der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten.

Eine abschließende Zusammenfassung der unterschiedlichen Effekte der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf verschiedene Krebszelllinien ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammenfassung des Effekts der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf unterschiedliche Krebszelllinien (* aufgrund der fehlenden Caspase 3-Expression von MCF-7 Zellen ist hier kein Rückschluss auf die Apoptoseinduktion möglich)

Zelllinie	Seneszenz-induktion	Apoptose-induktion	Zellzyklusarrest
HCT-116	–	–	–
HeLa	–	–	+
HT-29	–	–	–
MCF-7	+	–*	–
RPE-1	++	–	+
SW620	–	–	+

4 Diskussion

4.1 Kombinationen von Chemotherapeutika in der Krebstherapie

4.1.1 Begründung von Therapiekombinationen

Die meisten Chemotherapieschemata verschiedener Krebsarten enthalten nicht nur ein, sondern meist zwei oder mehr Chemotherapeutika mit zum Teil unterschiedlichen Angriffspunkten (Blagosklonny, 2004). Die Hauptgründe hierfür sind zum Beispiel die große Heterogenität von Tumorzellen sowie mögliche, durch den therapieinduzierten Selektionsdruck entstandene Resistenzmechanismen (Bast, 2016; Venkatesan *et al.*, 2017). Manche Tumorzellen können beispielsweise über eine veränderte Pharmakokinetik die Wirkung der Chemotherapeutika reduzieren (Alfarouk *et al.*, 2015). Dies ist über eine fehlregulierte Absorption auch ein Problem in der platinbasierten Chemotherapie des HGSOE. So führt eine Behandlung des HGSOE mit Cisplatin im Verlauf zu einer Herabregulation des Influx Transporters CTR1 (*copper transporter 1*), und somit in der Folge zu einer unzureichenden Konzentration des Therapeutikums in den Krebszellen (Holzer *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2022). Durch die Kombination von Cisplatin mit dem Proteasom Inhibitor Bortezomib ist dieser Effekt allerdings umkehrbar, da Bortezomib den proteasomgesteuerten Abbau von CTR1 inhibieren kann (Jandial *et al.*, 2009). Ein weiterer Grund für den kombinierten Einsatz von Chemotherapeutika ist auch der große Erfolg von Kombinationstherapien im klinischen Alltag (Bast, 2016), wie z.B. die Kombination verschiedener Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Mo *et al.*, 2021). So zeigte sich in der Therapie des NSCLC unter der Kombination des PD-1 Antikörpers Nivolumab und des CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) Antikörpers Ipilimumab ein höheres Therapieansprechen verglichen mit einer Nivolumab Monotherapie (Hellmann *et al.*, 2019). In der Kombinationstherapie können die einzelnen Therapeutika dabei an ein gemeinsames Zielmolekül binden, oder aber unterschiedliche Moleküle bspw. in einem bestimmten Signalweg als jeweilige Ziele angreifen (Bast, 2016). In Therapieregimen des Mammakarzinoms kommt es z.B. zum dualen Einsatz der HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)-Inhibitoren Trastuzumab und Pertuzumab, welche trotz ihres gemeinsamen Zielmoleküls ein höheres Therapieansprechen in der Kombinationstherapie verglichen mit der Monotherapie aufweisen (Nahta, Hung and Esteva, 2004; Scheuer *et al.*, 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass synergistische Effekte von

Medikamentenkombinationen, die Applikation geringerer Dosierungen erlauben (Qin *et al.*, 2018; Correia, Gärtner and Vale, 2021). Dies kann die durch die Therapie verursachten Nebenwirkungen für den einzelnen Patienten bzw. die einzelne Patientin reduzieren, was ebenfalls einen weiteren Vorteil der kombinierten Chemotherapie darstellt (Mokhtari *et al.*, 2017).

4.1.2 Synthetische Letalität durch Chemotherapiekombinationen

Das Konzept der synthetischen Letalität ist bereits seit einigen Jahren verstanden und ein vielversprechender Ansatz zur erfolgreichen Therapie verschiedener Krebserkrankungen. Das Phänomen der synthetischen Letalität beschreibt den Umstand, dass Krebszellen den Verlust eines bestimmten Gens kompensieren können, beim Verlust zweier oder mehrerer Gene hingegen mit dem Zelltod reagieren (O'Neil, Bailey and Hieter, 2017). Das bekannteste Therapiekonzept, welches sich die synthetische Letalität zu nutzen macht, ist der Einsatz von PARP-Inhibitoren wie Olaparib in der Therapie von Mamma- und Ovarialkarzinomen, wie in Abschnitt 1.1.3 näher erläutert (Slade, 2020). PARP-Inhibitoren zeigen insbesondere bei Patientinnen einen Effekt, die eine BRCA1/2-Mutation tragen, also einen Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination (HR-Defizienz) aufweisen (Lord and Ashworth, 2017). Ein möglicher weiterer Ansatz zur Therapie von Karzinomen mit einer HR-Defizienz über das Phänomen der synthetischen Letalität ist die Inhibition der DNA-Polymerase Theta (Pol θ), welche eine Rolle in alternativen Wegen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt (Wang *et al.*, 2019; Drzewiecka *et al.*, 2022).

Durch die Kombination des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205 konnte in Abschnitt 3 ebenfalls gezeigt werden, dass eine Monotherapie der Krebszellen zwar zu einer gewissen Reduktion der Zellviabilität führt, aber erst die Kombination beider metabolischer Inhibitoren über einen gewissen Zeitraum einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen bewirkt. Hierzu sei limitierend erwähnt, dass sich die veränderte Architektur der Mitochondrien in der Gegenwart von (R)-GNE-140 und BMS-986205 nicht durch die Inhibition ihrer jeweiligen Zielstrukturen erklären lässt und daher als Hinweis auf mögliche *Off-Target*-Effekte gesehen werden kann, also Effekte außerhalb der eigentlichen Zielmoleküle. Die selektive Hemmung von LDHA und IDO1 als Ursache für die synergistische Zytotoxizität bzw. mögliche *Off-Target*-Effekte sollten daher in zukünftigen Experimenten genauer charakterisiert

werden. Eine universelle Toxizität der beiden Zytostatika kann durch die heterogenen Antworten unterschiedlicher Krebszelllinien auf die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 ausgeschlossen werden.

4.1.3 Metabolische Inhibitoren in der Krebstherapie

Ein metabolischer Inhibitor, welcher in der Krebstherapie eingesetzt wird, ist Metformin. Klinische Phase II Studien haben gezeigt, dass Metformin beim Adenokarzinom der Lunge in Kombination mit TKIs (Tyrosinkinaseinhibitoren) zu einem Anstieg des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens führt, verglichen mit einer TKI-Monotherapie (Arrieta *et al.*, 2019). Metformin führt über eine Inhibition von Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien zu einer Aktivierung von AMPK und beeinflusst darüber den Metabolismus und das Wachstum von Tumorzellen (Lv and Guo, 2020). Während Metformin bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen wie zum Beispiel Brust- oder Darmkrebs ein vielversprechendes Co-Therapeutikum zu sein scheint (Lv and Guo, 2020), konnten die obigen Ergebnisse aufgrund der mangelnden Tumorzellselektivität keinen Vorteil in der Anwendung von Metformin in der Therapie des HGSOE zeigen. Die mangelnde Zellselektivität stellt ein generelles Problem in der Entwicklung neuer metabolischer Inhibitoren dar, da metabolische Inhibitoren häufig sowohl in den Metabolismus von Tumorzellen, als auch in den Metabolismus von gesunden Zellen eingreifen und diese dadurch ebenfalls beeinträchtigen können (Lemberg *et al.*, 2022).

Metabolische Inhibitoren werden auch in der Therapie von Glioblastomen sowie der akuten myeloischen Leukämie (AML) eingesetzt, welche charakteristische Mutationen der Isocitratdehydrogenase (IDH) aufweisen (Mardis *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Kommt es in Krebszellen zu einer IDH-Mutation, verstoffwechselt die IDH das Isocitrat im Citratzyklus nicht mehr zu α -KG, sondern zu 2-Hydroxyglutarat (2-HG), einem Onkometaboliten (Dang *et al.*, 2009), welcher über die Beeinflussung der Genexpression zum Progress von Tumoren mit IDH-Mutation beitragen kann (Xu *et al.*, 2011). Gezielte Inhibitoren wie Ivosidenib oder Enasidenib für Tumorerkrankungen mit IDH-Mutation werden aktuell vor allem in der Therapie der AML eingesetzt, befinden sich aber auch für weitere Tumoren in der Entwicklung (Alshiekh Nasany and De La Fuente, 2023).

In der Krebstherapie mit metabolischen Inhibitoren gibt es bislang kaum Beispiele für den kombinierten Einsatz mehrerer metabolischer Inhibitoren, insbesondere im Hinblick auf die synthetische Letalität. Die hier verwendeten synergistisch wirkenden Inhibitoren

(R)-GNE-140 und BMS-986205 stellen somit einen neuartigen Therapieansatz dar, wobei die genauere Charakterisierung des zur synthetischen Letalität führenden Wirkmechanismus in weiterführenden Experimenten erfolgen sollte.

4.2 Auslösung von Seneszenz nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

4.2.1 Seneszenz als Folge des Energiemangels der Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Wie in den obigen Abschnitten gezeigt, konnte die selektive Induktion von Seneszenz nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 in KRAS^{G12V}/MYC Zellen nachgewiesen werden. Ein Grund für die selektive Seneszenzinduktion könnte hier der höhere Energiebedarf der Krebszellen gegenüber gesunden Zellen sein, da Krebszellen aufgrund ihrer höheren Proliferationsrate auf eine gesteigerte Energiezufuhr angewiesen sind (Jang, Kim and Lee, 2013). Weitere, nicht in dieser Arbeit generierte Ergebnisse konnten zeigen, dass der IDO1-Inhibitor BMS-986205 zu einer Inhibition der mitochondrialen Atmungskette führt (Dreute, 2023), worauf bereits die in Abschnitt 3.2.8 beschriebenen mitochondrialen Veränderungen hindeuteten. Daneben führt der verwendete LDHA-Inhibitor (R)-GNE-140 über die Inhibition der Glykolyse zu einer reduzierten zellulären Energieversorgung (Mazzio *et al.*, 2021). Insbesondere in Kombination mit der zusätzlich beeinträchtigten OXPHOS und der beobachteten mitochondrialen Beeinträchtigung der Zellen könnte dies zur Seneszenzinduktion führen, da der Energiebedarf der Zellen nicht mehr gedeckt werden kann. Dieser Mangel an Energie und Nährstoffen ist ein möglicher Grund für erhöhte ROS-Level (Zhao *et al.*, 2017), welche in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen nachgewiesen werden konnten. Die mitochondrialen Veränderungen selbst können dabei zu einer gestörten mitochondrialen Funktion, einer reduzierten OXPHOS sowie ATP-Synthese, ebenso wie zu einer gesteigerten ROS-Synthese führen (Bhatti, Bhatti and Reddy, 2017). Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass insbesondere erhöhte mitochondriale ROS-Level zur Entstehung von Seneszenz beitragen können (Moiseeva *et al.*, 2009; Wiley and Campisi, 2021).

Wie gezeigt, treten die erhöhten ROS-Level lediglich nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 auf, nicht aber nach der jeweiligen Monotherapie. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass der Energiemangel nach der Einzelbehandlung

jeweils durch eine Hochregulation von Glykolyse bzw. OXPHOS kompensiert werden kann, wohingegen dies nach Inhibition beider Stoffwechselwege nicht mehr möglich ist und es in Folge des Energiemangels und der mitochondrialen Beeinträchtigung zur verstärkten ROS-Synthese kommt.

