

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTHSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)**

Direktor: Prof. Dr. Olaf Ortmann

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Funktion von Estrogen-Related Receptor γ in
Ovarialkarzinomzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Luisa Derleth

2021

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)**

Direktor: Prof. Dr. Olaf Ortmann

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Funktion von Estrogen-Related Receptor γ in
Ovarialkarzinomzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Luisa Derleth

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

- 1. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck
- 2. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung.....	7
1.1 Das Ovarialkarzinom	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Ätiopathogenese	8
1.1.2.1 „Incessant Ovulation“-Hypothese.....	8
1.1.2.2 Gonadotropin-Hypothese.....	8
1.1.2.3 Tuba-uterina-Hypothese	8
1.1.3 Risikofaktoren	10
1.1.3.1 Genetische Prädisposition.....	10
1.1.3.2 Reproduktive und endokrine Risikofaktoren.....	11
1.1.3.3 Weitere Faktoren.....	12
1.1.4 Klassifikation	13
1.1.4.1 Histopathologie	13
1.1.4.2 Typ I und Typ II Tumore	14
1.1.5 Diagnostik	15
1.1.5.1 Screening.....	15
1.1.5.2 Symptomatik und klinisches Vorgehen	15
1.1.5.3 Stadieneinteilung.....	15
1.1.6 Therapie.....	16
1.1.6.1 Operative Therapie.....	16
1.1.6.2 Chemotherapie	17
1.1.6.3 Zielgerichtete Therapie	17
1.1.7 Tumormarker.....	18
1.2 Estrogen-Related Receptor γ	19
1.2.1 Einordnung in die Superfamilie der nukleären Rezeptoren	19
1.2.2 Strukturelle Eigenschaften von ERR γ	20
1.2.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität von ERR γ	22
1.2.3.1 Interaktion mit Koregulatoren.....	22
1.2.3.2 Synthetische Modulatoren	22
1.2.4 Zielgene und Funktionen der ERR	23
1.2.4.1 Interaktion mit ER und Östrogensignalwegen	23

1.2.4.2	Regulation des Stoffwechsels und Energiemetabolismus.....	24
1.2.5	Die Rolle von ERR γ in der Karzinogenese	27
1.2.5.1	Klinische Korrelation von ERR α und ERR γ mit Tumorprognose	27
1.2.5.2	Vermittlung der Effekte von ERR α und ERR γ auf Krebszellen	30
2	Zielsetzung der Arbeit	33
3	Material.....	34
4	Theoretische Grundlagen und Methoden.....	39
4.1	Zellkultivierung und -präparation.....	39
4.1.1	Zellkultur	39
4.1.2	Transfektion mit spezifischer siRNA	40
4.1.2.1	Theoretische Grundlagen der Transfektion	40
4.1.2.2	SiRNA-Design	42
4.1.2.3	Durchführung der Transfektion	43
4.2	Molekularbiologische Methoden	45
4.2.1	RNA-Isolierung	45
4.2.1.1	Theoretische Grundlagen der RNA-Isolierung	45
4.2.1.2	Durchführung der RNA-Isolierung	45
4.2.1.3	Quantitative und qualitative Analyse der isolierten RNA	47
4.2.2	Reverse Transkription	47
4.2.2.1	Theoretische Grundlagen der reversen Transkription.....	47
4.2.2.2	Durchführung der reversen Transkription	48
4.2.3	Real-time quantitative PCR (qPCR)	48
4.2.3.1	Theoretische Grundlagen der qPCR	48
4.2.3.2	$\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen	50
4.2.3.3	Schmelzkurvenanalyse.....	51
4.2.3.4	Durchführung der qPCR	52
4.3	Viabilitätsassay (CellTiter-Blue®)	55
4.3.1	Theoretische Grundlagen des Viabilitätsassays	55
4.3.2	Durchführung des Viabilitätsassays	55
4.4	Statistik	57
4.5	Überblick über den Versuchsaufbau	57
5	Ergebnisse	60
5.1	Vorversuche	60

5.1.1	Etablierung des ESRRG-Knockdowns.....	60
5.1.2	Wachstum untransfizierter OVCAR-3-Zellen	61
5.2	Einfluss von ERRγ auf das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen.....	63
5.3	Einfluss von ERRγ auf die Genexpression in Ovarialkarzinomzellen	71
5.3.1	Einfluss von ERR γ auf Proliferationsgene	72
5.3.2	Einfluss von ERR γ auf Gene des programmierten Zelltods	75
5.3.3	Einfluss von ERR γ auf epitheliale und mesenchymale Gene	77
6	Diskussion	80
6.1	Einfluss von ERRγ auf das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen.....	80
6.2	Einfluss von ERRγ auf die Genexpression in Ovarialkarzinomzellen	82
6.2.1	Einfluss von ERR γ auf Proliferationsgene	82
6.2.1.1	Einordnung der untersuchten Gene in den Zellzyklus.....	83
6.2.1.2	Cyclin D1	85
6.2.1.3	Cyclin E2	86
6.2.1.4	CDK2	87
6.2.1.5	P21 ^{CIP1/WAF1}	87
6.2.1.6	Cyclin A2	88
6.2.1.7	Ki-67	89
6.2.1.8	Zusammenfassung: ERR γ im Zellzyklus	89
6.2.2	Einfluss von ERR γ auf Gene des programmierten Zelltods	90
6.2.2.1	Einordnung der untersuchten Gene in den programmierten Zelltod	90
6.2.2.2	Bcl-2, Bax und Bak	93
6.2.2.3	XIAP	94
6.2.2.4	AIFM1.....	94
6.2.2.5	Caspase-1	95
6.2.2.6	Zusammenfassung: ERR γ im programmierten Zelltod	96
6.2.3	Einfluss von ERR γ auf epitheliale und mesenchymale Gene	97
6.2.3.1	Einordnung der untersuchten Gene in den Prozess der EMT	97
6.2.3.2	E-Cadherin und N-Cadherin	99
6.2.3.3	Sciellin	100
6.2.3.4	Mucin-1	101
6.2.3.5	Zusammenfassung: ERR γ in der EMT	102
6.3	Klinische Relevanz und Ausblick.....	103

7	Zusammenfassung.....	105
8	Anhang	107
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	107
8.2	Tabellenverzeichnis	110
8.3	Abbildungsverzeichnis	110
9	Literaturverzeichnis.....	112

1 EINLEITUNG

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die folgenden epidemiologischen Angaben wurden der aktuellen Ausgabe des Berichts „Krebs in Deutschland“ entnommen, die auf Daten der bevölkerungsbezogenen Krebsregister in Deutschland bis zum Jahr 2016 beruht (1).

Pro Jahr erkranken etwa 7000 Frauen in Deutschland an Eierstockkrebs (ICD-10-GM C56, DIMDI 2018). Mit einem prozentualen Anteil von 3,1 % ist das Ovarialkarzinom nach Mamma-, Kolon-, Bronchial-, Endometriumkarzinom, malignem Melanom der Haut, Pankreaskarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom die achthäufigste Krebsneuerkrankung der Frau. Gleichzeitig steht es in der Statistik der krebsassoziierten Sterbefälle bei Frauen mit 5,2 % bzw. 6,9 pro 100.000 Frauen an fünfter Stelle. Damit besitzt das Ovarialkarzinom die höchste Mortalitätsrate aller gynäkologischen Malignome. Das Lebenszeitrisiko einer Frau, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt in Deutschland derzeit bei 1,3 %. Eine von 75 Frauen erhält also im Laufe ihres Lebens die Diagnose Eierstockkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 68 Jahre, wobei die Inzidenz bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich zunimmt. Obwohl die relative 5-Jahres-Überlebensrate im frühen Tumorstadium (TNM-Stadium I nach UICC) bei 89 % liegt, misst sie gemittelt über alle Stadien nur 41 % (siehe Abbildung 1a). Grund dafür ist das Fehlen valider Screening-Methoden und spezifischer Symptome, sodass das Ovarialkarzinom in ca. ¾ der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (TNM-Stadium III/IV nach UICC) mit deutlich schlechterer Prognose diagnostiziert wird (siehe Abbildung 1b).

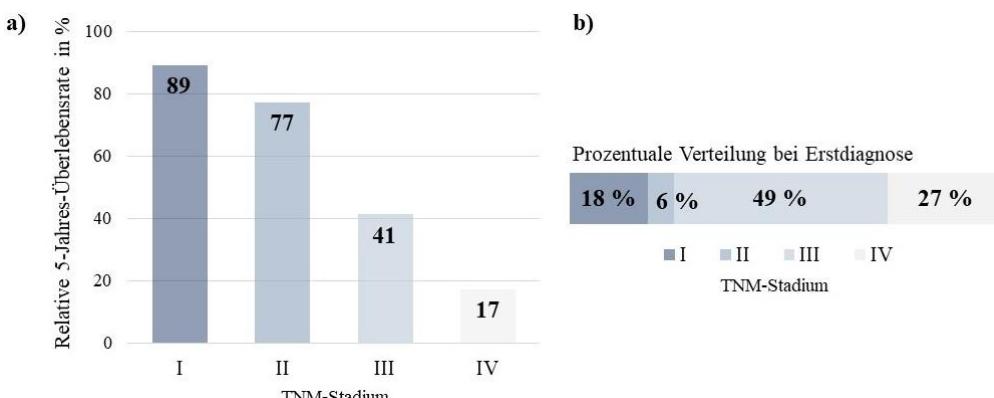


Abbildung 1: Überleben und Häufigkeit des Ovarialkarzinoms nach TNM-Stadium, modifiziert nach (1)

a) Relative 5-Jahres-Überlebensrate in % nach TNM-Tumorstadium

b) Prozentuale Verteilung der TNM-Stadien bei Erstdiagnose

1.1.2 Ätiopathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese des Ovarialkarzinoms sind bisher nicht abschließend geklärt. Es gibt zahlreiche Theorien über die an der Entstehung des Ovarialkarzinoms beteiligten Mechanismen. Im Folgenden werden die wichtigsten Hypothesen genauer erläutert.

1.1.2.1 „Incessant Ovulation“-Hypothese

Fathalla stellte 1971 die sogenannte „Incessant Ovulation“-Hypothese auf (2). Es wurde postuliert, dass eine hohe Anzahl an Ovulationszyklen ursächlich für das Entstehen des Ovarialkarzinoms sei. Wiederholte Traumata des ovariellen Oberflächenepithels durch die Follikelruptur beim Eisprung setzen demnach proliferative Reparaturvorgänge zum Schließen der Wundfläche in Gang, die zur Akkumulation von Mutationen, maligner Transformation und Neoplasie führen können. Laut Fathalla korreliert die Anzahl der insgesamt stattgefundenen Ovulationen im Leben einer Frau also mit deren Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Diese Vermutung wird epidemiologisch unter anderem dadurch gestützt, dass Nulliparität das Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms erhöht, während Multiparität, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva und Stillen protektiv wirken (siehe dazu Kapitel 1.1.3.2).

1.1.2.2 Gonadotropin-Hypothese

Die „Gonadotropin-Hypothese“ von Cramer und Welch aus dem Jahr 1982 besagt, dass die exzessive Ausschüttung von Gonadotropinen (FSH, LH) Ovarialkarzinome verursachen kann (3). Nach dieser These werden vorbestehende Inklusionszysten (Einstülpung von Oberflächenepithel ins ovarielle Stroma, entstanden durch Ovulationsprozesse) durch die gesteigerte Freisetzung von Gonadotropinen bzw. durch konsekutiv lokal entstehende Östrogene stimuliert. Dadurch werden epitheliale Differenzierung, Proliferation und maligne Zelltransformation im Ovar begünstigt. Auch dieses Modell ist konsistent mit den bekannten protektiven Effekten von Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva und Stillen (siehe dazu Kapitel 1.1.3.2).

1.1.2.3 Tuba-uterina-Hypothese

Während die bereits beschriebenen Theorien davon ausgingen, dass das ovarielle Tumorgeschehen seinen Ursprung im Oberflächenepithel des Ovars hat, machten Crum et al. 2007 darauf aufmerksam, dass der Entstehungsort des (serösen) Ovarialkarzinoms vielmehr der Fimbrientrichter der Tuba uterina zu sein scheint (4). Reaktive Sauerstoffspezies der Follikelflüssigkeit und Veränderungen des Mikromilieus während der Ruptur des ovariellen Oberflächenepithels beim Eisprung führen laut dieser Theorie zu Schädigung und maligner Trans-

formation des Tubenepithels. Anschließend erfolge eine Streuung und Invasion dieser malignen Zellen in das Ovar. Erste Hinweise auf die Beteiligung des Eileiters an der Genese des Ovarialkarzinoms ergaben sich durch systematische Analysen (SEE-FIM-Protokoll: Sectioning and Extensively Examining the Fimbriated End) des Explantats nach prophylaktischen Salpingo-Oophorektomien bei für die Entwicklung von Eierstockkrebs prädisponierten Frauen (BRCA-Mutation und/oder positive Familienanamnese). Dabei wurden hyper- und dysplastische Veränderungen im Tubenepithel (vor allem am Fimbrienende) der erblich vorbelasteten Frauen entdeckt (5). Doch nicht nur bei Hochrisikopatientinnen, sondern auch bei 60 % der sporadischen Fälle des serösen Ovarialkarzinoms konnte eine solche nicht-invasive Läsion im Epithel des Eileiters nachgewiesen werden (6). Diese wird als STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma) bezeichnet (7) und besitzt ähnliche zytologische Eigenschaften wie das high-grade seröse Ovarialkarzinom: hohe Proliferationsindices, ausgeprägte genomische Instabilität und Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 (8) (9). Da diese Vorläuferzellen und disseminierte Karzinomzellen identische p53-Mutationen aufweisen, wird von einer klonalen Beziehung ausgegangen (6) (10). Der Vergleich der Telomer-Längen der STIC und dazugehöriger Ovarialtumore deutet darauf hin, dass das STIC tatsächlich die vorangehende Läsion ist und bereits vor dem Ovarialtumor entsteht (11).