4.2.2 Seneszenz auch als Folge von DNA-Schäden nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Die erhöhten ROS-Level können in diesem Zusammenhang auch eine mögliche Erklärung für die gezeigten DNA-Schäden nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 sein, da ROS über die Entstehung von 8-Oxoguanin und in der Folge möglicher DNA-Doppelstrangbrüche sowohl DNA-Schäden induzieren können, als auch eine Rolle in der Antwort auf DNA-Schäden spielen (Ock, 2012; Cannan *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2019). Diese DNA-Schäden können insbesondere in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen zu weiter ansteigenden ROS-Leveln führen, da DNA-Schäden über die Histon H2A.X-abhängige Aktivierung von Proteinen der NADP(H) Oxidase Familie (Nox) selbst ebenfalls wieder eine Quelle für ROS sind (Kang *et al.*, 2012) und die DDR in Krebszellen oftmals nur eingeschränkt funktionsfähig ist (Jin and Oh, 2019). In Folge der DNA-Schäden kann es dann zu einem G2/M-Arrest (siehe Abschnitt 1.4.2.3) und somit beispielsweise zur Seneszenzinduktion kommen (Jackson and Bartek, 2009). Zusammenfassend wären somit der zum einen höhere Energiebedarf der Krebszellen ebenso wie die in Krebszellen oftmals beeinträchtigte DDR eine mögliche Erklärung dafür, wieso zwar KRAS^{G12V}/MYC und *Empty Vector* Zellen DNA-Schäden nach der genannten Doppelbehandlung aufweisen, aber nur die KRAS^{G12V}/MYC Zellen mit deutlich erhöhten ROS-Leveln und Seneszenz auf die Therapie reagieren.

4.2.3 Alternativer Mechanismus der Seneszenzinduktion nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Wie in Abschnitt 1.4.2 ausführlich erläutert, sind die beiden Hauptsignalwege zur Induktion der zellulären Seneszenz zum einen der p53/p21 Signalweg sowie der p16/RB Signalweg. Es ließ sich nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 jedoch in beiden Fällen keine verstärkte Expression der entsprechenden Proteinlevel messen, weshalb die Seneszenz über einen alternativen Mechanismus induziert zu werden scheint. Dabei scheint die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase eine Rolle zu spielen, welche ebenfalls als möglicher Mediator der Seneszenzinduktion bekannt ist (Kwong *et al.*, 2013). Die Induktion von Seneszenz über p38 wird je nach

Enzymisoform in der Signalkaskade ebenfalls zum Teil über p53 bzw. p16 reguliert, was hier wie bereits genannt kein relevanter Signalweg zur Seneszenzinduktion nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu sein scheint. Insbesondere die über DNA-Schäden sowie ROS aktivierte Isoform p38 δ kann aber über Chk1/2 als Antwort auf DNA-Schäden unabhängig von p53 und p16 zur Seneszenzinduktion beitragen (Xu *et al.*, 2014). Wie in Abschnitt 1.4.2.3 erläutert, kann die Seneszenzinduktion bzw. ein Zellzyklusarrest über Chk1/2 im Rahmen der Antwort auf DNA-Schäden auch über die Proteinkinasen ATM und ATR ablaufen (Donzelli and Draetta, 2003). Abhängig von Chk1/2 kommt es nach der Induktion von DNA-Schäden zu einer Phosphorylierung der Phosphatasen Cdc25A und Cdc25C (Sanchez *et al.*, 1997; Matsuoka, 1998). Diese werden darüber inaktiviert, was den Progress aus der G2- in die M-Phase verhindert (Shiloh, 2003). Bulavin *et al.* (2001) konnten zeigen, dass es auch p38-abhängig im Rahmen von DNA-Schäden durch UV-Strahlung zu einem G2/M-Arrest kommen kann. p38 phosphoryliert dazu Cdc25B, welche darüber inaktiviert wird und es somit ebenfalls zu einem CDK1-abhängigen G2/M-Arrest kommt (Lammer *et al.*, 1998; Bulavin *et al.*, 2001).

Anhand der gezeigten Proteinexpression könnte die Seneszenzinduktion in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 somit nicht über einen klassischen, sondern über einen alternativen, p38-abhängigen Signalweg induziert werden (Abb. 23). Wie genau der Signalweg abläuft und welche weiteren Mediatoren darin eine Rolle spielen ist bislang aber nicht bekannt und muss in weiterführenden Experimenten, z.B. über die Bestimmung weiterer Proteinexpressionsmuster, charakterisiert werden.

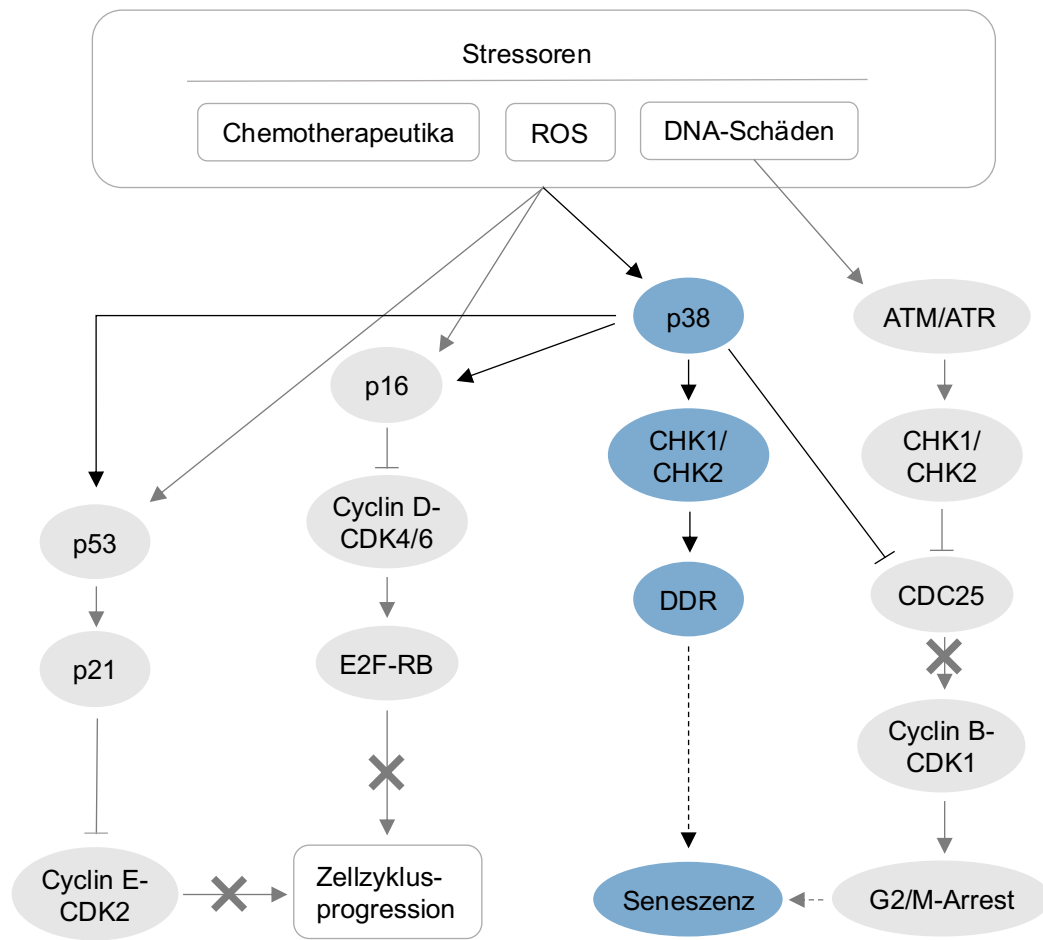


Abb. 23: Alternativer Mechanismus zur Seneszenzinduktion in $KRAS^{G12V}/MYC$ Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Nachdem die Induktion der Seneszenz in $KRAS^{G12V}/MYC$ Zellen nach der Behandlung mit (R)-GNE-140 ($7.5 \mu M$) und BMS-986205 ($6 \mu M$) scheinbar nicht über die klassischen Seneszenzinduktionssignalwege abläuft, scheint ein alternativer Mechanismus über p38 infolge von DNA-Schäden und ROS eine wichtige Rolle zu spielen.

4.2.4 Morphologische Veränderungen der Mitochondrien in Krebszellen nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205

Durch die Kombinationstherapie aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 gerät die Zelle durch die Inhibition der Glykolyse in einen Zustand der Energiedepletion. Im Energiehaushalt der Zellen spielt die Proteinkinase AMPK eine zentrale Rolle, da sie insbesondere in metabolischen Stresssituationen unter AMP-Mangel aktiviert wird (Garcia and Shaw, 2017). Auch in der mitochondrialen Biogenese spielt AMPK eine Rolle, wobei die Aktivierung von AMPK Mitochondrien auf unterschiedliche Arten beeinflussen kann (Ren *et al.*, 2020). AMPK führt beispielsweise in der Folge von metabolischem Stress zu einer gesteigerten mitochondrialen Fission (Toyama *et al.*, 2016). Bei der Fission erhöht sich

die Anzahl der Mitochondrien durch die Teilung eines Mitochondriums in zwei weitere, wobei die Fission unter anderem in der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Chan, 2006; Adebayo *et al.*, 2021). Ebenso kommt es durch die Aktivierung von AMPK zu einer Induktion der Genexpression des transkriptionellen Coaktivators *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α* (PGC-1 α), welcher eine Hauptrolle in der mitochondrialen Biogenese spielt und zur Formation neuer Mitochondrien beiträgt (Jäger *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2022).

Wie bereits gezeigt, führt die Doppelbehandlung der Zellen mit dem LDHA-Inhibitor (R)-GNE-140 und dem IDO1-Inhibitor BMS-986205 zu morphologischen Veränderungen der Mitochondrien, wobei die Mitochondrien nach der Behandlung zahlreicher und verkleinert im Zytoplasma vorzuliegen scheinen. Ebenso lassen sich die Cristae der Mitochondrien nach der genannten Doppeltherapie insbesondere in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen fast nicht mehr darstellen, während sie in den unstimulierten Zellen in einigen Fällen klar erkennbar sind. Diese mitochondrialen Veränderungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass insbesondere die KRAS^{G12V}/MYC Zellen in ihrer oxidativen Phosphorylierung und somit in ihrem Energiemetabolismus eingeschränkt sind. Für eine beeinträchtigte oxidative Phosphorylierung würden ebenfalls die beobachteten erhöhten ROS-Level sprechen, welche bei Inhibition der OXPHOS bekanntermaßen beobachtet werden können (Esposito *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2018). Aufgrund der Inhibition der Glykolyse mittels des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 müsste es prinzipiell zu einer verstärkten OXPHOS in den Zellen kommen, damit die Zellen weiterhin ihr benötigtes Energieniveau aufrechterhalten können (Shiratori *et al.*, 2019). Eine Störung in diesem Ablauf würde insbesondere die Krebszellen beeinträchtigen, welche durch ihren erhöhten Energiebedarf verglichen mit gesunden Zellen auf eine besonders hohe Zufuhr und Verwendung von Glucose angewiesen sind (Jang, Kim and Lee, 2013). Durch die zusätzliche Beeinträchtigung der OXPHOS neben der bereits inhibierten Glykolyse könnte daher aufgrund des höheren Energieumsatzes von Krebszellen möglicherweise erklärt werden, warum die verwendete Doppelbehandlung selektiv das Wachstum von KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen inhibiert, während die *Empty Vector* Zellen weiterhin proliferieren können.

4.3 Zytotoxischer Effekt von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auch in anderen Krebszelllinien

4.3.1 Heterogene Antworten auf die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 in unterschiedlichen Krebszelllinien

In Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass einige Krebszelllinien ebenfalls eine Seneszenzinduktion zeigen, wohingegen andere Krebszelllinien morphologisch apoptotisch aussehen, jedoch keine erhöhte Expression von Apoptosemarkern aufweisen. Gründe für diese heterogenen Antworten könnten zum Beispiel unterschiedliche Kompensationsmechanismen der einzelnen Zelllinien in Bezug auf die toxische Wirkung von Chemotherapeutika sein. Ein möglicher Kompensationsmechanismus wäre zum Beispiel die verstärkte Expression von MDR1 (*Multidrug-Resistance-Protein 1*), wodurch es zu einem vermehrten Einbau von P-gp (P-glykoprotein) in die Zellmembran käme. Dabei handelt es sich um einen Transporter, der ATP-abhängig unter anderem Medikamente wie Zytostatika wieder aus Zellen herauspumpt (Graefe, Lutz and Bönisch, 2016). Der vermehrte Einbau von P-gp lässt sich z.B. bei einigen Ovarialkarzinomen, aber auch bei Mammakarzinomen oder Kolonkarzinomen nachweisen (Veneroni *et al.*, 1994), was häufig ein schlechteres Ansprechen auf bekannte Chemotherapeutika wie Vinblastin zur Folge hat (Skinner, Palkar and Hong, 2023). Ob eine erhöhte Expression von MDR1 bzw. ein vermehrter Einbau von P-gp ein Grund für das unterschiedliche Ansprechen der in Abschnitt 3.3 verwendeten Krebszelllinien auf die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 ist, könnte mit nachfolgenden Experimenten wie Western Blots oder mittels Immunfluoreszenz näher untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit für den Grund des heterogenen Ansprechens verschiedener Krebszelllinien auf die genannte Doppelbehandlung wäre nach Inhibition der Glykolyse der Nutzen alternativer Metabolite für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus. Insbesondere die H1975 Zellen sowie die PC9 Zellen als Zelllinien des NSCLC sprachen in geringerem Ausmaß auf die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 an. Eine andere Studie konnte zeigen, dass insbesondere Zelllinien des NSCLC in der Lage sind, über einen alternativen Stoffwechselweg, der Makropinozytose, ihren Metabolismus glucoseunabhängig aufrecht zu erhalten. Bei der Makropinozytose werden extrazelluläre Proteine durch die Zelle aufgenommen und anschließend verstoffwechselt, wodurch die Zellen auch in Abwesenheit von Glucose weiter proliferieren können (Hodakoski *et al.*, 2019). In weiterführenden Experimenten könnte über die Analyse der

Proteinexpressionsmuster der entsprechenden Signalkaskaden genauer charakterisiert werden, ob dies im Falle der H1975 bzw. PC9 Zellen die Ursache für den fehlenden Synergismus der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 ist.

Auch der heterogene Metabolismus von Tumorzellen kann eine Ursache für das unterschiedliche Ansprechen auf Chemotherapeutika darstellen. So konnte bspw. gezeigt werden, dass Krebszellen mit einer verringerten Expression der Asparaginsynthetase (ASNS), und somit reduzierten Asparaginleveln, verstärkt auf die Behandlung mit Asparaginase ansprechen (Li *et al.*, 2019). Die Asparaginase wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt (Ortega *et al.*, 1977).

4.4 Selektivität der Therapiekombination für Krebszellen

4.4.1 Selektivität von (R)-GNE-140 und BMS-986205 für Krebszellen

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 zwar selektiv die KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen angreift, jedoch auch die gesunden *Empty Vector* Zellen in einem gewissen Maß beeinträchtigt werden. Allgemein ist es in der Therapie von Krebserkrankungen eine häufige Einschränkung, dass die Selektivität der Chemotherapie für Tumorzellen nicht ausreichend ist und auch gesunde Zellen mit angegriffen werden. Dies trifft auch auf metabolische Inhibitoren zu, da diese nicht nur den gesteigerten Metabolismus von Tumorzellen inhibieren, sondern zu einem gewissen Teil auch den Metabolismus gesunder Zellen (Hammoudi *et al.*, 2011), wie auch in den obigen Experimenten beobachtet werden konnte. In zukünftigen Experimenten, bspw. im Tiermodell oder auch *in vivo*, wird es daher eine Herausforderung, die genaue Dosis von (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu finden, die weiterhin selektiv Tumorzellen angreift, ohne einen zu starken toxischen Effekt auf die gesunden Zellen auszuüben.

Als Limitationen bezüglich der Beurteilbarkeit der Krebszellselektivität des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 in Kombination mit dem IDO1-Inhibitor BMS-986205 sei hier zum einen die Arbeit in der Zellkultur erwähnt, welche lediglich die Bedingungen *in vitro* repräsentiert. Ob die Zellselektivität der Doppelbehandlung auch *in vivo* erhalten werden kann, müsste in zukünftigen Experimenten bspw. mittels eines Mausmodells getestet werden. Zum anderen wird die Beurteilbarkeit der Zellselektivität der genannten Doppeltherapie durch unterschiedliche Wachstumskurven von KRAS^{G12V}/MYC Zellen bzw.

Empty Vector Zellen beeinflusst. Dieser Einschränkung wurde in den oberen Experimenten versucht mit einer Anpassung der ausgesäten Zellen in den Experimenten zu begegnen, damit zum Behandlungszeitpunkt jeweils eine ähnliche Anzahl von KRAS^{G12V}/MYC bzw. *Empty Vector* Zellen der Doppeltherapie ausgesetzt war.

4.4.2 Möglichkeiten für eine verbesserte Krebszellselektivität in der Tumorthherapie

Aufgrund der bereits beschriebenen Einschränkungen von Chemotherapeutika bzgl. ihrer Selektivität für Tumorzellen und ihrer zusätzlichen Wirkung auf gesunde Zellen, gibt es seit einiger Zeit Möglichkeiten die Tumorzellselektivität von Chemotherapeutika positiv zu beeinflussen. Diese Möglichkeiten eignen sich unter Umständen in angepasster Form auch für die Therapie des HGSOE.

Ein Beispiel für eine selektive Krebstherapie wäre die Immuntherapie mittels Antikörper, welche sich gezielt gegen Oberflächenantigene richten, die bspw. auf Tumorzellen exprimiert werden. Eine solche Immuntherapie wird seit einigen Jahren erfolgreich in der Therapie des Neuroblastoms bei Kindern angewendet. Bei der Immuntherapie des Neuroblastoms werden monoklonale Antikörper eingesetzt, welche sich gegen das Disialogangliosid GD2 auf der Zellmembran richten. Da GD2 insbesondere auf Neuroblastomzellen exprimiert wird, ist über die Immuntherapie hier eine relativ tumorspezifische Therapie möglich (Chan and Chan, 2022). Auch auf Ovarialkarzinomzellen wurden in der Vergangenheit Oberflächenmoleküle gefunden, welche sich unter Umständen für eine spezifische Immuntherapie eignen können und so ggf. den Therapieerfolg erhöhen können. Besonders vielversprechend erscheint dabei das basale Zelladhäsionsmolekül (BCAM), welches in mehreren Ovarialkarzinomtypen vermehrt exprimiert wird, insbesondere aber beim HGSOE (Schröfelbauer *et al.*, 2023). Seit einigen Jahren wird intensiv an der Entwicklung von Chemoimmunkonjugaten (*antibody drug conjugate*, ADC) geforscht, wobei ein bestimmtes Chemotherapeutikum an einen monoklonalen Antikörper gekoppelt wird (Sochaj, Świdarska and Otlewski, 2015). Dies könnte man sich auch in der Therapie des HGSOE zu nutzen machen, in dem man zum Beispiel die Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 an einen monoklonalen Antikörper gegen BCAM koppelt, und so die Tumorzellselektivität erhöht. Ob sich BCAM wirklich als Zielmolekül für eine spezifischen Immuntherapie des HGSOE eignet, muss allerdings in weiterführenden Studien überprüft und beantwortet werden. Ein Beispiel für eine bereits etablierte Tumorthherapie mit ADCs ist die Therapie des HER2-positiven

metastasieren Mammakarzinoms mit Trastuzumab-Emtansin, wobei der monoklonale HER2-Antikörper Trastuzumab mit dem Mitosehemmstoff Mertansin gekoppelt wird (Verma *et al.*, 2012).

Neben der selektiven Krebstherapie durch Antikörper lassen sich Tumorzellen zum Beispiel auch gezielt über Nanopartikel wie Liposomen angreifen. Bei Liposomen handelt es sich um sphärische Vesikel mit einer hydrophoben Phospholipiddoppelschicht als Hülle und einem hydrophilen Kern, welcher zum Beispiel hydrophile Chemotherapeutika beherbergen kann (Müller-Esterl, 2018). Werden die Chemotherapeutika-beladenen Liposomen nun noch mit Liganden gekoppelt, die gezielt Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen erkennen, ermöglicht dies einen selektiveren Angriff von Krebszellen verglichen mit gesunden Zellen. Tumorzellen exprimieren verglichen mit gesunden Zellen zum Beispiel verstärkt einen Transferrin-Rezeptor (TfR), welcher für die Eisenaufnahme der Zellen verantwortlich ist (Fan *et al.*, 2023). Transferrin kann nun als Ligand an die mit einem Chemotherapeutikum beladenen Liposomen gekoppelt werden und gezielt die TfR-exprimierenden Tumorzellen angreifen (Wang *et al.*, 2023). Der Effekt von mit Oxaliplatin-beladenen Liposomen, welche zusätzlich Transferrin als Ligand exprimieren, wird aktuell in klinischen Phase I- bzw. Phase II-Studien untersucht (Fan *et al.*, 2023). Neben Tumorzellen wird der TfR natürlich auch auf einigen gesunden Zellen zur Resorption von Eisen exprimiert, was den therapeutischen Nutzen aufgrund der möglichen Toxizität limitieren könnte (Ponka and Lok, 1999).

4.4.3 Möglichkeiten zur Verringerung der Chemotherapie-assoziierten Toxizität

Neben der im vorherigen Abschnitt erwähnten Problematik der häufig unzureichenden Tumorzellselektivität von Chemotherapeutika ist deren zusätzlich vorhandene allgemeine Zelltoxizität eine weitere Herausforderung im Management von Tumorerkrankungen. Cisplatin ist beispielsweise ein häufig eingesetztes Chemotherapeutikum, welches durch seine bekannte nephrotoxische Wirkung allerdings in seiner Dosierung limitiert ist (Volarevic *et al.*, 2019). Möglichkeiten die Nephrotoxizität und somit bereits eine Nebenwirkung zu minimieren sind hier zum einen eine dauerhafte und ausreichende Hydrierung der Patientinnen und Patienten (Grona *et al.*, 2017). Zum anderen wurde in Studien herausgefunden, dass eine Hypomagnesiämie dazu führen kann, dass es durch den vermehrten Einbau bestimmter Transporter in der Niere zu einer gesteigerten Aufnahme von Cisplatin und somit zu einer erhöhten Nephrotoxizität kommen kann. Ein ausgeglichener Elektrolythaushalt trägt dementsprechend ebenfalls dazu bei, dass Risiko

einer nephrotoxischen Wirkung von Cisplatin zu reduzieren (Yokoo *et al.*, 2009; Crona *et al.*, 2017).

Inwieweit die Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 eine generelle Zytotoxizität aufweist und welche Nebenwirkungen *in vivo* zu erwarten sind und angegangen werden sollten, müssen im Verlauf weitere Experimente zum Beispiel im Rahmen von Versuchsreihen im Mausmodell zeigen. Diese Experimente sind auch zur geeigneten Dosisfindung der Therapiekombination *in vivo* wichtig, da die Dosierung, wie am Beispiel von Cisplatin gezeigt, oft einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität von Chemotherapeutika hat. So wäre es über eine angepasste Dosierung bereits möglich, Nebenwirkungen wie die Nephro- oder auch Hepatotoxizität zu reduzieren.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 in verschiedenen Krebszelllinien zur Induktion von Seneszenz führt. Einige Zelllinien zeigten jedoch ein vermindertes Ansprechen auf die Doppelbehandlung bzw. zeigten zumindest morphologische Aspekte einer Apoptoseinduktion, welche auf der Ebene der Proteinexpression jedoch nicht nachweisbar war. Diesbezüglich könnte in optimierten Experimenten untersucht werden, ob eine Veränderung der Rahmenbedingungen dazu führt, dass die untersuchten Zelllinien auch auf Proteinexpressionsebene Marker der Apoptoseinduktion zeigen. Möglichkeiten hierfür wären zum Beispiel eine Verlängerung der Inkubationszeit mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 oder auch eine Restimulation nach einer gewissen ersten Inkubationszeit.

Im Hinblick auf mögliche zukünftige klinische Einsatzmöglichkeiten der genannten Doppeltherapie müssen außerdem auch Experimente außerhalb der Zellkultur *in vivo* durchgeführt werden, beispielsweise im Rahmen eines Mausmodells. Dies ist zum einen wichtig um die Wirksamkeit der Doppelbehandlung von (R)-GNE-140 und BMS-986205 auch außerhalb der Zellkultur zu belegen, zum anderen aber auch um mögliche limitierende Nebenwirkungen der Doppeltherapie abschätzen zu können, welche sich unter Umständen erst im lebenden Organismus zeigen, nicht aber *in vitro*.