Weitere Entstehungstheorien schreiben lokalen Entzündungsprozessen (12) oder Androgenen und Progesteron (13) eine Rolle in der Ätiopathogenese des Ovarialkarzinoms zu. Jede der hier beschriebenen Thesen kann durch epidemiologische Studien unterstützt werden. Trotzdem kann keine Theorie alleine die vorhandenen epidemiologischen Daten zu Risiko- und protektiven Faktoren und die Ätiopathogenese aller Ovarialkarzinome vollständig erklären. Die ovarielle Tumorgenese scheint stattdessen ein multifaktorieller Prozess zu sein, ein komplexes Zusammenspiel von biologischen Vorgängen bei der Ovulation, lokaler Inflammation und hormoneller Effekte von Progesteron, Androgenen und Östrogen während des Menstruationszyklus.

1.1.3 Risikofaktoren

Obwohl die genauen Gründe für das Auftreten des Ovarialkarzinoms weiterhin ungeklärt sind, konnte aufgrund intensiver Forschungsbemühungen in den vergangenen Jahrzehnten eine Reihe von Faktoren herausgearbeitet werden, die das Erkrankungsrisiko beeinflussen. Einige dieser Risiko- oder protektiven Faktoren variieren je nach histologischem Subtyp (14). Die meisten epidemiologischen Studien beziehen sich allerdings auf das am häufigsten vorkommende seröse Ovarialkarzinom. Die wichtigsten Faktoren in der Genese des Ovarialkarzinoms sind in folgender Tabelle zusammengefasst und werden im Folgenden genauer betrachtet:

	HR/RR/OR	Lebenszeitrisiko
Durchschnittsbevölkerung (1)	1,0	1,3 %
BRCA1 bzw. BRCA2-Mutation (15)		39 % bzw. 11 %
HNPPC-Syndrom (16)		12 %
Parität (17)	HR 0,71; - 0,08 pro weitere Schwangerschaft	
Stillen (18)	OR 0,7	
Polyzystisches Ovarialsyndrom (19)	OR 2,5	
Einnahme oraler Kontrazeptiva (5 Jahre lang) (20)	RR 0,71	
Menopausale Hormontherapie (21)	RR 1,2	
Tubenligatur (22)	RR 0,69	
Hysterektomie (23)	HR 0,8	

Tabelle 1: Risiko- und protektive Faktoren des Ovarialkarzinoms

1.1.3.1 Genetische Prädisposition

Einer der wichtigsten bekannten Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom ist die Familienanamnese. Während der Großteil der Ovarialkarzinome sporadisch auftritt, ist die Erkrankung bei ca. 10 % der Patientinnen auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen, meist charakterisiert durch familiäre Häufung der Erkrankung und Tumormanifestation im früheren Lebensalter im Vergleich zur Normalbevölkerung (24) (25) (26). Dabei spielt mit einem Anteil von 90 % in erster Linie das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom eine Rolle, das vor allem mit Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 einhergeht (24) (25). Eine umfangreiche Metaanalyse ergab für BRCA1- bzw. BRCA2-Mutationsträgerinnen ein durchschnittliches kumulatives Risiko von 39 % bzw. 11 %, bis zum

70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (15). Eine prophylaktische Salpingo-Oophorektomie kann das Risiko gesunder Mutationsträgerinnen, an einem Ovarial- oder Tubenkarzinom zu erkranken, um ca. 80 % reduzieren (27) (28) (29) (30) und wird daher nach abgeschlossener Familienplanung empfohlen (31). Die übrigen 10 % der hereditären Ovarialkarzinom-Fälle sind hauptsächlich auf das familiäre nicht-polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) zurückzuführen (24) (25) (26). Das Lebenszeitrisiko für HNPCC-Patientinnen, an Eierstockkrebs zu erkranken, beträgt 12 % (16).

1.1.3.2 Reproduktive und endokrine Risikofaktoren

Parität und Laktation

Während für kinderlose Frauen ein erhöhtes Risiko besteht, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, stellen Schwangerschaft und Geburt einen protektiven Faktor dar (32) (33) (34). In der „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“-Studie 2011 konnte ein um 29 % erniedrigtes Risiko (HR 0,71, 95 %-KI 0,59 - 0,87) für eine Erkrankung am Ovarialkarzinom bei Uniparae im Vergleich zu Nulliparae festgestellt werden (17). Mit jeder weiteren ausgetragenen Schwangerschaft sinkt das Risiko um zusätzliche 8 % (17). Außerdem scheint Stillen ebenfalls einen protektiven Einfluss auf das Ovarialkarzinomrisiko zu haben (32) (34) (35) (36). In einer Metaanalyse von Chowdhury et al. aus dem Jahr 2015 konnte eine signifikante Abnahme des Risikos für Frauen, die gestillt haben, im Vergleich zu denen, die nie gestillt haben, festgestellt werden (OR 0,70, 95 %-KI 0,64 - 0,77) (18). Das Ausmaß der Risikoreduktion nimmt mit der Stilldauer zu (18) (37).

Infertilität

Es stellt sich nun die Frage, ob Nulliparität nur aufgrund des Fehlens von protektiven Effekten des Austragens einer Schwangerschaft das Ovarialkarzinomrisiko steigert oder auch aufgrund von Pathologien, die mit Infertilität assoziiert sind. Die Datenlage zu diesen Zusammenhängen ist nicht eindeutig (38). Um das Ausmaß der Risikosteigerung durch Infertilität bestimmen zu können, ist es von großer Bedeutung, die heterogenen Ursachen von Infertilität zu berücksichtigen (39). Brinton et al. konnten in einer retrospektiven Kohortenstudie zeigen, dass Frauen mit diagnostizierter Endometriose oder primärer Infertilität ein höheres Risiko haben, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, als Frauen mit sekundärer Infertilität und ohne Endometriose (RR 2,72, 95 %-KI 1,1 - 6,7) (39). Außerdem besteht für Frauen mit polyzystischem Ovarialsyndrom ein ca. 2,5-faches Risiko für ein Ovarialkarzinom (OR 2,52, 95 %-KI 1,08 - 5,89) (19).

Orale Kontrazeption

Viele epidemiologische Studien berichten über eine Abnahme des Ovarialkarzinom-Risikos für Frauen, die jemals orale Kontrazeptiva einnahmen, im Vergleich zu Frauen, die dies nie taten (40). Die protektive Wirkung der „Pille“ steigt mit der Einnahmedauer und hält für mehr als 30 Jahre nach Beendigung der Einnahme an, verringert sich jedoch über die Zeit (32) (17) (41) (42) (43) (44). Laut einer Metaanalyse der “Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer” reduziert sich das Risiko, an Eierstockkrebs zu erkranken, bei fünfjähriger Anwendung oraler Kontrazeptiva um 29 % für ein Zeitintervall von 10 Jahren nach Absetzen des Präparats (20).

Menopausale Hormontherapie

Große Metaanalysen von Beobachtungsstudien zeigen ein erhöhtes Ovarialkarzinomrisiko für Frauen, die peri- oder postmenopausal Östrogene einnehmen (45) (46). Die „Million Women Study“ aus dem Jahr 2007 beschreibt ein relatives Risiko von 1,20 (95 %-KI: 1,02 - 1,32) für Frauen, die eine Hormonersatztherapie durchführen (21). Einige Studien weisen ein höheres Risiko bei der Einnahme von reinen Östrogen-Präparaten im Vergleich zu Östrogen-Gestagen-Kombinationen nach (47) (48) (49).

1.1.3.3 Weitere Faktoren

Sowohl Tubenligatur als auch Hysterektomie gelten als protektive Faktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (22) (23) (32) (50) (51) (52). Die Unterbindung der Eileiter kann das Risiko für ein seröses Ovarialkarzinom laut einer Metaanalyse aus dem Jahr 2011 um 34 % (RR 0,66, 95 %-KI: 0,60 - 0,73) senken (22). Auch eine Hysterektomie verringert das Risiko einer Frau, an Eierstockkrebs zu erkranken (HR 0,8, 95 %-KI: 0,66 - 0,97) (23). Außerdem wurden die Kontamination mit Asbest (53), Infektionen des weiblichen Genitaltrakts wie Zervizitis, Endometritis und Adnexitis (54) (55) sowie Adipositas (BMI > 30) (56) als Risikofaktoren für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms identifiziert.

1.1.4 Klassifikation

1.1.4.1 Histopathologie

Ovarialtumore umfassen eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen. Neben selteneren nicht-epithelialen Tumoren wie z. B. mesenchymalen Tumoren, Keimzelltumoren oder Keimstrang-Stroma-Tumoren stellt das Ovarialkarzinom mit einem Anteil von 90 % der malignen ovariellen Tumore die größte Gruppe dar (57). Die WHO teilt das Ovarialkarzinom wiederum in verschiedene histopathologische Subtypen ein (siehe Abbildung 2) (58): Mit einer Häufigkeit von ca. 70 % ist das high-grade seröse Karzinom (High-Grade Serous Carcinoma bzw. HGSC) der häufigste Subtyp, gefolgt vom endometroiden Karzinom und vom Klarzellkarzinom mit je ca. 10-prozentiger Häufigkeit. Das low-grade seröse Karzinom (Low-Grade Serous Carcinoma bzw. LGSC) folgt mit ca. 5-, das muzinöse Karzinom mit ca. 3-prozentiger Häufigkeit (59). Innerhalb jeder dieser Subtypen gibt es Tumore unklarer Dignität, die als Borderline Tumore bezeichnet werden (58). Diese Tumore weisen Zellcharakteristika der Malignität auf, aber keine Invasion in das umliegende Stroma (58). All diese Ovarialkarzinomtypen unterscheiden sich sowohl auf histologischer und molekularer Ebene als auch anhand ihrer Pathogenese, ihrer Biomarker, ihrer Prognose und in ihrem Ansprechen auf Behandlung (31).

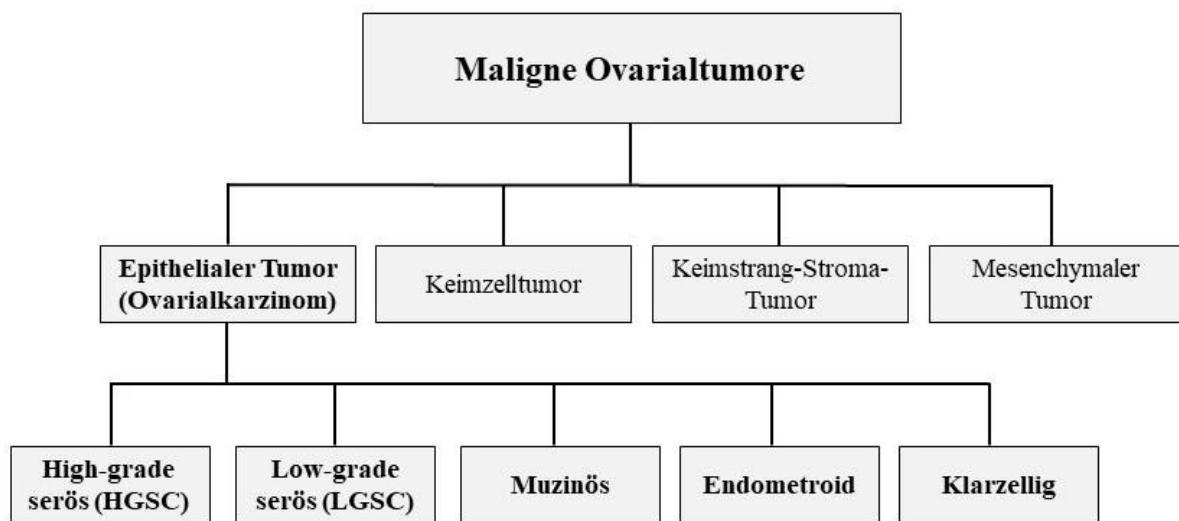


Abbildung 2: Die wichtigsten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms, modifiziert nach (58)

1.1.4.2 Typ I und Typ II Tumore

Neben der histopathologischen Klassifikation können die Ovarialkarzinome auch anhand ihrer Tumorgenese und molekulargenetischen Eigenschaften innerhalb eines dualistischen Modells nach Shih und Kurmann einer von zwei Gruppen zugeordnet werden (60) (61) (62). Das low-grade und das high-grade seröse Karzinom dienen dabei als Prototyp für Typ I bzw. Typ II Tumore. Dieses Konzept wird im Folgenden vorgestellt (60) (61) (62):

- 1) Als **Typ I Tumore** werden nach Shih und Kurmann low-grade seröse Tumore (LGSC), endometrioide, muzinöse und klarzellige Karzinome zusammengefasst. Diese Gruppe macht 25 % der Ovarialkarzinome aus. Die Typ I Tumore entwickeln sich schrittweise aus benignen Vorstufen (Inklusionszysten, Endometriose, Zystadenome) über nicht-invasive Borderline-Tumore zu gut differenzierten Karzinomen mit einem niedrigen histologischen Grading (G1). Sie können oft bereits im frühen Stadium diagnostiziert werden. Subtypspezifisch treten unterschiedliche Alterationen auf, wie z. B. Mutationen in den Protoonkogenen BRAF und KRAS bei LGSC. BRCA1-, BRCA2- oder p53-Mutationen sind bei Typ I Tumoren sehr selten.
- 2) Die häufiger vorkommenden **Typ II Tumore** (75 % der Ovarialkarzinome) beinhalten nach dem Modell von Shih und Kurmann high-grade seröse Tumore (HGSC), undifferenzierte Karzinome und Karzinosarkome. Sie wachsen schnell und aggressiv und werden meist erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, wenn bereits die Tuben, das Mesenterium oder das Omentum betroffen sind oder eine Metastasierung stattgefunden hat. Im Gegensatz zu Typ I Tumoren sind Typ II Tumore chromosomal instabil. Die in einem Großteil der Fälle vorliegende Mutation des Tumorsuppressor-Gens p53 ist charakteristisch für Typ II Tumore.