Bezogen auf den Einsatz der Doppelbehandlung in klinischen Experimenten *in vivo* bleibt auch die Seneszenzinduktion als ein Hauptcharakteristikum des Effekts der synergistischen Wirkung von (R)-GNE-140 und BMS-986205 zu bedenken. Seneszenz

Zellen können mittels SASP benachbarte Zellen beeinflussen und so je nach SASP auch prokanzerogene Effekte zeigen (Lee and Schmitt, 2019). Um diese möglichen therapielimitierenden Effekte zu umgehen, wäre der zusätzliche Einsatz von Senolytika neben der bestehenden Doppelbehandlung eine Option. Bei Senolytika handelt es sich um Therapeutika, welche selektiv seneszente Zellen angreifen (Zhang *et al.*, 2023). Ein Beispiel für eine solche Therapiemöglichkeit wäre der Einsatz von Panobinostat, einem Histondeacetylaseinhibitor, welcher bereits in einer anderen Studie senolytische Effekte auf chemotherapieinduzierte seneszente NSCLC-Zellen zeigte (Samaraweera *et al.*, 2017). Ob ein ähnlicher Effekt auch bei den KRAS^{G12V}/MYC Zellen nachweisbar ist und sich somit unter Umständen ein späterer klinischer Nutzen durch eine weitere Optimierung des synergistischen Effekts von (R)-GNE-140 und BMS-986205 ergibt, müsste vorerst durch weiterführende Experimente überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Beim Ovarialkarzinom handelt es sich um die häufigste tödliche Krebserkrankung bei Frauen nach dem Mammakarzinom. Insbesondere aufgrund der fehlenden Frühsymptome, der hohen Rezidivrate sowie therapierefraktärer Verläufe ist die kurative Therapie des Ovarialkarzinoms nach wie vor schwierig. Ziel dieser Studie war es daher, eine synergistische Kombination aus zwei metabolischen Inhibitoren zu identifizieren, die selektiv auf Krebszellen wirkt und diese anschließend zu charakterisieren. Dabei zeigte sich insbesondere die Kombination des LDHA-Inhibitors (R)-GNE-140 und des IDO1-Inhibitors BMS-986205 als vielversprechend, da die Kombination beider Inhibitoren auf KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen eine synergistische Zytotoxizität aufwies. Initial zeigten sowohl die nicht onkogen transformierten *Empty Vector* Kontrollzellen als auch die durch Expression von KRAS^{G12V}/MYC transformierten Krebszellen eine Zunahme der Zellgröße nach Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205, wohingegen weitere Experimente jedoch die selektive Induktion von Seneszenz in KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen zeigten. Ebenso konnte nach Kombination beider Inhibitoren eine Akkumulation der KRAS^{G12V}/MYC Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus festgestellt werden. Sowohl in den *Empty Vector* Kontrollzellen, als auch in den KRAS^{G12V}/MYC Krebszellen, fiel nach der Doppelbehandlung ein vermehrtes Vorkommen von γ H2A.X als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche auf. Des Weiteren konnten in der elektronenmikroskopischen Betrachtung der KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 morphologische Veränderungen der Mitochondrien in Bezug auf deren Größe, Form und Anzahl nachgewiesen werden. Dies galt auch für die *Empty Vector* Zellen, hier allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß. Auch zeigte sich lediglich in den KRAS^{G12V}/MYC Zellen verglichen mit den *Empty Vector* Zellen nach der Doppelbehandlung ein deutlicher Anstieg von ROS-Leveln. Die gezeigten Effekte der genannten Doppelbehandlung auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen ließen sich zum Teil auch auf weitere Krebszelllinien wie z.B. MCF-7 oder HT-29 Zellen übertragen. Einige weitere Zelllinien wie RPE-1 Zellen reagierten ebenfalls mit Seneszenz auf die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205, während beispielsweise in PC9 Zellen kein relevanter zytotoxischer Effekt nachweisbar war. Auch ließ sich die Akkumulation in der G2/M-Phase nach der genannten Doppelbehandlung in einigen weiteren Krebszelllinien wie HeLa oder SW620 Zellen zeigen. Bei der Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 handelt es sich damit um eine neue, bislang nicht etablierte Kombination zweier metabolischer Inhibitoren, welche einen synergistischen zytotoxischen Effekt nicht

nur auf KRAS^{G12V}/MYC Ovarialkarzinomzellen, sondern auch auf eine Reihe weiterer Krebszelllinien zeigt. Der synergistische Wirkmechanismus lässt sich vermutlich auf die fehlende gegenseitige Kompensation von Glykolyse und OXPHOS zurückführen. Der LDHA-Inhibitor (R)-GNE-140 inhibiert die Glykolyse, in Kombination mit BMS-986205 zeigte sich zusätzlich auch noch der Verlust mitochondrialer Cristae und somit in der Folge vermutlich auch eine Verringerung der oxidativen Phosphorylierung. Durch die gleichzeitige Inhibition von Glykolyse und OXPHOS kommt es in Folge des entstehenden zellulären Energiemangels sehr wahrscheinlich schlussendlich zur Induktion von Seneszenz.

6 Summary

After breast cancer, ovarian cancer is one of the deadliest forms of cancer in women. Because of the lack of typical early symptoms, a high recurrence rate and therapy-refractory courses, the treatment of ovarian cancer is still difficult. It was therefore the aim of this study to identify and characterize a combination of metabolic inhibitors, which are selectively targeting cancer cells and which could subsequently become a new therapeutic option in the treatment of ovarian cancer. Especially the combination of the LDHA inhibitor (R)-GNE-140 and the IDO1 inhibitor BMS-986205 appeared to be promising, because the combination of both inhibitors had shown a synergistic cytotoxicity on KRAS^{G12V}/MYC cancer cells. Initially, both non-oncogenically transformed Empty Vector control cells and the cancer cells transformed by expression of KRAS^{G12V}/MYC showed an increase in cell size after double treatment with (R)-GNE-140 and BMS-986205, whereas further experiments showed the selective induction of senescence in KRAS^{G12V}/MYC cancer cells. Likewise, an accumulation of KRAS^{G12V}/MYC cells in the G2/M phase of the cell cycle was observed after combination of both inhibitors. After double treatment, both Empty Vector control cells and KRAS^{G12V}/MYC cancer cells showed an increased occurrence of γ H2A.X as a marker of DNA double-strand breaks. Furthermore, electron microscopic examination of the KRAS^{G12V}/MYC cells after double treatment with (R)-GNE-140 and BMS-986205 revealed morphological changes in the mitochondria in terms of their size, shape and number. This also applied to the Empty Vector cells, but to a much lesser extent. Furthermore, only KRAS^{G12V}/MYC cells had shown a significant increase in ROS levels compared to healthy Empty Vector cells after double treatment. The effects of the double treatment with (R)-GNE-140 and BMS-986205 on KRAS^{G12V}/MYC cells could also be partially transferred to other cancer cell lines such as MCF-7 or HT-29 cells. Some other cell lines such as RPE-1 cells also

responded with senescence to treatment with (R)-GNE-140 and BMS-986205, while no relevant cytotoxic effect was detectable in PC9 cells, for example. Accumulation in the G2/M phase after the mentioned double treatment was also shown in some other cancer cell lines such as HeLa or SW620 cells. The combination of (R)-GNE-140 and BMS-986205 is thus a new, previously unestablished combination of two metabolic inhibitors that shows a synergistic cytotoxic effect not only on KRAS^{G12V}/MYC ovarian cancer cells, but also on several other cancer cell lines. The synergistic mechanism can presumably be attributed to the lack of mutual compensation of glycolysis and OXPHOS. The LDHA inhibitor (R)-GNE-140 inhibits glycolysis; in combination with BMS-986205, the loss of mitochondrial cristae and thus presumably also a reduction in oxidative phosphorylation was also shown. The simultaneous inhibition of glycolysis and OXPHOS very likely ultimately leads to the induction of senescence as a result of the occurring cellular energy deficiency.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2-HG	2-Hydroxyglutarat
Abb.	Abbildung
ADC	Antibody drug conjugate (Antikörper-Wirkstoff-Konjugat)
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Kinase
Apaf-1	Apoptose-auslösender Faktor 1
APS	Ammonium persulfat
ASNS	Asparaginsynthetase
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia teleangiectasia and Rad3-Related
BCA	bicinchoninic acid
BCAM	Basales Zelladhäsionsmolekül
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA	Breast Cancer Gene
BSA	Bovine Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
Caspasen	Cysteiny-Aspartyl-Proteasen
Cdc	Cell division cycle
CDKi	CDK-Inhibitoren
Chk1/2	Checkpoint Kinase 1/2
CKD	Cyclin-abhängige Kinase
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated Protein 4
CTR1	Copper Transporter 1
DD	Death domain (Todesdomäne)
DDR	DNA Damage Response

DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimehyl sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DR	Death receptor (Todesrezeptoren)
DSB	Doppelstrangbruch
E2F	E2 transcription factor
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
entspr.	entsprechend
EV	Empty Vector
FADD	Fas associated death domain containing protein
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FEN-1	Flap endonuclease-1
G0-Phase	Zelluläre Quieszenz
G1-/G2-Phase	Gap 1-/Gap 2-Phase
G6P	Glucose-6-Phosphat
GLUT	Glucosetransporter
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGSOC	Hochgradig seröses Ovarialkarzinom
HR	Homologe Reparatur
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IC ₇₅	75%igen inhibitorischen Konzentration
IDH	Isocitratdehydrogenase
IDO1	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
iFTSEC	Immortalisierte sekretorische Epithelialzellen des Eileiters
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LAT1	large neutral amino acid transporter 1

LDH	Lactatdehydrogenase
M-Phase	Mitose-Phase
mAb	Monoklonaler Antikörper
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MDR1	Multidrug-Resistance Protein 1
MYC	Myelocytomatosis
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Nox	NADP(H) Oxidase
NP-40	Nonidet P-40
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
ODC	Ornithindecaboxylase
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
P-gp	P-glykoprotein
P53	Tumorprotein p53
pAb	Polyklonaler Antikörper
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase
PFK	Phosphofruktokinase
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α
PHGDH	Phosphoglycerat Dehydrogenase
PI	Propidiumiodid
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Retinoblastom Protein
RIPA	radio immunoprecipitation assay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	Synthese-Phase
SA β -Gal	Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase
SAMD	Seneszenz-assoziierte mitochondriale Dysfunktion
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SDS	Natriumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
STIC	Serös tubares intraepitheliales Karzinom
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween20
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel

8 Kollaborationen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden von mir persönlich unter der Supervision von Prof. Lienhard Schmitz und Dr. Jan Dreute durchgeführt und ausgewertet. Experimente, die in Zusammenarbeit mit weiteren Personen durchgeführt wurden, sind im Folgenden aufgelistet.

- Abbildung 7** Zusammenarbeit mit Dr. Jan Dreute
- Abbildung 15** Zusammenarbeit mit Dr. Jan Dreute und Till Wöckener
- Abbildung 17** Zusammenarbeit mit Dr. Jan Dreute
- Abbildung 18** Zusammenarbeit mit Dr. Jan Dreute und dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU

9 Anhang

Tabelle 6: WHO-Einteilung der Ovarialtumoren

Tumoreinteilung	
Epitheliale Tumoren	seröse Tumoren
	muzinöse Tumoren
	endometrioiden Tumoren
	klarzellige Tumoren
	Brennertumoren
	seromuzinöse Tumoren
	undifferenziertes Karzinom
Gemischte epithelial-mesenchymale Tumoren	

Tabelle 7: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (in Anlehnung an Kaufmann, 2013; S. 545)

TNM	FIGO	Befund
T1	I	Tumor ist auf die Ovarien begrenzt
T2	II	Tumorbefall von einem oder beiden Ovarien mit Ausbreitung in das Becken
T3 und/oder N1	III	Tumorbefall von einem oder beiden Ovarien mit nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionalen Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (außer Peritonealmetastasen)
NX	–	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	–	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	–	Regionale Lymphknotenmetastasen vorhanden

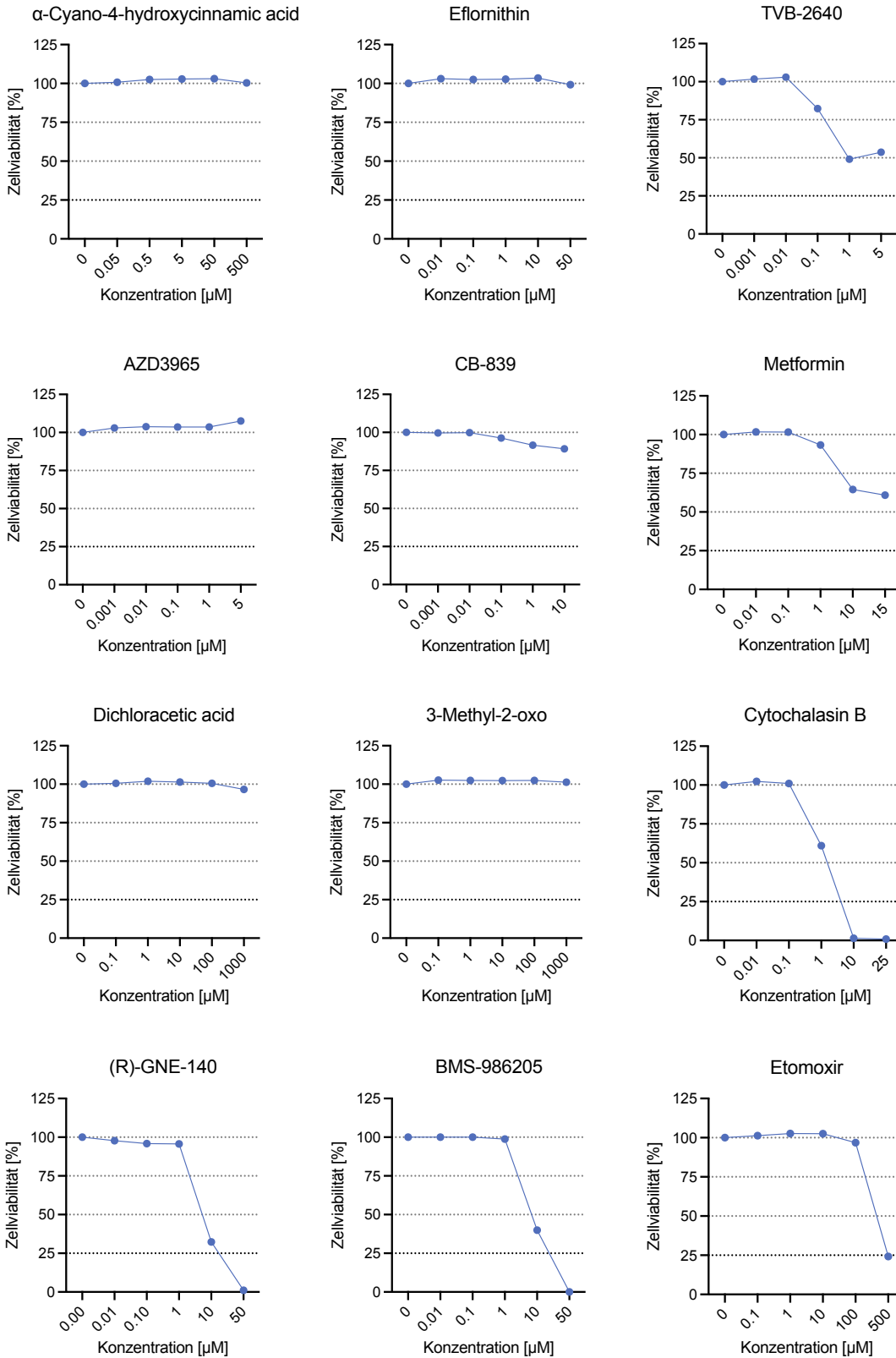


Abb. 24: Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener Inhibitoren auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

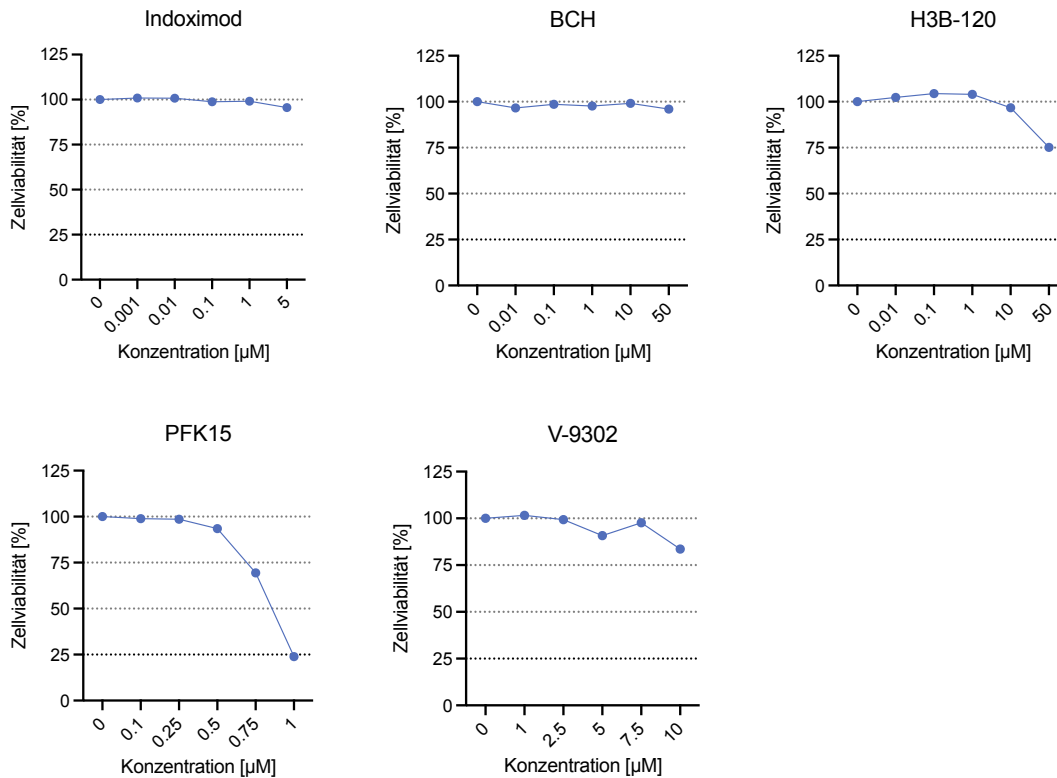
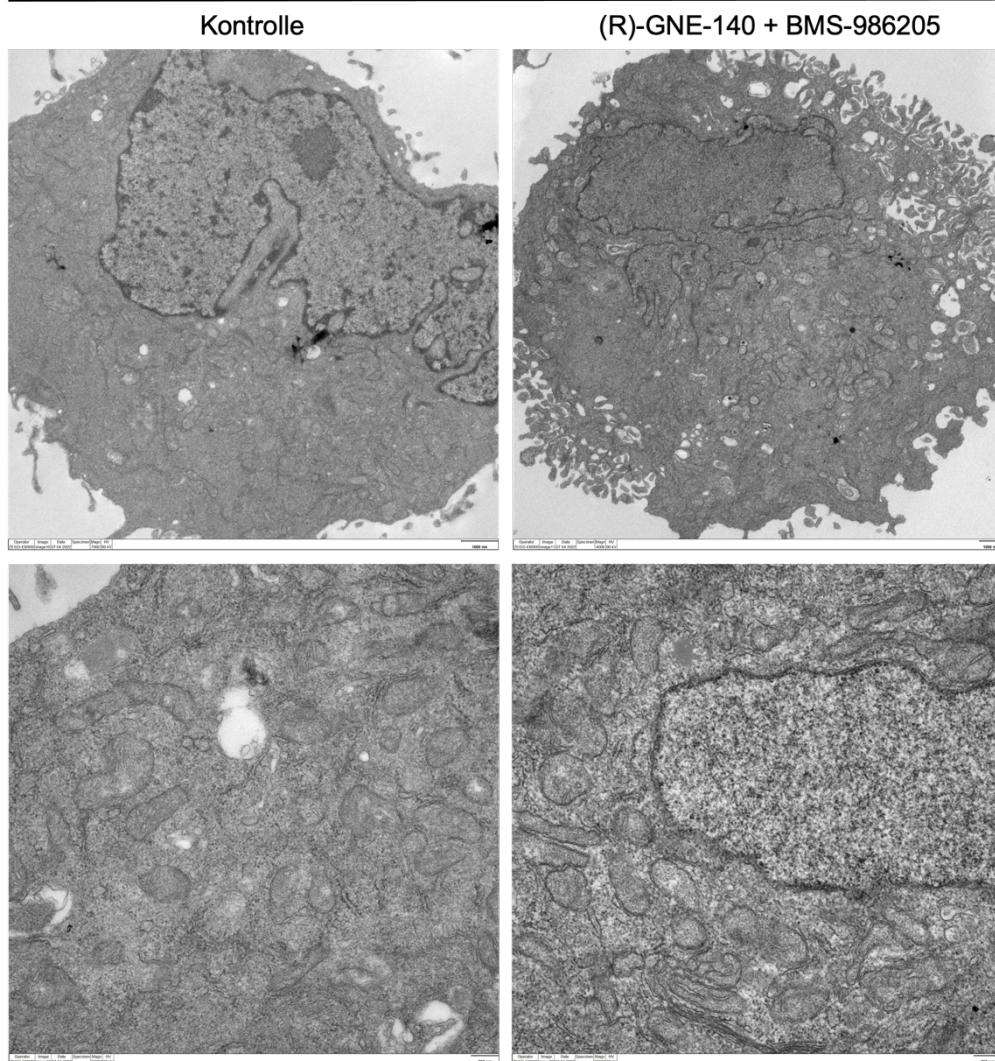


Abb. 24 (Fortsetzung): Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener Inhibitoren auf KRAS^{G12V}/MYC Zellen. Um geeignete Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren zu finden, wurden verschiedene Inhibitor-Konzentrationen auf den KRAS^{G12V}/MYC Zellen getestet und die Zytotoxizität anschließend anhand eines Zellviabilitätstests bewertet. Die anschließend verwendeten Konzentrationen wurden anhand der 75%igen inhibitorischen Konzentrationen (IC₇₅-Werte) bestimmt.

Empty Vector



In Kollaboration mit Dr. U. Gärtner –
Institut für Anatomie und Zellbiologie (JLU)

Abb. 25: Elektronenmikroskopische Darstellung von Mitochondrien in Empty Vector Zellen vor und nach der Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205. Auch die Empty Vector Zellen zeigen nach der Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 (7.5 μ M) und BMS-986205 (6 μ M) mitochondriale Veränderungen. Die Skala entspricht 1000 nm bzw. 250 nm.