Die folgende Tabelle stellt die wesentlichen Eigenschaften des Ovarialkarzinoms Typ I und Typ II einander zusammenfassend gegenüber:

	Typ I Tumore	Typ II Tumore
Vorstufe	Entwicklung aus benignen Vorstufen/Endometriose	„de novo“ (Tubendysplasie)
KRAS/BRAF Mutationen	hoch	gering
p53 Mutationen	gering	hoch
BRCA1/BRCA2 Mutationen	gering	hoch
Chromosomale Stabilität	eher stabil	instabil

Tabelle 2. Charakteristika des Ovarialkarzinoms Typ I und Typ II, in Anlehnung an (60) (61) (62)

1.1.5 Diagnostik

1.1.5.1 Screening

Die aktuelle S3-Leitlinie zum Umgang mit malignen Ovarialtumoren spricht keine Empfehlung für ein Screening aus (31). Weder die regelmäßige Bestimmung des Tumormarkers CA-125 (siehe Kapitel 1.1.7) noch die prophylaktische Durchführung einer transvaginalen Sonographie führen zu einer Reduktion der Mortalität (63) (64). Auch Risikopatientinnen wird aufgrund der niedrigen Effektivität von Früherkennungsmaßnahmen abgeraten. Stattdessen soll den betreffenden Frauen eine genetische Testung angeboten werden und eine Aufklärung über die Möglichkeit einer prophylaktischen Operation erfolgen (31).

1.1.5.2 Symptomatik und klinisches Vorgehen

Das Ovarialkarzinom weist keine spezifischen Frühsymptome auf (65) (66) (67). Dies erschwert das frühzeitige Erkennen des Krankheitsbildes und hat zur Folge, dass sich viele Patientinnen erst mit bereits fortgeschrittenem Befund vorstellen (1). Bei wiederholten Symptomen wie Völlegefühl, Blähungen, unklaren abdominalen Schmerzen und/oder Anstieg der Miktionsfrequenz sollten – insbesondere bei Frauen über dem 50. Lebensjahr – diagnostische Schritte eingeleitet werden (31) (65) (66) (67). Besteht der Verdacht auf eine ovarielle Raumforderung, sollte laut aktueller S3-Leitlinie zunächst eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung und als erste apparative Maßnahme ein transvaginaler Ultraschall durchgeführt werden. Weiterführende Bildgebung wie MRT, CT oder PET kann bei speziellen Fragestellungen oder zur differentialdiagnostischen Abklärung erfolgen (31).

1.1.5.3 Stadieneinteilung

Die Ovarialtumore können nach dem FIGO-Staging (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) oder der TNM-Klassifikation nach UICC (Union for International Cancer Control) anhand ihrer mikro- und makroskopischen sowie histo- und zytopathologischen Befunde eingeteilt werden (31) (68) (69). Aufgrund der neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu ihrer gemeinsamen Genese und Histomorphologie (siehe Kapitel 1.1.2.3) werden das Ovarial-, das Tuben- und das primäre Peritonealkarzinom gemeinsam klassifiziert. Das Tumorstadium spielt eine wichtige Rolle für die weitere Therapieplanung und die Prognose (31).

Die hier abgebildete Tabelle richtet sich im Wesentlichen nach der gegenüberstellenden Darstellung der FIGO-Klassifikation und den dazugehörigen TNM-Stadien innerhalb der aktuellen S3-Leitlinie (31).

TNM	FIGO	Definition
T1	I	Tumor auf Ovarien/Tuben begrenzt
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar (Kapsel intakt) / eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- bzw. Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) / beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- bzw. Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Befall eines oder beider Ovarien / Tuben mit Kapsel- bzw. Serosaruptur oder Ausbreitung des Tumors auf die Ovar- oder Tubenoberfläche oder Nachweis maligner Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie
T2	II	Tumorbefall eines oder beider Ovarien / Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien / Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1	IIIA1	Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Lymphknotenmetastasen \leq 10mm
N1b	IIIA1ii	Lymphknotenmetastasen $>$ 10mm
T3a	IIIA2	Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b	IIIB	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens \leq 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c	IIIC	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $>$ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen

Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms, in Anlehnung an (31)

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Operative Therapie

Die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms erfolgt chirurgisch. Das Ziel des operativen Vorgehens ist die vollständige makroskopische Resektion (31). Die Prognose des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms wird wesentlich durch das Ausmaß des Tumorrests nach Primäroperation bestimmt. Das Gesamtüberleben kann durch eine makroskopische Komplettresektion um bis zu 5 Jahre gesteigert werden (70).

1.1.6.2 Chemotherapie

Postoperativ sollte bei Patientinnen mit fr<ü>hem Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium I - IIA, au<ß>er Stadium IA, G1) eine platinhaltige Chemotherapie durchgef<ü>hrt werden. Die Patientinnen profitieren dadurch sowohl hinsichtlich des Gesamt*überlebens* (5-Jahres-*Überlebensrate* steigt von 75 % auf 82 %) als auch des progressionsfreien *Überlebens* (progressionsfreie 5-Jahres-*Überlebensrate* steigt von 65 % auf 76 %) (71). Auch beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium IIB - IV) wird zu einer Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel geraten (31). Eine neoadjuvante Chemotherapie zeigte keine Vorteile gegen*über* der prim*ären* Debulking-Operation und wird daher nicht empfohlen (31) (72).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Ansprechen des Ovarialkarzinoms auf die Chemotherapie abh*äng*ig vom molekularen und histologischen Subtyp ist. So sprechen zum Beispiel muzin<ö>se Karzinome schlechter auf Carboplatin/Paclitaxel an. Bisher wird allerdings nicht zur subtypspezifischen Abweichung vom Therapiestandard geraten (31).

1.1.6.3 Zielgerichtete Therapie

Basierend auf Erkenntnissen zur molekularen Tumorgenese existieren auch zielgerichtete Therapiestrategien zur Behandlung des Ovarialkarzinoms. Der monoklonale Antik<ö>per Bevacizumab gegen den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) kann beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom zur Additionstherapie oder zur Rezidivtherapie eingesetzt werden (31) (73). Andere VEGF-Inhibitoren wie Pazopanib oder Nintedanib sind zur Therapie des Ovarialkarzinoms bisher nicht zugelassen, da sie nur das progressionsfreie *Überleben* zu verbessern scheinen, nicht aber das Gesamt*überleben* der Patientinnen (31) (74) (75).

Au<ß>erdem spielen PARP-Inhibitoren (Inhibitoren der Poly-ADP-Ribose-Polymerase) eine Rolle bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms: BRCA-positiven Patientinnen mit high-grade Ovarialkarzinom sollte nach Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie eine Erhaltungstherapie mit dem PARP-Inhibitor Olaparib angeboten werden (31). Dadurch kann das Risiko eines Progresses oder Todes um 70 % gesenkt werden (76). Auch bei Patientinnen mit Rezidiv eines platin-sensitiven high-grade Ovarialkarzinoms wird eine solche Erhaltungstherapie empfohlen (31).

1.1.7 Tumormarker

CA-125 (Cancer-Antigen 125) ist der bekannteste serologische Biomarker für das Ovarialkarzinom (77). Der Serumspiegel dieses Transmembran-Glykoproteins ist bei ca. 90 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO II, III, IV) erhöht (78). Im frühen Stadium (FIGO I) werden dagegen nur in 50 % der Fälle auffällige CA-125-Werte gemessen (78). Ein Anstieg dieses Markers kann auch durch andere maligne Geschehen wie z. B. Pankreas-, Mamma- oder Lungenkarzinom, durch benigne gynäkologische Erkrankungen wie z. B. Endometriose oder durch benigne nicht-gynäkologische Erkrankungen wie z. B. Leberzirrhose hervorgerufen werden (78) (79). Die alleinige Bestimmung von CA-125 ist weder ausreichend sensitiv noch spezifisch genug für ein adäquates Screening bzw. für die Therapie- und Rezidivkontrolle und wird von der aktuellen S3-Leitlinie daher nicht empfohlen (31).

Durch Genexpressions-Arrays und Proteomanalysen konnte in den letzten Jahrzehnten eine Reihe weiterer diagnostischer und prognostischer Tumormarker für das Ovarialkarzinom identifiziert werden (79) (80) (81) (82) (83) (84). Dazu zählen z. B. das kostimulatorische T-Zell-Molekül B7-H4 (85), der Lipid-Marker LPA (86), die Serinprotease Prostasin (87), das Glykophosphoprotein Osteopontin (88) und das humane Epididymis-Protein HE4 (89). Aktuell spielen diese Marker kaum eine Rolle im klinischen Alltag. Aufgrund der Heterogenität des Ovarialkarzinoms empfiehlt sich ein kombinierter Einsatz mehrerer Tumormarker, um ausreichende Spezifität und Sensitivität bei diagnostischen und prognostischen Fragestellungen zu ermöglichen (83).

Weitere Ansatzpunkte für ein adäquates Screening, für die Diagnostik und für die Therapie des Eierstockkrebs werden dringend benötigt. Im Folgenden wird ein Rezeptor vorgestellt, der vermutlich in maligne Prozesse involviert ist. Es wird der Frage nachgegangen, ob dieser Rezeptor auch eine Rolle als Biomarker für das Ovarialkarzinom spielen könnte.

1.2 Estrogen-Related Receptor γ

1.2.1 Einordnung in die Superfamilie der nukleären Rezeptoren

Als nukleäre Rezeptoren werden Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die die Genexpression durch Bindung von Liganden kontrollieren. Zu dieser Superfamilie gehören neben Rezeptoren für Steroidhormone, für Thyroidhormone und für die fettlöslichen Vitamine A und D auch Rezeptoren, für die zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung noch kein Ligand bekannt war (90). Diese Proteine werden „Orphan Nuclear Receptors“ genannt (91). Mit dem Fortschritt der Wissenschaft war allerdings später die Identifizierung und Charakterisierung von Liganden und Zielgenen für viele dieser Rezeptoren möglich (92). Die „Estrogen-Related Receptors“ (ERR) sind die ersten entdeckten „Orphan Nuclear Receptors“. Sie wurden ursprünglich 1988 auf der Suche nach neuen Hormonrezeptoren in cDNA-Datenbanken gefunden (93). Dabei stieß man auf zwei bis dahin unbekannte Proteine mit hoher Homologie zum humanen Östrogen-Rezeptor (ER), die als „Estrogen-Related Receptor“ $\text{ERR}\alpha$ und $\text{ERR}\beta$ bezeichnet wurden (93). Die dritte Isoform, $\text{ERR}\gamma$, wurde erst 10 Jahre später identifiziert (94) (95) (96). Obwohl die ERR den ER strukturell ähnlich sind, binden sie weder Östradiol noch andere natürliche Östrogene (93). Die Frage nach ihren physiologischen Liganden ist immer noch ungeklärt (92). Es wird heute allerdings davon ausgegangen, dass die ERR konstitutiv aktive Transkriptionsfaktoren sind, also in Abwesenheit eines Liganden zellkontext- und promotorabhängig wirken (97).

$\text{ERR}\alpha$ (NR3B1, Gen: ESRRA), $\text{ERR}\beta$ (NR3B2, Gen: ESRRB) und $\text{ERR}\gamma$ (NR3B3, Gen: ESRRG) bilden zusammen die Gruppe NR3B der nukleären Rezeptoren innerhalb der Subfamilie NR3, in der klassische Steroidrezeptoren wie Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Mineralcorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren nach struktureller Verwandtschaft gruppiert sind (98).