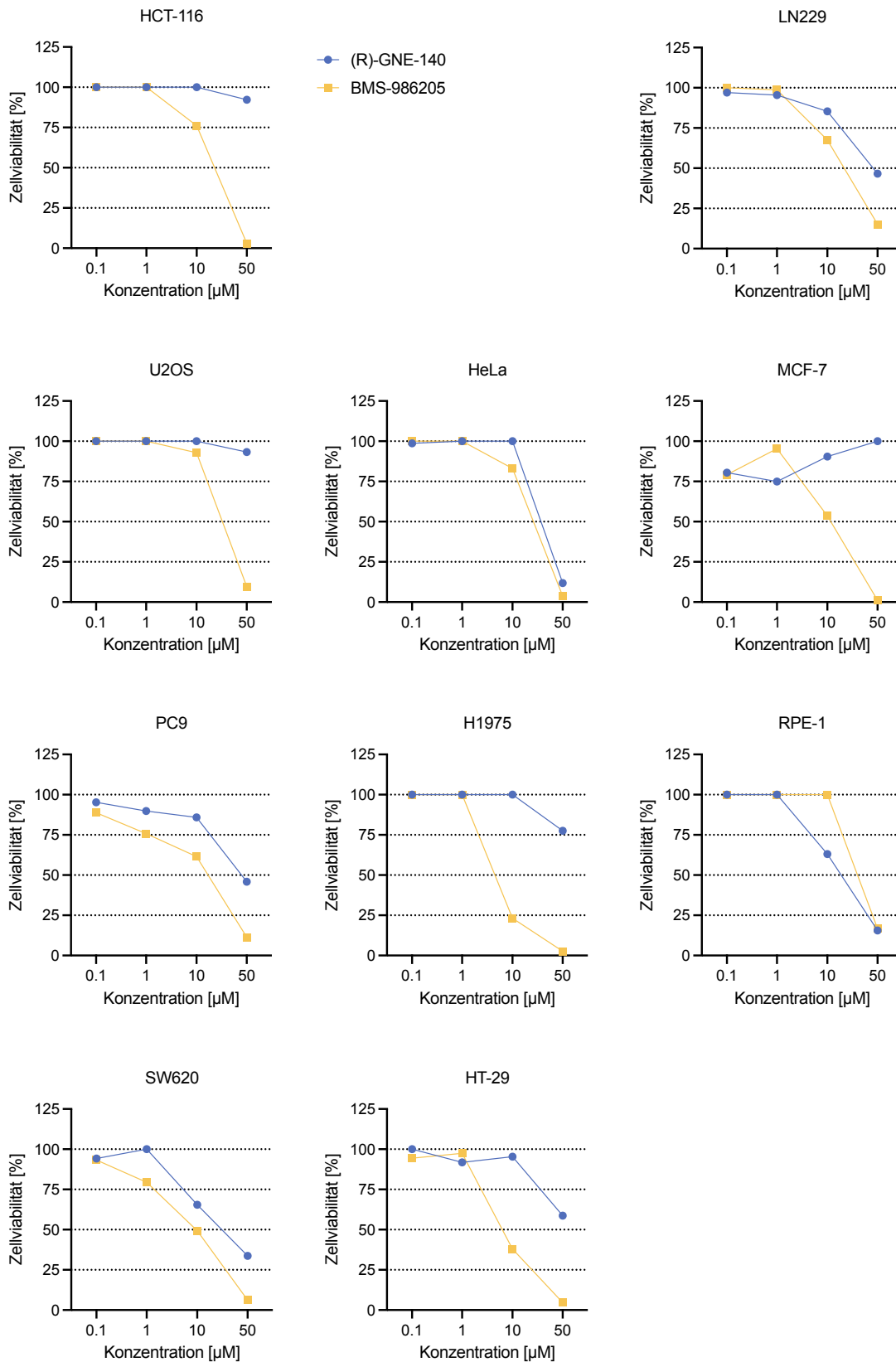


Abb. 26: Dosis-Wirkungs-Kurven zur Testung von Inhibitoren auf verschiedenen Krebszelllinien. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

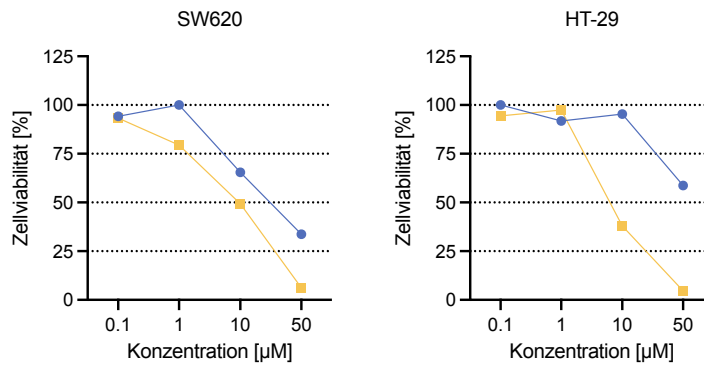


Abb. 26 (Fortsetzung): Dosis-Wirkungs-Kurven zur Testung von Inhibitoren auf verschiedenen Krebszelllinien. Testung der Kombination aus (R)-GNE-140 und BMS-986205 in verschiedenen Konzentrationen auf den Krebszelllinien aus Abb. 19, die Zytotoxizität wurde anschließend anhand eines Zellviabilitätstests bewertet. Die anschließend verwendeten Konzentrationen wurden anhand der IC_{75} -Werte bestimmt.

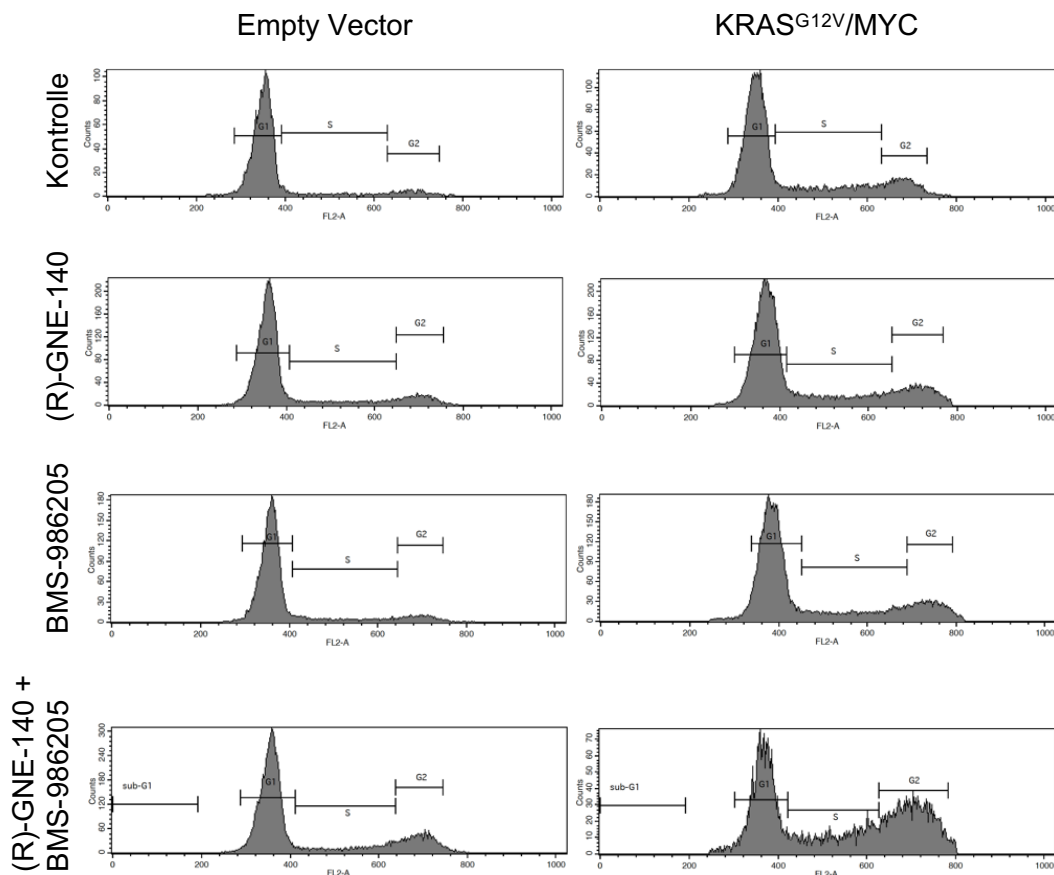


Abb. 27: Zellzyklusprofile von Empty Vector Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen unter verschiedenen Therapiebedingungen. Zellzyklusverteilung von Empty Vector Zellen und KRAS^{G12V}/MYC Zellen nach Mono- bzw. Doppelbehandlung mit (R)-GNE-140 (7.5 µM) und BMS-986205 (6 µM) mittels Propidium Iodid Färbung. Nach Aussaat erfolgte die Behandlung mit (R)-GNE-140 und BMS-986205 am darauffolgenden Tag für jeweils 48 Stunden bis zur Zellernte.

10 Literaturverzeichnis

- Acosta, J.C. *et al.* (2013) 'A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence', *Nature Cell Biology*, 15(8), pp. 978–990. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2784>.
- Adebayo, M. *et al.* (2021) 'Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis', *The FASEB Journal*, 35(6). Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.202100067R>.
- Aggarwal, V. *et al.* (2019) 'Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements', *Biomolecules*, 9(11), p. 735. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom9110735>.
- Ahmed, A.A. *et al.* (2010) 'Driver mutations in *TP53* are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary: *TP53* mutation in high-grade pelvic serous carcinoma', *The Journal of Pathology*, 221(1), pp. 49–56. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.2696>.
- Akram, M. (2013) 'Mini-review on Glycolysis and Cancer', *Journal of Cancer Education*, 28(3), pp. 454–457. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13187-013-0486-9>.
- Alfarouk, K.O. *et al.* (2015) 'Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp', *Cancer Cell International*, 15(1), p. 71. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>.
- Almeida-Nunes, D.L. *et al.* (2023) 'Enhancing Immunotherapy in Ovarian Cancer: The Emerging Role of Metformin and Statins', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), p. 323. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25010323>.
- Alshiekh Nasany, R. and De La Fuente, M.I. (2023) 'Therapies for IDH-Mutant Gliomas', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 23(5), pp. 225–233. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11910-023-01265-3>.
- Arrieta, O. *et al.* (2019) 'Effect of Metformin Plus Tyrosine Kinase Inhibitors Compared With Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial', *JAMA Oncology*, 5(11), p. e192553. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2553>.
- Asadi, M. *et al.* (2022) 'Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), pp. 1633–1645. Available at: <https://doi.org/10.1002/bab.2233>.
- Banin, S. *et al.* (1998) 'Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), pp. 1674–1677. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1674>.
- Barnum, K.J. and O'Connell, M.J. (2014) 'Cell cycle regulation by checkpoints', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1170, pp. 29–40. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
- Bast, R.C. (ed.) (2016) *Holland-Frei cancer medicine*. 9th edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Bhatti, J.S., Bhatti, G.K. and Reddy, P.H. (2017) 'Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), pp. 1066–1077. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>.
- Bielas, J.H. and Loeb, L.A. (2005) 'Mutator phenotype in cancer: Timing and perspectives', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2–3), pp. 206–213. Available at: <https://doi.org/10.1002/em.20111>.

- Blagosklonny, M.V. (2004) 'Analysis of FDA Approved Anticancer Drugs Reveals the Future of Cancer Therapy', *Cell Cycle*, 3(8), pp. 1033–1040. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.3.8.1023>.
- Bonora, M. *et al.* (2012) 'ATP synthesis and storage', *Purinergic Signalling*, 8(3), pp. 343–357. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.
- Bulavin, D.V. *et al.* (2001) 'Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase', *Nature*, 411(6833), pp. 102–107. Available at: <https://doi.org/10.1038/35075107>.
- Buttmann-Schweiger, N. and Kraywinkel, K. (2019) 'Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland', *Der Onkologe*, 25(2), pp. 92–98. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0507-8>.
- Calcinotto, A. *et al.* (2019) 'Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury', *Physiological Reviews*, 99(2), pp. 1047–1078. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>.
- Cannan, W.J. *et al.* (2014) 'Nucleosomes Suppress the Formation of Double-strand DNA Breaks during Attempted Base Excision Repair of Clustered Oxidative Damages', *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), pp. 19881–19893. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571588>.
- Carcangiu, M. L. *et al.* (2014) *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Available at: <http://site.ebrary.com/id/11252966> (Accessed: 7 June 2022).
- Carling, D. (2004) 'The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control', *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), pp. 18–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005>.
- Carrassa, L. *et al.* (2004) 'Chk1, but not Chk2, is Involved in the Cellular Response to DNA Damaging Agents: Differential Activity in Cells Expressing, or not, p53', *Cell Cycle*, 3(9), pp. 1175–1179. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.3.9.1080>.
- Celeste, A. *et al.* (2002) 'Genomic instability in mice lacking histone H2AX', *Science (New York, N.Y.)*, 296(5569), pp. 922–927. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1069398>.
- Chan, D.C. (2006) 'Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), pp. 79–99. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638>.
- Chan, G.C.-F. and Chan, C.M. (2022) 'Anti-GD2 Directed Immunotherapy for High-Risk and Metastatic Neuroblastoma', *Biomolecules*, 12(3), p. 358. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom12030358>.
- Chen, L. *et al.* (2022) 'PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, p. 871357. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.871357>.
- Christie, E.L. and Bowtell, D.D.L. (2017) 'Acquired chemotherapy resistance in ovarian cancer', *Annals of Oncology*, 28, pp. viii13–viii15. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx446>.
- Collado, M., Blasco, M.A. and Serrano, M. (2007) 'Cellular Senescence in Cancer and Aging', *Cell*, 130(2), pp. 223–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>.
- Coller, H.A., Sang, L. and Roberts, J.M. (2006) 'A New Description of Cellular Quiescence', *PLoS Biology*. Edited by S. Elledge, 4(3), p. e83. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040083>.
- Cooke, S.L. and Brenton, J.D. (2011) 'Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer', *The Lancet. Oncology*, 12(12), pp. 1169–1174. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70123-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70123-1).

- Coppé, J.-P. *et al.* (2010) 'The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression', *Annual Review of Pathology*, 5, pp. 99–118. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
- Correia, A.S., Gärtner, F. and Vale, N. (2021) 'Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer', *Heliyon*, 7(1), p. e05948. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05948>.
- Crona, D.J. *et al.* (2017) 'A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity', *The Oncologist*, 22(5), pp. 609–619. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0319>.
- Dang, L. *et al.* (2009) 'Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate', *Nature*, 462(7274), pp. 739–744. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
- D'Arcy, M.S. (2019) 'Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy', *Cell Biology International*, 43(6), pp. 582–592. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- Demaria, M. *et al.* (2017) 'Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse', *Cancer Discovery*, 7(2), pp. 165–176. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>.
- DGGG (2020) 'Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren'. AWMF. Available at: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (Accessed: 4 May 2022).
- Donzelli, M. and Draetta, G.F. (2003) 'Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation', *EMBO reports*, 4(7), pp. 671–677. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor887>.
- Dreute, J. (2023) *Synergistic Targeting of Ovarian Cancer Cells Through Simultaneous Inhibition of Key Metabolic Enzymes*. Gießen.
- Drzewiecka, M. *et al.* (2022) 'Synthetic Lethality Targeting Polθ', *Genes*, 13(6), p. 1101. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes13061101>.
- El Sayed, R. *et al.* (2021) 'Metabolic Factors Affecting Tumor Immunogenicity: What Is Happening at the Cellular Level?', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), p. 2142. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22042142>.
- Esposito, L.A. *et al.* (1999) 'Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), pp. 4820–4825. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4820>.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008) 'Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response', *Nature Reviews Cancer*, 8(7), pp. 512–522. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2440>.
- Faget, D.V., Ren, Q. and Stewart, S.A. (2019) 'Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer', *Nature Reviews. Cancer*, 19(8), pp. 439–453. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>.
- Fan, D. *et al.* (2023) 'Nanomedicine in cancer therapy', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), p. 293. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>.
- Ferreira-Gonzalez, S. *et al.* (2018) 'Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration', *Nature Communications*, 9(1), p. 1020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03299-5>.
- Frade, J.M. and Ovejero-Benito, M.C. (2015) 'Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances', *Cell Cycle*, 14(5), pp. 712–720. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1004937>.

- Franco, R. *et al.* (2008) 'Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis', *Cancer Letters*, 266(1), pp. 6–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.026>.
- Garcia, D. and Shaw, R.J. (2017) 'AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance', *Molecular Cell*, 66(6), pp. 789–800. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>.
- Gire, V. and Dulić, V. (2015) 'Senescence from G2 arrest, revisited', *Cell Cycle*, 14(3), pp. 297–304. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000134>.
- Graefe, K.H., Lutz, W. and Bönisch, H. (eds) (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*. 2nd edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. b-003-129299. Available at: <https://doi.org/10.1055/b-003-129299>.
- Green, D.R. and Llambi, F. (2015) 'Cell Death Signaling', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), p. a006080. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>.
- Hammoudi, N. *et al.* (2011) 'Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications', *Chinese Journal of Cancer*, 30(8), pp. 508–525. Available at: <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10267>.
- Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57–70. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hande, K.R. (1998) 'Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor', *European Journal of Cancer*, 34(10), pp. 1514–1521. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00228-7).
- He, S. and Sharpless, N.E. (2017) 'Senescence in Health and Disease', *Cell*, 169(6), pp. 1000–1011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>.
- Hellmann, M.D. *et al.* (2019) 'Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer', *New England Journal of Medicine*, 381(21), pp. 2020–2031. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910231>.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J. and Demaria, M. (2018) 'Hallmarks of Cellular Senescence', *Trends in Cell Biology*, 28(6), pp. 436–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
- Herranz, N. and Gil, J. (2018) 'Mechanisms and functions of cellular senescence', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), pp. 1238–1246. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI95148>.
- Hodakoski, C. *et al.* (2019) 'Rac-Mediated Macropinocytosis of Extracellular Protein Promotes Glucose Independence in Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancers*, 11(1), p. 37. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11010037>.
- Holzer, A.K. *et al.* (2004) 'Cisplatin Rapidly Down-regulates Its Own Influx Transporter hCTR1 in Cultured Human Ovarian Carcinoma Cells', *Clinical Cancer Research*, 10(19), pp. 6744–6749. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0748>.
- Iyer, D. and Rhind, N. (2017) 'The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage', *Genes*, 8(2), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes8020074>.
- Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

- Jäger, S. *et al.* (2007) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α ', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), pp. 12017–12022. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>.
- Jandial, D.D. *et al.* (2009) 'Enhanced Delivery of Cisplatin to Intraperitoneal Ovarian Carcinomas Mediated by the Effects of Bortezomib on the Human Copper Transporter 1', *Clinical Cancer Research*, 15(2), pp. 553–560. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2081>.
- Jang, M., Kim, S.S. and Lee, J. (2013) 'Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets', *Experimental & Molecular Medicine*, 45(10), pp. e45–e45. Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.85>.
- Jänicke, R.U. (2009) 'MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3', *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(1), pp. 219–221. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0217-9>.
- Jia, X. *et al.* (2023) 'Impact of statin use on breast cancer recurrence and mortality before and after diagnosis: a systematic review and meta-analysis', *Frontiers in Oncology*, 13, p. 1256747. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1256747>.
- Jin, M.H. and Oh, D.-Y. (2019) 'ATM in DNA repair in cancer', *Pharmacology & Therapeutics*, 203, p. 107391. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.07.002>.
- Judge, A. and Dodd, M.S. (2020) 'Metabolism', *Essays in Biochemistry*, 64(4), pp. 607–647. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>.
- Juriscic, V., Radenkovic, S. and Konjevic, G. (2015) 'The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 867, pp. 115–124. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_8.
- Kang, M.A. *et al.* (2012) 'DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway', *Cell Death & Disease*, 3(1), pp. e249–e249. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.134>.
- Kaplon, J. *et al.* (2013) 'A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence', *Nature*, 498(7452), pp. 109–112. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12154>.
- Kaufmann, M. (2013) *Die Gynäkologie*. 3., vollständig überarbeitete und erw. Aufl. Berlin: Springer.
- Kindelberger, D.W. *et al.* (2007) 'Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship', *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(2), pp. 161–169. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213335.40358.47>.
- Korolchuk, V.I. *et al.* (2017) 'Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link?', *EBioMedicine*, 21, pp. 7–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>.
- Koukourakis, M.I. *et al.* (2009) 'Serum and Tissue LDH Levels in Patients with Breast/Gynaecological Cancer and Benign Diseases', *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 67(3), pp. 162–168. Available at: <https://doi.org/10.1159/000183250>.
- Krebs in Deutschland für 2017/2018* (2021). Robert Koch-Institut. Available at: <https://doi.org/10.25646/8353>.
- Kuilman, T. *et al.* (2010) 'The essence of senescence', *Genes & Development*, 24(22), pp. 2463–2479. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>.
- Kumari, R. and Jat, P. (2021) 'Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 645593. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>.

- Kurz, D.J. *et al.* (2000) 'Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells', *Journal of Cell Science*, 113(20), pp. 3613–3622. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.113.20.3613>.
- Kwong, J. *et al.* (2013) 'Induction of p38 δ Expression Plays an Essential Role in Oncogenic *ras* - Induced Senescence', *Molecular and Cellular Biology*, 33(19), pp. 3780–3794. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00784-13>.
- Labidi-Galy, S.I. *et al.* (2017) 'High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube', *Nature Communications*, 8(1), p. 1093. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00962-1>.
- Lammer, C. *et al.* (1998) 'The cdc25B phosphatase is essential for the G₂/M phase transition in human cells', *Journal of Cell Science*, 111(16), pp. 2445–2453. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.111.16.2445>.
- Lecot, P. *et al.* (2016) 'Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development', *British Journal of Cancer*, 114(11), pp. 1180–1184. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.115>.
- Lee, S. and Schmitt, C.A. (2019) 'The dynamic nature of senescence in cancer', *Nature Cell Biology*, 21(1), pp. 94–101. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>.
- Lemberg, K.M. *et al.* (2022) 'Clinical development of metabolic inhibitors for oncology', *Journal of Clinical Investigation*, 132(1), p. e148550. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI148550>.
- Li, H. *et al.* (2019) 'The landscape of cancer cell line metabolism', *Nature Medicine*, 25(5), pp. 850–860. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0404-8>.
- Li, L. and Zou, L. (2005) 'Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(2), pp. 298–306. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.20355>.
- Li, X. *et al.* (2013) 'Effective inhibition of nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo by targeting glycolysis with oxamate', *International Journal of Oncology*, 43(5), pp. 1710–1718. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2080>.
- Li, Z. and Cui, J. (2023) 'Targeting the lactic acid metabolic pathway for antitumor therapy', *Molecular Therapy - Oncolytics*, 31, p. 100740. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2023.100740>.
- Locasale, J.W. *et al.* (2011) 'Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis', *Nature Genetics*, 43(9), pp. 869–874. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.890>.
- Löffler, G. *et al.* (eds) (2014) *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.
- Lord, C.J. and Ashworth, A. (2017) 'PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic', *Science*, 355(6330), pp. 1152–1158. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aam7344>.
- Lukas, J., Bartkova, J. and Bartek, J. (1996) 'Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G₁ checkpoint', *Molecular and Cellular Biology*, 16(12), pp. 6917–6925. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.6917>.
- Lv, Z. and Guo, Y. (2020) 'Metformin and Its Benefits for Various Diseases', *Frontiers in Endocrinology*, 11, p. 191. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00191>.
- Maddocks, O.D.K. and Vousden, K.H. (2011) 'Metabolic regulation by p53', *Journal of Molecular Medicine*, 89(3), pp. 237–245. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0735-5>.

- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) 'Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm', *Nature Reviews Cancer*, 9(3), pp. 153–166. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2602>.
- Mardis, E.R. *et al.* (2009) 'Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome', *New England Journal of Medicine*, 361(11), pp. 1058–1066. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903840>.
- Marechal, A. and Zou, L. (2013) 'DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), pp. a012716–a012716. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>.
- Matsuoka, S. (1998) 'Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase', *Science*, 282(5395), pp. 1893–1897. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893>.
- Mazzio, E. *et al.* (2021) 'Triple Isozyme Lactic Acid Dehydrogenase Inhibition in Fully Viable MDA-MB-231 Cells Induces Cytostatic Effects That Are Not Reversed by Exogenous Lactic Acid', *Biomolecules*, 11(12), p. 1751. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11121751>.
- McHugh, D. and Gil, J. (2018) 'Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues', *Journal of Cell Biology*, 217(1), pp. 65–77. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>.
- Mesquita, I. and Rodrigues, F. (2018) 'Cellular Metabolism at a Glance', *Experientia Supplementum* (2012), 109, pp. 3–27. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_1.
- Mo, D.-C. *et al.* (2021) 'The efficacy and safety of combination therapy with immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A meta-analysis', *International Immunopharmacology*, 96, p. 107594. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107594>.
- Moiseeva, O. *et al.* (2009) 'Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence', *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), pp. 4495–4507. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.01868-08>.
- Mokhtari, R.B. *et al.* (2017) 'Combination therapy in combating cancer', *Oncotarget*, 8(23), pp. 38022–38043. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>.
- Molina, J.R. *et al.* (2018) 'An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability', *Nature Medicine*, 24(7), pp. 1036–1046. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0052-4>.
- Morgan, R.D. *et al.* (2018) 'PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81(4), pp. 647–658. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3532-9>.
- Mullan, P.B., Quinn, J.E. and Harkin, D.P. (2006) 'The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control', *Oncogene*, 25(43), pp. 5854–5863. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209872>.
- Müller-Esterl, W. (2018) *Biochemie: eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 3., korrigierte Auflage. Berlin, Germany [Heidelberg]: Springer Spektrum (Lehrbuch). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54851-6>.
- Munn, D.H. and Mellor, A.L. (2013) 'Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses', *Trends in Immunology*, 34(3), pp. 137–143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.
- Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: from physiology to pathology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), pp. 482–496. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.