- A. Gruppe NR3A: Östrogen-Rezeptoren (ER)
 - 1. NR3A1: Estrogen Receptor α ($\text{ER}\alpha$; ESR1)
 - 2. NR3A2: Estrogen Receptor β ($\text{ER}\beta$; ESR2)
- B. Gruppe NR3B: Estrogen-related receptors (ERR)
 - 1. NR3B1: Estrogen-Related Receptor α ($\text{ERR}\alpha$; ESRRA)
 - 2. NR3B2: Estrogen-Related Receptor β ($\text{ERR}\beta$; ESRRB)
 - 3. **NR3B3: Estrogen-Related Receptor γ ($\text{ERR}\gamma$; ESRRG)**
- C. Gruppe NR3C: 3-Ketosteroidrezeptoren
 - 1. NR3C1: Glucocorticoid-Rezeptor (GR)
 - 2. NR3C2: Mineralcorticoid-Rezeptor (MR)
 - 3. NR3C3: Progesteron-Rezeptor (PR)
 - 4. NR3C4: Androgen-Rezeptor (AR)

Abbildung 3: Einordnung von $\text{ERR}\gamma$ in die Subfamilie NR3 der Superfamilie der nukleären Rezeptoren, nach (98)

1.2.2 Strukturelle Eigenschaften von ERR γ

Der Aufbau der ERR entspricht der für nukleäre Rezeptoren typischen Struktur. Diese wird hauptsächlich durch drei funktionelle Domänen definiert: Die N-terminale Domäne (NTD), die DNA-bindende Domäne (DBD) und die C-terminale Liganden-bindende Domäne (LBD) (91) (99). ERR γ ist folgendermaßen aufgebaut:

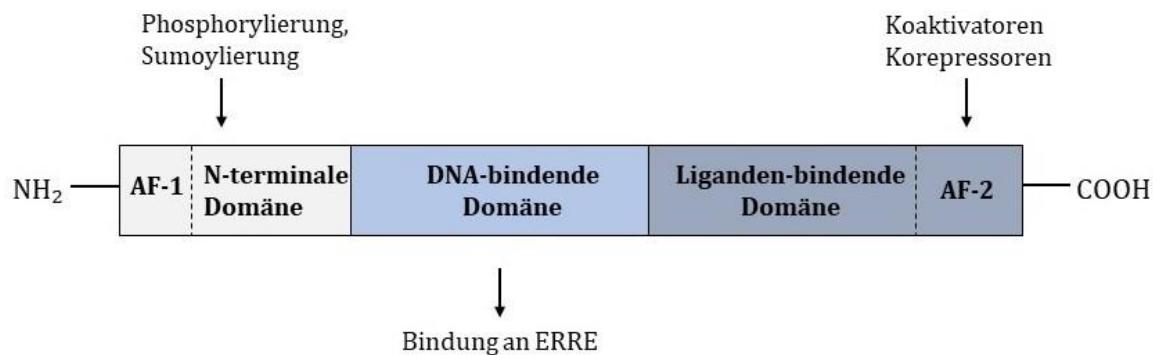


Abbildung 4: Struktur von ERR γ , modifiziert nach (100) und (101)

1. Die **N-terminale Domäne** (NTD) beinhaltet eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1). Durch posttranskriptionale Modifikation der NTD wie Phosphorylierung und Sumoylierung wird die Aktivität von ERR γ moduliert (102).
2. Die **DNA-bindende Domäne** (DBD) der ERR ist mit zwei Zinkfingerproteinen für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich. Sie erkennt die Nukleotidsequenz 5'-TCAAGGTCA-3' in den distalen Promotorelementen der Zielgene. Diese Basenfolge wird als „Estrogen-Related Response Element“ (ERRE) bezeichnet (103) (104) (105) (106). Durch Bindung an die DNA werden verschiedene Koregulatoren (Koaktivatoren und Korepressoren) rekrutiert, die die Chromatinstruktur der DNA verändern, der Transkriptionsmaschinerie damit den Zugang zu den Zielgenen ermöglichen oder verwehren und so die Transkription dieser Gene regulieren (107). ERR γ kann als Monomer, Homodimer oder als Heterodimer mit ERR α an das ERRE binden (108) (109). Es wurde eine gesteigerte Transaktivierung festgestellt, wenn ERR γ als Homodimer vorliegt (108). Im Gegensatz dazu scheinen Heterodimere aus ERR γ und ERR α ihre jeweilige transkriptionelle Aktivität zu inhibieren (108).
3. Die **Liganden-bindende Domäne** (LBD) ist für die Ligandenbindung zuständig und besitzt eine hormonabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2). Während klassische nukleäre Rezeptoren für die Aktivierung der AF-2 und damit für die Genaktivierung einen Liganden benötigen, scheinen die ERR konstitutiv aktiv zu sein. Die LBD von ERR γ befindet sich in

Abwesenheit eines Liganden in der aktiven Konformation, wodurch die Rekrutierung von Koaktivatoren ligandenunabhängig erfolgen kann (110).

Die drei ERR weisen beim Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen ein hohes Maß an Ähnlichkeit auf (siehe Abbildung 5). Vor allem die DBD der drei ERR ist beinahe identisch und stimmt zwischen ERR α , ERR β und ERR γ um mehr als 90 % überein. Zwischen der NTD von ERR β und ERR γ fällt ebenfalls eine ungewöhnlich große Ähnlichkeit auf. Auch die LBD der drei ERR ähnelt sich sehr (100). Daraus kann geschlossen werden, dass die drei ERR-Isoformen dieselben Zielgene ansteuern und sich ihre Funktionen überlappen (109).

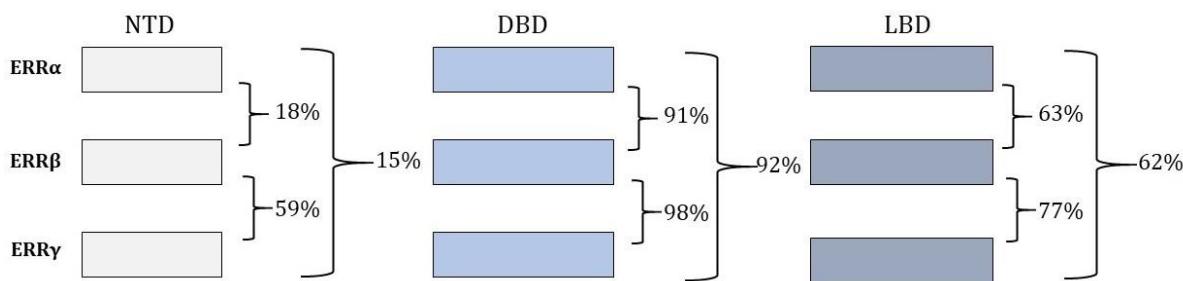


Abbildung 5. Homologie der Domänen der drei ERR-Isoformen, modifiziert nach (100)

Die Frage, ob es überhaupt einen physiologischen Liganden für ERR γ gibt, ist noch immer nicht endgültig geklärt. Zwar besitzt ERR γ eine LBD, doch da diese nicht nur für die Bindung von Liganden zuständig ist, sondern auch Aufgaben wie Rezeptor-Dimerisierung und Rekrutierung von Koaktivatoren erfüllt, ist ihr Vorhandensein kein Beweis für die Existenz eines natürlichen Liganden (91). Strukturelle Analysen zeigten, dass die Liganden-bindende Tasche (LBP) des ungebundenen ERR γ mit 220 \AA^3 sehr klein ist. Ein natürlicher ERR γ -Agonist dürfte also maximal halb so groß sein wie Östradiol und könnte vermutlich nur mit geringer Affinität an den Rezeptor binden (110). Allerdings wurden zwei synthetische agonistisch-wirkende „small molecule“-Liganden identifiziert, die eine Umstrukturierung der LBP von ERR γ induzieren und sie so vergrößern (111) (siehe Kapitel 1.2.3.2). Da die LBP der ERR aber ligandenunabhängig in aktiver Konfiguration vorliegt, scheint ein endogener Ligand – falls vorhanden – für die Transaktivierung eine untergeordnete Rolle zu spielen (110). Statt von der Anwesenheit eines natürlichen Liganden scheint die transkriptionelle Aktivität der ERR eher von posttranslationalen Modifikationen und vom Vorhandensein koregulatorischer Proteine abhängig zu sein.

1.2.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität von ERR γ

1.2.3.1 Interaktion mit Koregulatoren

Die Konzentrationen der Koaktivatoren bzw. Korepressoren im zellulären Kontext bestimmen die Auswirkungen von ERR γ auf die Genexpression (112). Am bedeutendsten sind hierbei die „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)“-Koaktivatoren PGC-1 α und PGC-1 β , die die transkriptionelle Aktivität von ERR α und ERR γ steigern (113) (114) (115) (116). Die PGC-Proteine weisen eine hohe Spezifität für die ERRs auf, weshalb sie auch als deren „protein ligands“ betrachtet werden können (117). Zusammen sind die PGC-Proteine und die ERR von großer Bedeutung für die Regulation der Energiehomöostase (siehe Kapitel 1.2.4.2).

Eine weitere Gruppe von Koaktivatoren stellen drei Proteine der p160-Familie dar, die ihre Wirkung auf die Genexpression durch Histonmodifikation entfalten: Es wurde gezeigt, dass die Steroidrezeptor-Koaktivatoren SRC-1, SRC-2 und SRC-3 die ERRs in Abwesenheit eines Liganden aktivieren (118) (119) (120). Hong et al., die ERR γ in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten, wiesen nach, dass die AF-2-Domäne von ERR γ mit SRC-2 in vitro und in vivo ligandenunabhängig interagiert (95). Das „Receptor Interacting Protein 140“ (RIP140) (121) (122) und der „Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner“ (SHP) (123) wirken dagegen als Korepressoren und inhibieren die Aktivität von ERR γ .

1.2.3.2 Synthetische Modulatoren

Es wurden einige synthetische Verbindungen identifiziert, die die transkriptionelle Aktivität der ERR modulieren. Wenn diese inhibitorisch wirken, können sie entweder als Antagonisten bezeichnet werden (falls die ERR doch einen physiologischen Liganden besitzen) oder als inverse Agonisten (falls die ERR tatsächlich nur konstitutiv aktiv sind) (92). Die meisten dieser chemischen Substanzen haben eines gemeinsam: Sie greifen in die Östrogen-Signalwege ein. Das künstliche Östrogen-Analog Diethylstilbestrol (DES) inhibiert alle drei Isoformen der ERR (119). Der synthetische ER-Modulator 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) bindet an ERR β und ERR γ , unterdrückt dabei aber nur die transkriptionelle Aktivität von ERR γ (120). Sowohl durch Bindung von DES als auch von 4-OHT an ERR γ wird eine Umlagerung der Aminosäurereste der LBP von ERR γ induziert. Dadurch wird die „Aktivationshelix“ der AF-2 von ihrer aktiven Position verdrängt und die Rekrutierung von Koaktivatoren verhindert (124). Durch eine strukturbasierte Herangehensweise wurde das Tamoxifenanalog GSK5182 als ERR γ -spezifischer inverser Agonist designet (125). ERR γ scheint also eher ein Liganden-inaktiverter als ein Liganden-aktivierter Rezeptor zu sein (110).

Acylhydrazone wie GSK4716 und GSK90989 zeigen jedoch, dass es durchaus Moleküle gibt, die als Agonisten die $\text{ERR}\gamma$ -Aktivität induzieren können (111). Diese beiden synthetischen Stoffe lösen eine Umstrukturierung der LBD aus und erhalten dadurch Zugang zu einer größeren LBP. Die AF-2-Helix kann so in ihrer aktiven Position verbleiben. Es wird vermutet, dass die agonistischen Effekte von GSK4716 und GSK90989 auf die Verlängerung der Halbwertzeit von $\text{ERR}\gamma$ durch Thermostabilisierung zurückzuführen sind (126). Auf ähnliche Weise scheint auch der Umweltschadstoff und endokrine Disruptor Bisphenol A (BPA) zu wirken. BPA bindet mit hoher Affinität an $\text{ERR}\gamma$. Dabei wird dessen Konformation nicht verändert, die „Aktivationshelix“ behält ihre aktive Position bei und die konstitutive transkriptionelle Aktivität von $\text{ERR}\gamma$ bleibt unbeeinflusst (127) (128). BPA scheint als „Platzhalter“ zu wirken und verhindert die Bindung von 4-OHT und die dadurch verursachte Inhibition der $\text{ERR}\gamma$ -vermittelten Genexpression. Setzt man voraus, dass keine natürlichen Liganden für $\text{ERR}\gamma$ existieren, so kann BPA als Agonist von $\text{ERR}\gamma$ betrachtet werden (127).

1.2.4 Zielgene und Funktionen der ERR

Die meisten vorhanden Studien zu den ERR haben Zielgene und Funktionen der Isoform $\text{ERR}\alpha$ charakterisiert. Da die ERR aber an dieselben Promotoren und Zielgene binden, kann man davon ausgehen, dass für $\text{ERR}\alpha$ identifizierte Zielgene auch von $\text{ERR}\gamma$ angesteuert werden (109). Über die physiologische Rolle von $\text{ERR}\beta$ in adulten Geweben ist dagegen wenig bekannt, da $\text{ERR}\beta$ vor allem in embryonalen Geweben exprimiert wird (129).

1.2.4.1 Interaktion mit ER und Östrogensignalwegen

Einige der im vorherigen Kapitel beschriebenen chemischen Modulatoren haben auch Einfluss auf die Aktivität der ER, die „Vorbilder“ der ERR. Obwohl das synthetische Östrogenanalog DES auf ER agonistisch wirkt, konnte früher durch dessen klinischen Einsatz beim östrogen-assoziierten Mammakarzinom (unabhängig vom ER-Status) die Krebsremission erreicht werden (130). Dabei zeigt DES ähnlich gute Wirkung wie der ER-Modulator Tamoxifen (131). Dies scheint auf den ersten Blick paradox. Es wird daher spekuliert, ob die inhibitorische Wirkung von DES auf die ERR (im Gegensatz zur agonistischen Wirkung von DES auf die ER) zur therapeutischen Wirkung von DES beigetragen haben könnte (132). Die Östrogenantwort scheint nicht nur über den klassischen ER-Signalweg vermittelt zu werden, sondern auch durch Wechselwirkungen mit den ERR (133).

Die LBD von ERR und von ER stimmen in nur 37 % überein (für das Beispiel ERR α und ER α), daher ist es nicht verwunderlich, dass die ERR nicht auf natürliche Östrogene ansprechen (93). Das hohe Maß an Ähnlichkeit der DBD (68 % zwischen ERR α und ER α) legt jedoch nahe, dass sich die beiden Rezeptorgruppen einige Zielgene, Koregulatoren und DNA-Bindestellen teilen und sich ihre Funktionen teilweise überlappen (133). ERR können nicht nur ihre eigenen spezifischen ERRE erkennen, sondern zum Teil auch die hormonempfindlichen DNA-Bereiche der ER (Estrogen Responsive Element bzw. ERE) in ER-Zielgenen (106). Die ERR modulieren einige östrogenresponsive Gene, darunter das Gen für Lactoferrin (104), Osteopontin (134) und für den Brustkrebs-Marker pS2 (132). Auch das Gen für die Aromatase, ein Enzym, das die Konversion von Androgenen zu Östrogenen katalysiert, wird von ERR α angesteuert (135). Darüber hinaus wird angenommen, dass die ER und die ERR um koregulatorische Proteine konkurrieren. So können zum Beispiel auch ERR an die Koaktivatoren der SRC-Familie binden, die für die ER-vermittelte Gentranskription wichtig sind (136).

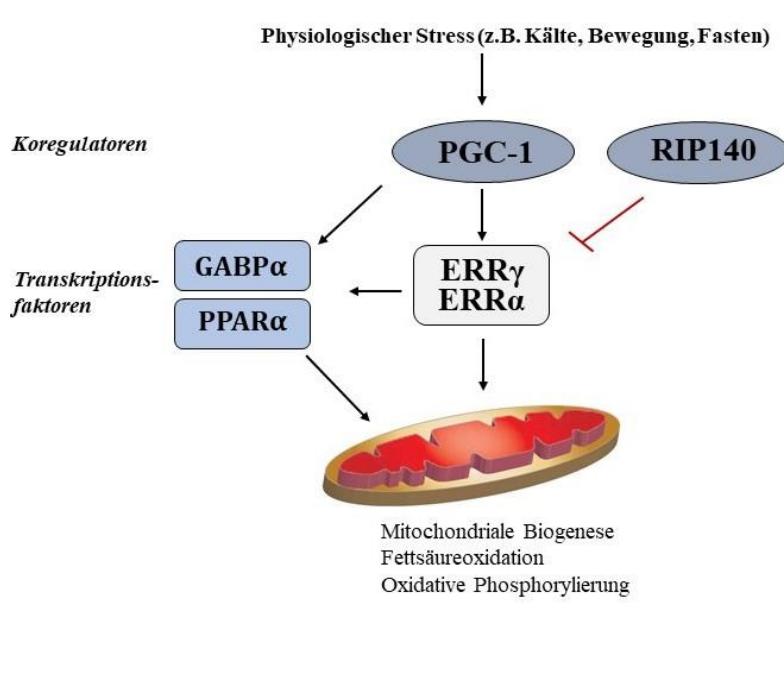
Die ERR scheinen durch direkte Konkurrenz am Promotor oder um Koregulatoren die Reaktion östrogenresponsiver Gene je nach Kontext synergistisch oder antagonistisch zu beeinflussen (136). Es lässt sich die Hypothese ableiten, dass die ERR durch ihre Interaktionen mit Östrogen-Signalwegen die Östrogenantwort einer Zelle direkt und indirekt beeinflussen und daher auch eine Rolle in mit Östrogen zusammenhängenden Krankheitsbildern spielen. Die ERR sind damit potentielle Zielstrukturen bei der Entwicklung alternativer Therapieoptionen für östrogenabhängige Erkrankungen wie Mamma- oder Ovarialkarzinom (137). Trotzdem scheinen sich die ERR in ihren biologischen Funktionen und Mechanismen von ER zu unterscheiden: Heute werden sie – wie das folgende Kapitel zeigt – als Regulatoren des zellulären Energiemetabolismus gesehen (101).

1.2.4.2 Regulation des Stoffwechsels und Energiemetabolismus

Die Entdeckung eines der ersten ERRE im Promotor des Gens der Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym der mitochondrialen Fettsäureoxidation, lieferte einen ersten Hinweis auf die Mitwirkung der ERR an der Stoffwechselregulation (103). Um weitere Gene identifizieren zu können, die von den ERR angesteuert werden, wurden genomweite Analysen von ERR α - und ERR γ -Bindestellen in Promotoren durchgeführt (109) (138) (139). Dabei fällt auf, dass signifikant viele der dadurch ausfindig gemachten ERR-Zielgene für mitochondriale und andere am Energiestoffwechsel beteiligten Proteine kodieren. Die ERR sind in die Regulation der oxidativen Phosphorylierung, des Citratzyklus, des Fettsäure-, Glucose- und Cholesterinmetabolismus und der mitochondrialen Biogenese involviert (101).

Durch Modulation der Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, die selbst auch den Energiemetabolismus beeinflussen, haben die ERR eine zusätzliche indirekte Wirkung auf die mitochondriale Genausprägung. So induziert zum Beispiel ERR α die Expression von GABP α (GA-Binding Protein α) und PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) (140) (141).

Darüber hinaus spielen auch die meist mit ERR koexprimierten PGC-Proteine, die als „Protein-Liganden“ der ERR gelten, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle mitochondrialer Funktionen und des Energiemetabolismus (142). Um die Transkription der mitochondrialen Gene und die mitochondriale Biogenese maximal aktivieren zu können, benötigen ERR α und ERR γ die PGC-1-Proteine – und umgekehrt (116) (143). Es wird daher davon ausgegangen, dass ERR α und ERR γ und die PGC-1-Koaktivatoren in gegenseitiger Abhängigkeit die mitochondriale Biogenese und Stoffwechselwege regulieren, um die zelluläre Energiehomöostase aufrecht zu erhalten (112) (140) (144). Die beschriebenen Zusammenhänge werden schematisch in Abbildung 6 dargestellt.



Die Expression von PGC-1 α wird durch physiologische Stimuli wie Kälte, Fasten und Bewegung gesteigert. Dies führt in einem positiven Feed-Forward-Mechanismus auch zu einer vermehrten Expression der ERR. ERR α und ERR γ aktivieren weitere Transkriptionsfaktoren wie GABP α und PPAR γ , die die mitochondrialen Gene aktivieren. Im Zusammenspiel mit PGC-1 und den anderen Transkriptionsfaktoren kontrollieren die ERR so die genetischen Programme der mitochondrialen Biogenese, Fettsäureoxidation und oxidativen Phosphorylierung. Der Koregulator RIP140, der durch ERR α stimuliert wird und die ERR-Aktivität hemmt, sorgt für eine negative Rückkopplung.

Abbildung 6: Schematische Darstellung des transkriptionellen Netzwerks zur Regulation der mitochondrialen Funktionen, modifiziert nach (97) und (101)

Dass die ERR essentiell für den Energiemetabolismus sind, zeigt sich weiterhin darin, dass der Knockdown von ERR α oder ERR γ in Mäusen zur Störung der mitochondrialen Funktionen und Verminderung der Sauerstoffkapazität in Herzmuskelzellen, Adipozyten und Makrophagen führt (101).

Schließlich spiegelt auch das Expressionsmuster der ERR den Zusammenhang zwischen ERR und Energiemetabolismus wider (siehe Tabelle 4). ERR α und ERR γ werden nämlich besonders in Geweben mit hohem Energiebedarf und Stoffumsatz exprimiert. ERR α ist im menschlichen Organismus ubiquitär zu finden, vor allem in Herz, Niere, Darm, Skelettmuskulatur und im braunen Fettgewebe (145). ERR β ist dagegen hauptsächlich im extraembryonalen Ektoderm vorhanden und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der Plazenta (146), postnatal findet es sich nur in geringen Mengen (145). ERR γ kann in hohen Konzentrationen im fetalen Gehirn nachgewiesen werden und wird im adulten Gewebe vielerorts exprimiert, vor allem in Gehirn, Lunge, Knochenmark, Nebenniere, Schilddrüse, Trachea und Rückenmark (94).

	ERR α	ERR β	ERR γ
Zentrales Nervensystem	+++	++	+++
Endokrines System	++	++	+
Magen-Darm-Trakt	+++	++	++
Metabolisches System	+++	++	++
Immunsystem	++	-	+
Reproduktionssystem	++	+	++
Kardiovaskuläres System	+++	++	++
Strukturell	++	-	-

Tabelle 4: Verteilung der mRNA-Expression der ERR-Isoformen nach Geweben, modifiziert nach (145)

+++ \triangleq starke Expression; ++ \triangleq mäßige Expression; + \triangleq geringe Expression

Obwohl ERR α und ERR γ dieselben Zielgene ansteuern, scheinen sie doch teilweise unterschiedliche Funktionen im Energiemetabolismus auszuüben. Es wird vermutet, dass ERR α an der Bereitstellung von Energie als Reaktion auf physiologische und pathologische Stimuli beteiligt ist, während ERR γ die Befriedigung der zellulären energetischen Grundbedürfnisse und die Aufrechterhaltung der basalen oxidativen Stoffwechselprozesse gewährleistet (112) (147). Dies zeigt sich auch an den gegensätzlichen Wirkungen von ERR α und ERR γ auf die Tumorprognose, die im nächsten Kapitel genauer betrachtet werden.

1.2.5 Die Rolle von $ERR\gamma$ in der Karzinogenese

1.2.5.1 Klinische Korrelation von $ERR\alpha$ und $ERR\gamma$ mit Tumorprognose

Es existieren zahlreiche Publikationen, die die Expression der ERR in Tumorgewebe und deren Effekt auf Eigenschaften und Prognose des Tumors untersucht haben. Dabei wurde den ERRs unter anderem eine Rolle in der Pathophysiologie des hepatzellulären Karzinoms, des Prostata-, Endometrium-, Magen-, Mamma- und des Ovarialkarzinoms zugeschrieben. In fast allen Forschungsarbeiten zu den unterschiedlichen Malignomen korrelierte eine erhöhte $ERR\alpha$ -Expression mit einer schlechteren Prognose. Dagegen vermittelte $ERR\gamma$ abhängig vom Tumortyp sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Effekte. Eine Übersicht über die vorhandenen Studien zur Expression von $ERR\gamma$ und $ERR\alpha$ in Krebszellen und die daraus resultierenden Folgerungen bietet Tabelle 5. $ERR\beta$ wird dabei aufgrund der unzureichenden Datenlage vernachlässigt (148) (149).

ERR-Isoform	Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe	Assoziation/Folgerung
Hepatozelluläres Karzinom , nach Kim et al. (150)		
$ERR\alpha$	Nicht untersucht	-
$ERR\gamma$	Erhöht	Assoziation mit fortgeschrittenem TNM- und BCLC-Stadium
Prostatakarzinom , nach Fujimara et al. (151) (152), Yu et al. (153)		
$ERR\alpha$	Erhöht im Vgl. zur benignen Hyperplasie	Ungünstiger prognostischer Marker (verkürzte Überlebenszeit, hoher Gleason Score)
$ERR\gamma$	Erniedrigt im Vgl. zur benignen Hyperplasie	Niedrige $ERR\gamma$ -Expression assoziiert mit schlechter Prognose (verkürzte Überlebenszeit)
Endometriumkarzinom , nach Gao et al. (154), Fujimoto et al. (155)		
$ERR\alpha$	Inkonsistente Ergebnisse	Ungünstiger prognostischer Marker (hohes FIGO-Stadium, myometriane Infiltration)
$ERR\gamma$	Erhöht	Negative Korrelation mit Vorkommen von Lymphknotenmetastasen
Magenkarzinom , nach Kang et al. (156)		
$ERR\alpha$	Nicht untersucht	-
$ERR\gamma$	Erniedrigt	Erhöhte $ERR\gamma$ -Expression assoziiert mit besserer Prognose (Gesamt- und rezidivfreies Überleben)

Mammakarzinom , nach Ariaizi et al. (157), Suzuki et al.(158)		
ERR α	Erhöht	Ungünstiger prognostischer Marker (ER α und PR negativ, ERBB2 positiv)
ERR γ	Erhöht	Günstiger prognostischer Marker (ER α , PR und ERBB4 positiv)
Ovarialkarzinom , nach Sun et al. (159)		
ERR α	Erhöht	Verkürzte Überlebenszeit
ERR γ	Erhöht	Verlängerte Überlebenszeit

Tabelle 5: Expression von $ERR\alpha$ und $ERR\gamma$ in Tumoren und deren Korrelation mit der Tumorprognose

Während bei den meisten anderen untersuchten Tumortypen ERR γ eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben wird, wirkt ERR γ in hepatzellulären Karzinomzellen laut einer Publikation von Kim et al. eher onkogen (150): In humanen Leberkarzinomzellen wurde eine deutliche Hochregulierung von ERR γ im Vergleich zu nicht-malignen Leberzellen festgestellt. Die Höhe des ERR γ -Expressionslevels war in dieser Studie mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium (TNM und BCLC) und pathologischen Grading assoziiert (150). In Prostatakarzinomzellen dagegen war die Expression von ERR γ bei einer Untersuchung durch Fujimara et al. im Vergleich zu normalen Prostatazellen herunterreguliert (152) (153). Eine niedrige ERR γ -Expression korrelierte dabei invers mit der Tumoraggressivität (160). Die hohe Expression von ERR α in Prostatakarzinomzellen war mit hohem histologischem Differenzierungsgrad (Gleason Score) und reduziertem Überleben assoziiert (151). Besonders die kombinierte Evaluation der Expressionen von ERR α und ERR γ könnte als prognostischer Marker für das Prostatakarzinom dienen, wobei eine hohe Expression von ERR α und gleichzeitig niedrige Expression von ERR γ im Zusammenhang mit verkürztem krebs-assoziierten Überleben stehen (152). In Endometriumkarzinomzellen ist die Studienlage zu Gen- und Proteinexpressionsniveaus von ERR α inkonsistent: Es wurden sowohl niedrige als auch hohe ERR α -Expressionsniveaus festgestellt (154) (155). Gao et al. beschrieben eine Korrelation von ERR α mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium und myometraner Infiltration. Die Expression von ERR γ war in Endometriumtumoren im Vergleich zu angrenzendem normalem Gewebe hoch und korrelierte negativ mit dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen (154). ERR γ könnte also als Biomarker dienen, der einen günstigen klinischen Verlauf des Adenokarzinoms des Endometriums prognostiziert. Im Magenkarzinom wird ERR γ ebenfalls eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben. Kang et al. stellten bei Genomanalysen von Genexpressionsdaten fest, dass ESRRG in Magenkarzinomzellen im Vergleich zu normalem

Magengewebe mehr als zehnfach herunterreguliert war. Patienten mit höherem ESRRG-Level wiesen ein signifikant besseres Gesamt- und rezidivfreies Überleben auf als die Kontrolle (156). Die Expression von ERR α -mRNA im Mammakarzinom ist mit ER- und PR-negativem Status sowie mit gesteigerter Expression des ERBB2-Onkogens assoziiert und damit mit einer schlechteren Prognose. Im Gegensatz dazu wird ERR γ durch seine Korrelation mit ERBB4-Expression und ER α - und PR-positivem, hormonsensitivem Status eher als günstiger Biomarker gesehen (157) (158).