- Nahta, R., Hung, M.-C. and Esteva, F.J. (2004) 'The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells', *Cancer Research*, 64(7), pp. 2343–2346. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3856>.
- Ness, R.B. and Cottreau, C. (1999) 'Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer', *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(17), pp. 1459–1467. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.17.1459>.
- Nirmala, J.G. and Lopus, M. (2020) 'Cell death mechanisms in eukaryotes', *Cell Biology and Toxicology*, 36(2), pp. 145–164. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>.
- Nishio, K. *et al.* (2001) 'Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts', *Histochemistry and Cell Biology*, 116(4), pp. 321–327. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004180100325>.
- Nurse, P. (2000) 'A long twentieth century of the cell cycle and beyond', *Cell*, 100(1), pp. 71–78. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81684-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81684-0).
- Obirst, F. *et al.* (2018) 'Metabolic vulnerability of cisplatin-resistant cancers', *The EMBO Journal*, 37(14), p. e98597. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201798597>.
- Ock, C.-Y. (2012) '8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases', *World Journal of Gastroenterology*, 18(4), p. 302. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i4.302>.
- O'Neil, N.J., Bailey, M.L. and Hieter, P. (2017) 'Synthetic lethality and cancer', *Nature Reviews Genetics*, 18(10), pp. 613–623. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>.
- Ortega, J.A. *et al.* (1977) 'L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia', *Cancer Research*, 37(2), pp. 535–540.
- Ortiz, M. *et al.* (2022) 'Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer', *Cancer Drug Resistance* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.147>.
- Panduri, V. *et al.* (2004) 'Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(6), pp. L1220–L1227. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00371.2003>.
- Passos, J.F. *et al.* (2007) 'Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence', *PLoS Biology*. Edited by T. De Lange, 5(5), p. e110. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050110>.
- Passos, J.F. *et al.* (2010) 'Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence', *Molecular Systems Biology*, 6(1), p. 347. Available at: <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>.
- Paulovich, A.G. and Hartwell, L.H. (1995) 'A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in Response to DNA damage', *Cell*, 82(5), pp. 841–847. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90481-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90481-6).
- Petrova, N.V. *et al.* (2016) 'Small molecule compounds that induce cellular senescence', *Aging Cell*, 15(6), pp. 999–1017. Available at: <https://doi.org/10.1111/acer.12518>.
- Platten, M. *et al.* (2019) 'Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond', *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(5), pp. 379–401. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>.
- Ponka, P. and Lok, C.N. (1999) 'The transferrin receptor: role in health and disease', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), pp. 1111–1137. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00070-9).

- Possemato, R. *et al.* (2011) 'Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer', *Nature*, 476(7360), pp. 346–350. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10350>.
- Qin, S.-Y. *et al.* (2018) 'Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy', *Biomaterials*, 171, pp. 178–197. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.027>.
- Ren, L. *et al.* (2020) 'Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 580070. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580070>.
- Romero-Garcia, S. *et al.* (2011) 'Tumor cell metabolism: An integral view', *Cancer Biology & Therapy*, 12(11), pp. 939–948. Available at: <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>.
- Rundle, S. *et al.* (2017) 'Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy', *Cancers*, 9(5), p. E41. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers9050041>.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. and Vousden, K.H. (2001) 'Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein', *Current Opinion in Cell Biology*, 13(3), pp. 332–337. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00216-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00216-7).
- Samaraweera, L. *et al.* (2017) 'A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC', *Scientific Reports*, 7(1), p. 1900. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01964-1>.
- Sanchez, Y. *et al.* (1997) 'Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25', *Science*, 277(5331), pp. 1497–1501. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1497>.
- Schafer, M.J. *et al.* (2017) 'Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease', *Nature Communications*, 8(1), p. 14532. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>.
- Scheuer, W. *et al.* (2009) 'Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models', *Cancer Research*, 69(24), pp. 9330–9336. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4597>.
- Schmitt, C.A., Wang, B. and Demaria, M. (2022) 'Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(10), pp. 619–636. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>.
- Schröfelbauer, B. *et al.* (2023) 'Discovery of antibodies and cognate surface targets for ovarian cancer by surface profiling', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(1), p. e2206751120. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2206751120>.
- Schumacher, B. *et al.* (2021) 'The central role of DNA damage in the ageing process', *Nature*, 592(7856), pp. 695–703. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03307-7>.
- Schwenck, J. *et al.* (2023) 'Advances in PET imaging of cancer', *Nature Reviews Cancer*, 23(7), pp. 474–490. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00576-4>.
- Sharma, D., Singh, M. and Rani, R. (2022) 'Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics', *Seminars in Cancer Biology*, 87, pp. 184–195. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.11.007>.
- Shiloh, Y. (2003) 'ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity', *Nature Reviews Cancer*, 3(3), pp. 155–168. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc1011>.
- Shiloh, Y. (2006) 'The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape', *Trends in Biochemical Sciences*, 31(7), pp. 402–410. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.004>.

- Shiratori, R. *et al.* (2019) 'Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner', *Scientific Reports*, 9(1), p. 18699. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55296-3>.
- Skinner, K.T., Palkar, A.M. and Hong, A.L. (2023) 'Genetics of ABCB1 in Cancer', *Cancers*, 15(17), p. 4236. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15174236>.
- Slade, D. (2020) 'PARP and PARG inhibitors in cancer treatment', *Genes & Development*, 34(5–6), pp. 360–394. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>.
- Sochaj, A.M., Świdarska, K.W. and Otlewski, J. (2015) 'Current methods for the synthesis of homogeneous antibody–drug conjugates', *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 775–784. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.001>.
- Sonpavde, G. *et al.* (2020) 'ENERGIZE: a Phase III study of neoadjuvant chemotherapy alone or with nivolumab with/without linrodostat mesylate for muscle-invasive bladder cancer', *Future Oncology*, 16(2), pp. 4359–4368. Available at: <https://doi.org/10.2217/fo-2019-0611>.
- Srinivas, U.S. *et al.* (2019) 'ROS and the DNA damage response in cancer', *Redox Biology*, 25, p. 101084. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>.
- Takeshima, H. and Ushijima, T. (2019) 'Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk', *npj Precision Oncology*, 3(1), p. 7. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0>.
- Tang, K. *et al.* (2021) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy', *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), p. 68. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01080-8>.
- Théate, I. *et al.* (2015) 'Extensive Profiling of the Expression of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Protein in Normal and Tumoral Human Tissues', *Cancer Immunology Research*, 3(2), pp. 161–172. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0137>.
- Toyama, E.Q. *et al.* (2016) 'AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress', *Science*, 351(6270), pp. 275–281. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aab4138>.
- Trabert, B. *et al.* (2020) 'The Risk of Ovarian Cancer Increases with an Increase in the Lifetime Number of Ovulatory Cycles: An Analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium (OC3)', *Cancer Research*, 80(5), pp. 1210–1218. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2850>.
- Vareki, S.M. *et al.* (2014) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates immune-independent human tumor cell resistance to olaparib, gamma radiation, and cisplatin', *Oncotarget*, 5(9), pp. 2778–2791. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1916>.
- Veneroni, S. *et al.* (1994) 'Expression of P-glycoprotein and in vitro or in vivo resistance to doxorubicin and cisplatin in breast and ovarian cancers', *European Journal of Cancer*, 30(7), pp. 1002–1007. Available at: [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)90132-5).
- Venkatesan, S. *et al.* (2017) 'Treatment-Induced Mutagenesis and Selective Pressures Sculpt Cancer Evolution', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(8), p. a026617. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026617>.
- Verma, S. *et al.* (2012) 'Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 367(19), pp. 1783–1791. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209124>.
- Volarevic, V. *et al.* (2019) 'Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity', *Journal of Biomedical Science*, 26(1), p. 25. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0518-9>.

- Wang, L., Lankhorst, L. and Bernards, R. (2022) 'Exploiting senescence for the treatment of cancer', *Nature Reviews Cancer*, 22(6), pp. 340–355. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9>.
- Wang, S. et al. (2023) 'Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), p. 2643. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24032643>.
- Wang, Z. et al. (2019) 'DNA polymerase θ (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse', *Journal of Biological Chemistry*, 294(11), pp. 3909–3919. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005188>.
- Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E. (1927) 'The Metabolism Of Tumors In The Body', *Journal of General Physiology*, 8(6), pp. 519–530. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
- Wiley, C.D. and Campisi, J. (2021) 'The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention', *Nature Metabolism*, 3(10), pp. 1290–1301. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00483-8>.
- Xu, W. et al. (2011) 'Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases', *Cancer Cell*, 19(1), pp. 17–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014>.
- Xu, Y. et al. (2014) 'Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence', *Trends in Biochemical Sciences*, 39(6), pp. 268–276. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.04.004>.
- Yan, H. et al. (2009) 'IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas', *New England Journal of Medicine*, 360(8), pp. 765–773. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>.
- Ying, H. et al. (2012) 'Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism', *Cell*, 149(3), pp. 656–670. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.
- Yokoo, K. et al. (2009) 'Enhanced renal accumulation of cisplatin via renal organic cation transporter deteriorates acute kidney injury in hypomagnesemic rats', *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(6), pp. 578–584. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10157-009-0215-1>.
- Zhang, C. et al. (2020) 'Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy', *Journal of Molecular Cell Biology*. Edited by H. Lu, 12(9), pp. 674–687. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa040>.
- Zhang, L. et al. (2023) 'Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics', *The FEBS Journal*, 290(5), pp. 1362–1383. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.16350>.
- Zhao, H. and Piwnicka-Worms, H. (2001) 'ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1', *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), pp. 4129–4139. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001>.
- Zhao, Y. et al. (2017) 'ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway', *Molecular Cancer*, 16(1), p. 79. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0648-1>.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Lienhard Schmitz danken. Vielen Dank dafür, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast Teil deiner Arbeitsgruppe zu sein, vielen Dank für die Vergabe dieses großartigen und spannenden Themas und vor allem vielen Dank für die außerordentliche Betreuung, die motivierenden Gespräche und deine quasi allzeit offene Bürotür!

Als nächstes möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Jan Dreute bedanken. Vielen Dank, dass ich Teil deines Projektes und deiner Arbeit sein durfte, vielen Dank für dein Vertrauen in mich und deine unendliche Geduld bei immer wiederkehrenden Fragen aber vor allem vielen Dank für deine großartige Betreuung und für all die Zeit, die du dir immer wieder genommen hast. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können!

Dann möchte ich mich natürlich noch bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen im Labor bedanken. Danke Susanne Bacher, Vera Saul, Shashi Chillappagari, Ratnal Belapurkar, Lu Liu, Sehar Qudsia, Markus Schwinn, Yvonne Horn, Regina Jilg und Ines Höfliger für euer immer offenes Ohr, für eure Hilfsbereitschaft und für eure kontinuierliche Unterstützung. Ein besonderer Dank geht hier an meinen Mitdoktoranden Roman Robert, ohne dich wäre ich gar nicht erst in der Arbeitsgruppe gelandet und ich freue mich nach wie vor sehr, dass ich dich damals zufällig vor einer Klausur getroffen habe. Vielen Dank dafür!

Mein unendlicher Dank gilt all meinen Eltern und meiner Schwester, ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Ihr habt mir dieses Studium und diese Arbeit ermöglicht und dafür kann ich euch gar nicht genug danken! Vielen Dank, dass ihr immer an mich glaubt, immer für mich da seid und mir immer ein Zuhause gebt. Meine Dankbarkeit für euch passt gar nicht auf dieses Papier.

Dann möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Freunden bedanken, vor allem bei Rita Görzen. Vielen Dank dafür, dass ich so manchen Frust bei dir abladen durfte und vor allem Danke dafür, dass du es immer wieder aufs Neue schaffst, motivierende Worte für mich zu finden.

Mein größter Dank gilt dir Max, ohne deine stetige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht die geworden, die sie heute ist. Danke, dass du immer an meiner Seite und immer für mich da bist. Durch dich habe ich im Labor viel mehr als Daten gewonnen!