Diese oben beschriebene gegensätzliche Korrelation von ERR α und ERR γ mit der Tumorprognose bzw. Überlebenszeit im Mammakarzinom wurde von Sun et al. auch in Ovarialkarzinomzellen beobachtet (159): ERR α gilt hier als Biomarker einer schlechten Prognose, während ERR γ als günstiger prognostischer Marker gesehen wird. Eine hohe Expression von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen ist mit einem länger progressionsfreien Krankheitsverlauf assoziiert (159).

Es stellt sich nun die Frage, durch welche molekularen Mechanismen die onkogenen oder tumorsuppressiven Effekte von ERR α und ERR γ vermittelt werden. Das folgende Kapitel stellt zwei in der Forschung gängige Thesen vor.

1.2.5.2 Vermittlung der Effekte von $ERR\alpha$ und $ERR\gamma$ auf Krebszellen

Östrogen-Interferenz

Abnormale Östrogen-Aktivität geht mit verschiedenen Erkrankungen einher; darunter mit Osteoporose, mit der koronaren Herzkrankheit und mit Östrogen-assoziierten Neoplasien wie Mamma- oder Endometriumkarzinom (161). Östrogene induzieren in den Zielzellen Mitose und Zelldifferenzierung (162). Rasch proliferierende Zellen sind anfälliger für spontane Replikationsfehler, die zur Akkumulation von Mutationen und zur malignen Transformation führen können (163). Die pleiotropen Effekte von Östrogen werden durch Östrogen-Rezeptoren (ER) vermittelt. Den ER wird schon lange eine Rolle in der Tumorgenese, als Biomarker und als therapeutische Zielstruktur – vor allem des östrogen-assoziierten Mammakarzinoms – zugeschrieben (164).

Doch nicht alle östrogenen Effekte können nur durch den klassischen ER-Signalweg erklärt werden (siehe Kapitel 1.2.4.1). Dies führte zu der Annahme, dass die Östrogenantwort über ein komplexes Netzwerk vermittelt wird, in das auch die ERR involviert sind (133). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der ERR zu den ER und ihren Interaktionen mit ER-Modulatoren wurde vermutet, dass die ERR ebenfalls an der Tumorgenese östrogen-assozierter Malignome beteiligt sind. Durch Koregulation und Konkurrenz um Bindestellen oder Koaktivatoren haben die ERR potentiell Wirkung auf die Expression von ER-Zielgenen, die in die Entstehung von Tumoren involviert sind (siehe Kapitel 1.2.4.1). Doch die funktionelle Überschneidung von ERR und ER ist weit weniger ausgeprägt als angenommen, was in einem Review von Deblois et al. anhand folgender Beobachtungen verdeutlicht wird (147):

1. Die ERR binden nicht an natürliche Östrogene oder Östrogenderivate.
2. Die ERR haben eigene spezifische Bindestellen (ERRE) und binden nur an ERE, wenn es in ein ERRE integriert ist.
3. ER und ERR besitzen unterschiedliche und teilweise selektive Affinität zu koregulatorischen Proteinen.
4. ER und ERR unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, das ihre jeweilige prädominante Rolle in reproduktiven bzw. metabolischen Geweben widerspiegelt.

Daraus folgt die Annahme, dass die ERR auch ER-unabhängige Funktionen in Krebsgeweben ausüben (147).

Warburg-Effekt: Regulation der Energieverfügbarkeit

Der Begriff „Warburg-Effekt“ beschreibt die bei vielen tumorösen Geschehen beobachteten charakteristischen Veränderungen im Glucosestoffwechsel der Zelle: Statt durch die Weiterverarbeitung des Glykolyse-Endprodukts Pyruvat im Citratzyklus und anschließende oxidative Phosphorylierung erfolgt die Energiegewinnung in Tumorzellen durch Glykolyse mit anschließender Entstehung von Laktat (165). Diese metabolische Umstellung dient dazu, den hohen Energiebedarf der Krebszellen zu decken und genügend biosynthetische Vorstufen zu generieren, um die Proliferation aufrechtzuerhalten (166). Da die Tumorzellen den nicht-oxidativen Glucosestoffwechsel trotz ausreichender Versorgung mit Sauerstoff bevorzugen, bezeichnet man dieses Verhalten auch als „paradoxe aerobe Glykolyse“ (165). ERR α und ERR γ regulieren gemeinsam mit den Koaktivatoren PGC-1 α und PGC-1 β die zelluläre Verfügbarkeit von Energie und die mitochondriale Biogenese. Außerdem steuern die ERR die Expression von Enzymen, die für die Glykolyse und oxidative Phosphorylierung zuständig sind - sowohl in normalen Zellen als auch in Krebszellen (109) (167). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die PGC-1/ERR-Achse auch in onkogenen Prozessen eine große Rolle spielt (101) (148) (149).

Ein erster Hinweis auf die Beteiligung der ERR am Warburg-Effekt ergab sich in einer Forschungsarbeit über *Drosophila melanogaster*: Es wurde beschrieben, dass das ERR-Ortholog dieser Fliegenart in deren Embryogenese einen metabolischen Wechsel triggert, der mit starkem Zellwachstum einhergeht (168). Dieses Phänomen ähnelt der metabolischen Umstellung in Krebszellen. Die Autoren bringen diese Beobachtung in Zusammenhang mit der Vermutung, dass die humanen ERR an der schnellen Proliferation von Krebszellen durch Induktion des Warburg-Effekts beteiligt sind (168).

In hepatozellulären Karzinomzellen wurde *in vitro* ein durch ERR α -vermittelter Wechsel vom oxidativen zum glykolytischen Stoffwechsel beobachtet, wenn der oxidative Weg das Energiebedürfnis des Tumors nicht mehr erfüllen kann (169). Während ERR α aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften also als potentieller Induktor des Warburg-Effekts gesehen werden kann (148), fördert ERR γ eher den oxidativen Metabolismus (170). Wird ERR γ durch miR-375* inhibiert, erfolgt eine metabolische Umstellung hin zum aeroben glykolytischen Phänotyp: Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wird reduziert, die Laktatproduktion und die Zellproliferation dagegen steigen (170). Im fetalen Herzen steuert ERR γ zudem den Übergang vom fetalen Kohlenhydratstoffwechsel zum postnatalen oxidativen Stoffwechsel (139).

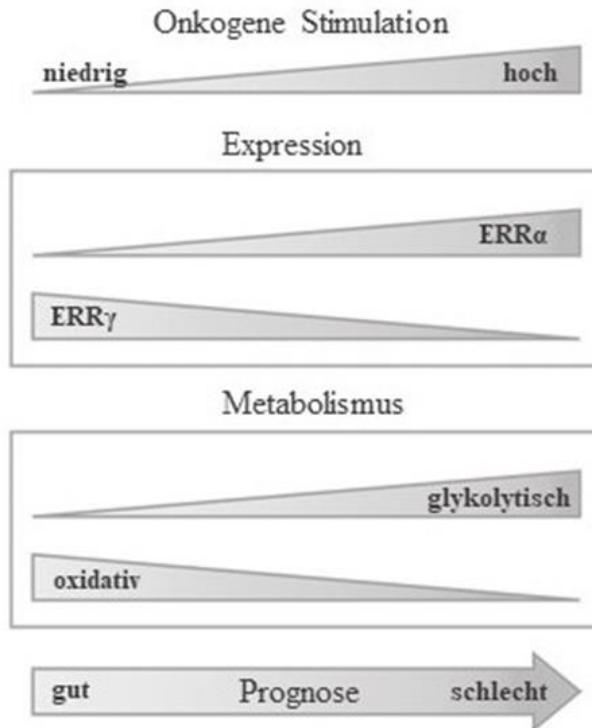


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Einflusses von $ERR\alpha$ und $ERR\gamma$ auf den Tumormetabolismus, modifiziert nach (148)

Die PCG-1/ERR-Achse der zellulären Energiehomöostase scheint eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zu spielen und kann je nach Zusammensetzung Proliferation und Wachstum fördern oder hemmen. Während $ERR\alpha$ den glykolytischen Stoffwechsel und damit die Tumorprogression stimuliert, fördert $ERR\gamma$ den oxidativen Metabolismus. $ERR\alpha$ und $ERR\gamma$ werden also gegensätzliche Rollen bei der Entstehung des Warburg Effekts zugeschrieben (siehe Abbildung 7). Diese Hypothese könnte die entgegengesetzte Korrelation zwischen Tumorprognose und $ERR\alpha$ bzw. $ERR\gamma$ -Expression im Mamma- und Ovarialkarzinom erklären (157) (159).

Die ERR haben allerdings nicht nur durch ihre Interaktion mit Östrogen-Signalwegen oder ihre Funktionen als Regulatoren des Metabolismus Einfluss auf die Tumorentstehung, sondern auch durch direkte Bindung an und Modulation von potentiell an der Karzinogenese beteiligten Genen (147) (149). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von $ERR\gamma$ auf verschiedene onkogene und tumorsuppressive Gene in den Blick genommen.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ovarialkarzinom gilt aufgrund seiner oftmals späten Diagnose im fortgeschrittenen Tumorstadium und seiner schnellen Resistenzentwicklung zur Standard-Chemotherapie als das tödlichste aller gynäkologischen Malignome. Daher werden neue Ansatzpunkte für eine frühere Diagnose und bessere Behandlung benötigt (171).

Der Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ , Gen: ESRRG), der sowohl im humanen Ovar als auch in Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird, zählt zu den „Orphan Nuclear Receptors“, einer Gruppe von Rezeptoren, denen bisher noch kein physiologischer Ligand zugeordnet werden konnte. Obwohl ERR γ viele strukturelle Ähnlichkeiten, gemeinsame Zielgene und Koregulatoren mit ER aufweist, zählen Östradiol und andere natürliche Östrogene nicht zu seinen Liganden. ERR γ ist stattdessen ein konstitutiv aktiver Rezeptor, der eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiemetabolismus einnimmt und auch in onkogene Prozesse involviert zu sein scheint (101) (136) (147). Sowohl im Mammakarzinom (157) als auch im Ovarialkarzinom gilt ERR γ als günstiger prognostischer Marker. Sun et al. berichteten von einer Überexpression von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen und einem damit assoziierten länger progressionsfreien Krankheitsverlauf (159).

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle von ERR γ im Ovarialkarzinom genauer zu untersuchen. Dabei soll sowohl der Einfluss dieses Rezeptors auf das Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinomzellen (OAW-42, OVCAR-3, SK-OV-3) ermittelt werden als auch die molekularen Mechanismen, die diese Effekte vermitteln. Um die Bedeutung von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen, wurde zunächst die ERR γ - bzw. ESRRG-Expression herabgesetzt (Knockdown). Dazu erfolgte eine Transfektion mit spezifischer siRNA, deren Erfolg auf mRNA-Ebene überprüft wurde. Nach Optimierung und Etablierung eines transienten Knockdowns wurden dessen Effekte auf die Proliferation der Zellen via Viabilitätsassay analysiert. Anschließend wurde die ERR γ -vermittelte Veränderung der Expression von potentiell an der Karzinogenese beteiligten Genen genauer in den Blick genommen. Anhand von Expressionsanalysen von Genen der Proliferation, Genen des programmierten Zelltods und epithelialen und mesenchymalen Markergenen via qPCR sollten die molekularen Mechanismen geklärt werden, die dem Einfluss von ERR γ auf Ovarialkarzinomzellen zugrunde liegen.

3 MATERIAL

Zelllinien

OAW-42	CLS-Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland)
NIH:OVCAR-3	American Type Culture Collection ATCC® (Manassas, VA, USA)
SK-OV-3	American Type Culture Collection ATCC® (Manassas, VA, USA)

Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamine Solution	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS-Puffer)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Accutase® Solution	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Insulin Solution human	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, Gewebekulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Gewebekulturplatten (6-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Transfektion

SASI_Hs01_00241628 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-CAU UGG AUG GGC GAA GCA U-3'	(St. Louis, MO, USA)
SASI_Hs01_00241629 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-CUA UCC UGC AGC UGG UAA A-3'	(St. Louis, MO, USA)
SASI_Hs01_00241630 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-GUG ACA UCG CUU CUG GGU A-3'	(St. Louis, MO, USA)
SASI_Hs01_00241631 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-CGU AAA UCC UGC CAG GCU U-3'	(St. Louis, MO, USA)
SASI_Hs01_00241632 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-GAA GUA CAA GCG CAG GAU A-3'	(St. Louis, MO, USA)
SASI_Hs01_00241633 siRNA	Sigma-Aldrich®
5'-GUC GUA UAC CGG UCU CUU U-3'	(St. Louis, MO, USA)

Silencer® Negative Control #1 siRNA	Ambion® by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Green Fluorescent Protein Plasmid	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco® by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TransFectin™ Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
siLentFect™ Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Wasser, Bio-Science Grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

RNA-Isolierung

RNeasy® Micro Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Reverse Transkription

Affinity Script Multi Temperature cDNA Synthese Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
--	--

Real-time quantitative PCR

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH (Rotkreuz, Schweiz)
LightCycler® Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH (Rotkreuz, Schweiz)
Primer β-Actin 1 5'-CTT CCT TCC TGG GCA TGG AGT-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer β-Actin 2 5'-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA TCT TC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer ESRRG1 5'-ATG CTC AAC TCG ATG CCC AA-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer ESRRG2 5'-AGA CGC ACC CCT TCT TTC AG-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYC1 (Cyclin D1) 5'-CTG GAG GTC TGC GAG GAA-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer CYC2 (Cyclin D1) 5'-GGG GAT GGT CTC CTT CAT CT-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)

Primer CYCE1 (Cyclin E2) 5'-GGA ACC ACA GAT GAG GTC CAT-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYCE2 (Cyclin E2) 5'-AGA TTT CCT CAA GTT TGG AAG CA-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CDK-1 (CDK2) 5'-TCC TCT TCC CCT CAT CAA GA-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer CDK-2 (CDK2) 5'-CAG GGA CAA AAG CTC TG-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer WAF1 (p21 ^{CIP1/WAF1}) 5'-GCA TGA CAG ATT TCT ACC ACT CC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer WAF2 (p21 ^{CIP1/WAF1}) 5'-AAG ATG TAG AGC GGG CCT TT-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYCA1 (Cyclin A2) 5'-CTG CTG CTA TGC TGT TAG CC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer CYCA2 (Cyclin A2) 5'-TGT TGG AGC AGC TAA GTC AAA A-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer Ki-67_for 5'-CAG TTC CAC AAA TCC AAC ACA-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer Ki-67_rev 5'-CTT TCA TTT TCA TAC CTG AAG GAA-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer Bcl2_for 5'-GGA GGC TGG GAT GCC TTT-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer Bcl2_rev 5'-CCA GGG TGA TGC AAG CTC-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer BAX1 5'-ATG GAG CTG CAG AGG ATG ATT GCC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer BAX2 5'-GGC CCC AGT TGA AGT TGC CGT-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer BAK A 5'-TGC AAC CTA GCA GCA CCA TGG GG-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer BAK B 5'-GGC ATT CTC TGC CGT GGG CT-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer XIAP1 5'-CTA GAA GAA TTG ATG ATA CCA TCT TCC AA-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer XIAP2 5'-AAT GTC CTT GAA ACT GAA CCC CAT T-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer AIFM1_for 5'-CAT CTG GGT GGC AGG AGA T-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer AIFM1rev 5'-TAC GGC TTA GCA GCT CCA GT-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer CASP1_A_for 5'-CAC TGC TTC GGA CAT GAC TA-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer CASP1_A_rev 5'-TTC TTC CCA CAA ATG CCT TC-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer E-Cadherin_for 5'-GCC ACA TAC ACT CTC TTC TCT CAC-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)
Primer E-Cadherin_rev 5'-AGC ACC TTC CAT GAC AGA CC-3'	metabion international AG (Planegg, Deutschland)

Primer Sciillin-for 5'-CGA GCA GAA GAA GTG AAG ACC T-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer Sciillin-rev 5'-ATT ATC AAG GCT CTG GCC CC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer MUCL1_fw (Mucin-1) 5'-GGT CCT GCT GAT GAA GCC C-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer MUCL1_rev (Mucin-1) 5'-CGG GAG ATC CCC AAC CCA TTT G-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer NCADH_for (N-Cadherin) 5'-AGG CTT CTG GTG AAA TCG CA-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Primer NCADH-rev (N-Cadherin) 5'-TGC AGT TGC TAA ACT TCA CAT TG-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

Proliferationsassay

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Promega Corporation
(Madison, WI, USA)

Pipettierzubehör

Aspirationspipette	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettierhilfe accu-jet®	Brand GmbH + Co KG (Wertheim, Deutschland)
Manuelle Mikropipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Messpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen Biosphere® Filtertip (20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen Biosphere® Quality Tips 1250 µl extra long	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen Combitips® advanced (1,0 ml und 5,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)
CELLSTAR® Polypropylen-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)

Geräte

Sterilbank HERAsafe

Heraeus Holding GmbH
(Hanau, Deutschland)

CO₂-Inkubator HERACell 150

Heraeus Holding GmbH
(Hanau, Deutschland)

Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)
Wasserbad	VWR International GmbH (Radnor, PA, USA)
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Thermocycler T Gradient 96	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
LightCycler® 2.0 PCR Device	Roche Diagnostics GmbH (Rotkreuz, Schweiz)
UV-Photometer GeneRay	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Wallac Victor3™ 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)

4 THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND METHODEN

4.1 Zellkultivierung und -präparation

4.1.1 Zellkultur

Alle drei Ovarialkarzinom-Zelllinien (OAW-42, OVCAR-3, SK-OV-3) wurden in Zell-Kulturflaschen T75 (75 cm²) bzw. 6- oder 96-Well-Platten kultiviert und im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂-Gehalt und 20 % O₂-Gehalt bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Nährstoffquelle diente das Medium „Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham“ unter Zusatz von 10 % FBS und 6,25 ml L-Glutamin (200 mM) pro 500 ml Medium, das alle 2 - 3 Tage gewechselt wurde, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden.

Zur Zellernte und Aussaat wurden bei 80- bis 100-prozentiger Konfluenz des adhärenten Zellrasens nach Absaugen des Kulturmediums und Spülung mit PBS-Puffer 4 ml des proteolytisch und kollagenolytisch wirkenden Enzyms Accutase in die Zellkulturflasche T75 zugegeben (bei 6-Well-Platten entsprechend nur 1 ml), um die Zellen von deren Boden zu lösen. Zur Optimierung der enzymatischen Aktivität wurden die Flaschen anschließend für 10 - 15 min bei 37° C inkubiert. Sobald die Zellverbände bei der mikroskopischen Kontrolle als Zell-Accutase-Suspension vorlagen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 ml des FBS-haltigen Kulturmediums (bei 6-Well-Platten 3 ml) gestoppt. Es folgte eine Überführung in ein 50 ml-Polypropylen-Röhrchen (bei 6-Well-Platten in ein 15 ml-Polypropylen-Röhrchen) und Zentrifugation bei 125 g für 5 min. Nach Verwerfen des Überstands und Resuspension des entstandenen Zellpellets in frischem Medium konnte die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt werden (für weitere Versuchsansätze mit definierter Zellzahl).

4.1.2 Transfektion mit spezifischer siRNA

4.1.2.1 Theoretische Grundlagen der Transfektion

Unter dem Begriff Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryontische Zellen (172). Dafür wurden zahlreiche verschiedene chemische, biologische und physikalische Methoden entwickelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transfektion mithilfe spezifischer siRNA. Diese Technik beruht auf dem Mechanismus der sogenannten RNA-Interferenz.

RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet einen evolutionär hoch konservierten Prozess des posttranskriptionellen Gen-Silencings in Eukaryoten. Intrazelluläre doppelsträngige RNA (dsRNA) löst dabei den sequenzspezifischen Abbau dazu komplementärer mRNA aus, so dass die Translation inhibiert wird (173). Da dsRNA häufig als Intermediat bei der Replikation von pathogenen Viren produziert wird und nicht durch die als Wirt dienende Zelle selbst, wird angenommen, dass die RNAi das Genom vor der Integration unerwünschter Erbinformation schützt, um Virusinfektionen abzuwehren. Außerdem sorgt die RNAi für Transposon-Silencing und Regulation der Genexpression (174). Beobachtet wurde das Phänomen der RNAi erstmals von Napoli et al. 1990: Als ein für ein Pigment codierendes Gen in die Pflanzenzellen von Petunien eingeschleust wurde, kam es nicht wie erwartet zu einer Intensitätszunahme des Farbtons der Blütenblätter, sondern zu einem fleckigen bis weißen Phänotyp. Das exogen eingeführte Transgen und das homologe endogene Gen hatten sich gegenseitig ausgeschaltet (175).

In Abbildung 8 ist die grobe Struktur des molekularbiologischen Mechanismus der RNAi dargestellt, die im Folgenden beschrieben wird: Durch die zelluläre Doppelstrang-spezifische Ribonuclease Dicer wird die lange dsRNA in kürzere 21 bis 25 Basenpaar-lange Ribonucleotide degradiert, die an ihren 3'-Enden einen charakteristischen Überhang von 2 Nucleotiden und eine 5'-Phosphorylierung aufweisen (176) (177). Diese kurzen RNA-Fragmente werden als „Small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet (178). Im nächsten Schritt lagert sich die siRNA mit verschiedenen Proteinen zu einem Riboproteinkomplex, dem sogenannten RISC-Komplex (RNA-Induced Silencing Complex), zusammen (179). Durch seine ATP-abhängige Helikase-Aktivität entwindet der RISC die siRNA-Duplex und entfernt schließlich den am 5'-Ende thermodynamisch stabileren Strang der beiden RNA-Stränge („passenger strand“, meist der sense-Strang) (180) (181). Der übrig gebliebene Führungsstrang

(„guide strand“, antisense-Strang) im nun aktivierten RISC hybridisiert schließlich sequenzspezifisch an die komplementäre endogene Ziel-mRNA. Dadurch wird deren Abbau durch die Nuklease-Aktivität des RISC eingeleitet (179).

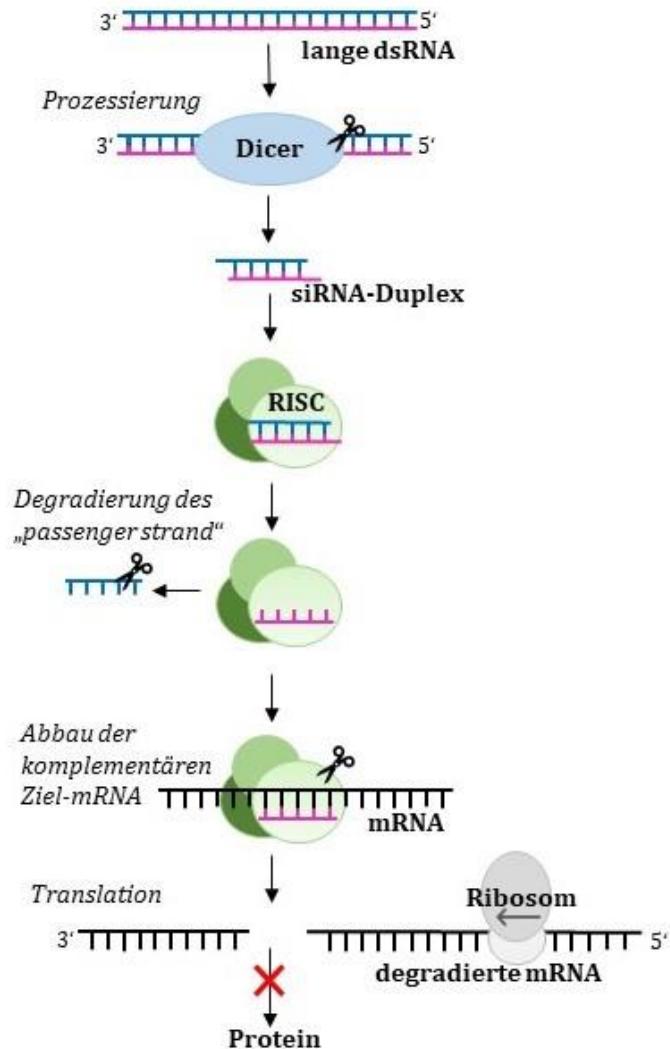


Abbildung 8: Mechanismus der RNA-Interferenz, modifiziert nach (182)

Durch Fire et al. fand die RNAi 1998 erstmals Anwendung in der funktionellen Genanalyse, als bei Experimenten mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* dsRNA zur sequenzspezifischen Degradation von zellulärer komplementärer mRNA eingesetzt werden konnte (173). Das direkte Einschleusen von > 30 bp langer dsRNA führt in tierischen Zellen allerdings oft zu einer Immunantwort durch Interferone (183). Dadurch wird die zelluläre mRNA unspezifisch abgebaut, es kommt zu einer globalen Inhibition der Proteinsynthese und schließlich zur Apoptose der Zelle (184) (185) (186). Um dies zu vermeiden, wurde von Elbashir et al. 2001 erstmals die endogene Prozessierung durch Dicer experimentell umgangen, indem direkt synthetische siRNA mit 21 Basenpaaren appliziert wurde, die das natürliche Produkt der

Spaltung durch Dicer imitierte. So konnte die RNA-Interferenz effizient und ohne Immunantwort induziert werden (187). Die spezifische Reduktion der Gen- und dadurch Proteinexpression durch synthetische siRNAs wird als Gen-Knockdown bezeichnet und gehört mittlerweile zum experimentellen Standard bei der Analyse von Genen bzw. Genprodukten.

Lipofektion

Um exogene Nukleinsäure effektiv in kultivierte Zellen einbringen zu können, entwickelten Felgner et al. 1987 die Technik der Lipofektion (188). Dabei werden kationische Liposomenbildende Lipide eingesetzt. Die negativ geladene einzuschleusende DNA oder RNA bindet an die Oberfläche dieser Liposomen. Bei Inkubation dieser Lipid-Nukleinsäure-Komplexe mit den zu transfizierenden Zellen kommt es aufgrund der Positivität der Liposomen zu einer Adhäsion und Fusion mit der negativ geladenen Zellmembran. So kann die Nukleinsäure durch Endozytose ins Innere der Zelle aufgenommen werden. Von den vielen mittlerweile kommerziell erhältlichen kationischen lipidbasierten Transfektionsreagenzien wurde für die vorliegende Arbeit hauptsächlich das Transfektionsreagenz TransFectin Lipid Reagent von Bio-Rad Laboratories eingesetzt, das aus einer kationischen Verbindung und einem Co-Lipid (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin) besteht.

GFP-Transfektion

Um zu überprüfen, ob die Zellen den Komplex aus Fremd-Nukleinsäure und Transfektionsreagenz erfolgreich aufnahmen und das entsprechende Genprodukt exprimierten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das sogenannte „Green Fluorescent Protein“ (GFP) als visueller Marker eingesetzt. Dieses Protein wurde erstmals in den 1960er Jahren aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert (189). Wird GFP in einer Zelle kodiert, erzeugt diese ein bei Anregung mit blauem Licht grün fluoreszierendes Produkt (190). Dieses Phänomen kann unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise ist es möglich, den Erfolg einer Transfektion visuell zu kontrollieren.

4.1.2.2 SiRNA-Design

Heutzutage werden viele siRNAs mit spezifischen Zielgenen chemisch synthetisiert und sind kommerziell erhältlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sechs verschiedene siRNAs für ESRRG (Gen kodierend für $ERR\gamma$) von der Firma Sigma-Aldrich in Kombination eingesetzt, um die Effizienz der RNAi zu erhöhen (siehe Tabelle 6).

Außerdem ist eine Negativkontrolle nötig, eine sogenannte cosiRNA (Kontroll-siRNA). Dabei handelt es sich um eine siRNA ohne signifikante Homologie zu irgendeiner Stelle im Genom

des Organismus. Durch das Transfizieren dieser nicht-kodierenden Kontrolle wird der Einfluss des Transfektionsreagens auf die Genexpression normalisiert. Als cosiRNA wurde die Silencer® Negative Control #1 siRNA von Ambion® by Thermo Fisher Scientific verwendet. Alle siRNAs wurden in RNase freiem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 5 µM eingestellt.

siRNA	Sequenz 5'→3'
SASI_Hs01_00241628	CAUUGGAUGGGCGAAGCAU
SASI_Hs01_00241629	CAUUGGAUGGGCGAAGCAU
SASI_Hs01_00241630	GUGACAUCAUCGUUCUGGGUA
SASI_Hs01_00241631	CGUAAAUCUCUGGCCAGGCUU
SASI_Hs01_00241632	GAAGUACAAGCGCAGGAUA
SASI_Hs01_00241633	GUCGUAUACCGGUCUCUUU

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs für ESRRG

4.1.2.3 Durchführung der Transfektion

Um den Knockdown des ESRRG-Gens zu etablieren, wurden verschiedene Parameter der Transfektion mit ESRRG-siRNA variiert und optimiert:

- a)** Veränderung der Konzentrationen von siRNA und Transfektionsreagenz
- b)** Variation der eingesetzten Zellzahl
- c)** Einsatz verschiedener Transfektionsreagenzien
(TransFectin™ Lipid Reagent und siLentFect™ Lipid Reagent von Bio-Rad Laboratories, Lipofectamine™ RNAiMAX von Thermo Fisher Scientific)
- d)** Einsatz unterschiedlicher Zelllinien (OVCAR-3, OAW-42, SK-OV-3)

Mit dem im Folgenden beschriebenen Transfektionsexperiment konnte der effizienteste Knockdown verifiziert werden. Dabei wurde die Zelllinie OVCAR-3 mit Hilfe von TransFectin transfiziert.

1. Vorbereitung der Zellen

24 h vor Transfektion wurden 500.000 Zellen der Zelllinie OVCAR-3 pro 6-Well ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 70 % konfluent waren. Bis zur Transfektion wurden die Zellen bei 37° C inkubiert.

2. Bildung der siRNA-Trans-Fectin-Komplexe

Sowohl die siRNA und die cosiRNA als auch das Transfektionsreagenz wurden mit dem serumfreien Medium Opti-MEM auf ein Endvolumen von je 150 µl verdünnt. Von

TransFectin wurden dabei je 10 µl verwendet, von den sechs siRNAs je 3 bzw. 6 µl und von der cosiRNA 18 bzw. 36 µl (für 10 bzw. 20 nM-Endansatz). Je ein Ansatz mit RNA wurde durch mehrfaches Pipettieren mit einem Ansatz TransFectin vereinigt und gut gemischt. Um die Zusammenlagerung der RNA mit den Lipiden zu ermöglichen, wurde das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Transfektion der Zellen

Unmittelbar vor Zugabe der RNA-Lipid-Suspension wurde das Medium der Zellen abgesaugt und gegen 1200 µl frisches Medium ausgetauscht. Die Suspension mit den siRNA-TransFectin-Komplexen wurde tropfenweise zu den Zellen im frisch gewechselten Medium pipettiert. Dabei wurde die 6-Well-Platte kontinuierlich geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Die finale siRNA-Konzentration betrug 10 bzw. 20 nM.

Bei jeder Transfektion wurde als Kontrolle ein 6-Well der OVCAR-3-Zellen mit einem Komplex aus GFP-Plasmid (1µl GFP, entsprechend 1 µg GFP) und TransFectin entsprechend dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll transfiziert. Nach 24 h und nach 72 h wurden die erfolgreich mit GFP-transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen wurde in Relation zur Gesamt-Zellzahl gesetzt. Die Darstellung der Effektivität der GFP-Transfektion erfolgte als prozentualer Wert. Auf diese Weise konnte der Erfolg der Lipofektion mit TransFectin visualisiert und überprüft werden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung

4.2.1.1 Theoretische Grundlagen der RNA-Isolierung

Um die reine RNA aus den transfizierten Zellen für die weiteren Versuche zu erhalten, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy® Micro Kits von Qiagen extrahiert und gereinigt. Diese Methode basiert auf der Mikrosäulen-Zentrifugationstechnologie und der reversiblen Adsorption von RNA an Silikamatrix (191). Bis zu 45 µg RNA > 200 Basen können an die Silikagel-Membran der RNeasy MinElute Spin Column des Kits binden (191).

Zuerst muss allerdings die gesamte RNA aus den Zellen freigesetzt werden. Dazu ist die Lyse der Zellmembran und Zellorganellen notwendig. Hierfür wird die chaotrope Verbindung Guanidin-thiocyanat verwendet, die durch ihre stark denaturierende Wirkung die Zellen lysiert und gleichzeitig eine RNA-Degradation durch Inaktivierung zellulärer RNAsen verhindert (192). Anschließend muss die Probe gereinigt werden. Zu diesem Zweck erfolgen nach Auftragen der Suspension auf eine Säule mehrere Zentrifugations-schritte unter Zugabe von Waschpuffer-Lösungen zur Reinigung der RNA von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen. Für die Hydrolyse kontaminierender DNA wird DNase I zugegeben. Abschließend kann die RNA von der Silikagel-Membran der Säule eluiert werden. Die verschiedenen Schritte der RNA-Isolierung sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt.



Abbildung 9: RNA-Isolierung
modifiziert nach (191)

4.2.1.2 Durchführung der RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben (191) mit den mitgelieferten Puffern und an einem ausgewiesenen RNA-Arbeitsplatz unter Benutzung von sterilem bzw. RNase- und DNase-freiem Einmalmaterial. Nach Absaugen des Mediums wurde der Guanidinthiocyanat-haltige mitgelieferte RLT-Puffer des Kits direkt zu den transfizierten Zellen ins Zellkulturgefäß (6-Well-Platte) gegeben. Um die RNase-Inaktivierung zu optimieren, wurde dem RLT-Puffer zusätzlich β-Mercaptoethanol zugefügt (10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml Puffer). Das

durch die denaturierende Wirkung des RLT-Puffers entstandene Zellysat wurde bis zur eigentlichen RNA-Extraktion bei - 80° C gelagert.

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte zur RNA-Isolierung und -Aufreinigung beschrieben:

1. Nach Homogenisieren der Zellsuspension in einem Eppendorf-Cup wurden 350 µl 70-prozentiges Ethanol zugegeben, mit dem Vortexer gemischt und die Mischung auf die MinElute Spin Column überführt, die sich in einem 2 ml-Collection-Tube befand. Für 15 s wurde bei $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In diesem Schritt wurde die RNA an die Silikagel-Membran gebunden.
2. Im nachfolgenden Wasch-Schritt wurden 350 µl RW-1-Puffer zugegeben und die Säule für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
3. Zur Eliminierung von DNA-Verunreinigungen wurden 80 µl DNase I/RDD-Puffer-Mix (10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule gegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.
4. Nach erneuter Zugabe von 350 µl RW-1-Puffer und Zentrifugation für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) wurde das Collection Tube verworfen und gegen ein neues ersetzt.
5. Anschließend wurden 500 µl des RPE-Waschpuffers auf die Säule gegeben, erneut für 15 s bei $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
6. Für den letzten Wasch-Schritt wurden 500 µl 80-prozentiges Ethanol zugegeben und 2 min bei $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde das Collection Tube gewechselt.
7. Zum Trocknen der Membran und zur vollständigen Elimination des Ethanols wurden die Säulen bei geöffneten Deckeln erneut für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit $\geq 8000 \times g$ (13.000 rpm) zentrifugiert.
8. Die Säule wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups hineingesetzt, 25 µl RNase freies H₂O zugegeben und zum Eluieren der RNA für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit $\geq 8000 \times g$ (10.000 rpm) zentrifugiert.
9. Die sich nun in den Eppendorf-Cups befindende reine RNA wurde sofort auf Eis gekühlt bzw. bis zur weiteren Analyse bei - 80° C gelagert.

4.2.1.3 Quantitative und qualitative Analyse der isolierten RNA

Sowohl die Menge als auch die Reinheit der isolierten RNA lässt sich mittels UV-Spektralphotometrie bestimmen. Da das Absorptionsmaximum der Basen von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260$ nm liegt, wird die Extinktion der RNA-Lösung in einer Quarzküvette bei dieser Wellenlänge gemessen (193). Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reiner ssRNA (193). Die RNA-Konzentration der Probe ergibt sich aus der Formel (193) :

$$c \text{ (Konzentration in } \mu\text{g/ml)} = OD_{260\text{nm}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der isolierten RNA kann aus dem Quotienten der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm ($OD_{260\text{nm}}$) und bei $\lambda = 280$ nm ($OD_{280\text{nm}}$, Absorptionsmaximum von Aminosäuren) ermittelt werden (193). Bei hochreiner RNA sollte das Verhältnis bei 2,0 liegen; ein niedrigerer Wert des Quotienten $OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}}$ weist auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, ein höherer Wert auf eine Kontamination mit DNA (193). In der folgenden Arbeit wurde das UV-Photometer GeneRay von der Firma Biometra verwendet. Alle Messungen erfolgten nach Eichung des Photometrie-Geräts mit reinem H_2O .

4.2.2 Reverse Transkription

4.2.2.1 Theoretische Grundlagen der reversen Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die ausgehend von einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang synthetisieren kann, wurde 1970 von Baltimore (194) und Temin (195) unabhängig voneinander in Retroviren entdeckt. Heutzutage werden gentechnisch veränderte Varianten dieses Enzyms dazu verwendet, RNA in DNA (cDNA) umzuschreiben. Zusätzlich zur Reversen Transkriptase werden zur unspezifischen cDNA-Synthese ausgehend von einer RNA-Isolation außerdem sogenannte Random-Primer benötigt. Das sind Oligonukleotide mit zufälliger Nukleotid-Anordnung, die an den RNA-Strang hybridisieren und an ihrem freien 3'OH-Ende komplementär zur Matrize durch die Reverse Transkriptase verlängert werden. So entsteht ein RNA-DNA-Hybridstrang, der im Folgenden hydrolysiert werden kann, so dass – wenn gewünscht – eine DNA-Doppelstrang-Synthese möglich ist. Im Falle dieser Arbeit mit sich an die reverse Transkription anschließender PCR war eine sogenannte „first strand“ cDNA-Synthese (DNA-Einzelstrang) ausreichend.

4.2.2.2 Durchführung der reversen Transkription

Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthese Kit von Agilent Technologies nach Herstellerangaben verwendet (196). Im ersten Schritt wurden je 1 µg der isolierten RNA, 1,5 µl Nonamer-Random Primer (100 ng/µl) und RNase-freies Wasser zu einem Endvolumen von 6,5 µl gemischt, bei 65° C zur Denaturierung der intra- und intermolekularen RNA-Sekundärstruktur für 5 min inkubiert und dann für 10 min bei 4° C gekühlt, um die Bindung der Primer an die entsprechenden Sequenzen der RNA zu ermöglichen. Erst nach Abkühlen der Probe wurden anschließend 2 µl des Mastermix zugegeben, der aus den folgenden Reagenzien bestand:

- 1 µl 10 × AffinityScript RT Buffer
- 0,4 µl dNTP mix (25 mM je dNTP)
- 0,2 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/ml)
- 0,4 µl AffinityScript Multiple Temperature RT Note

Es erfolgte eine Inkubation bei 25° C für 10 min zur Verlängerung der Primer, anschließend für 60 min bei 48° C zur cDNA-Synthese und zuletzt bei 70° C für 15 min zur Inaktivierung der Enzyme. Die so entstandene cDNA wurde fortlaufend bei 4° C gekühlt, im Verhältnis 1 : 5 mit H₂O verdünnt und bei - 20° C gelagert.

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt, zu dem anstelle des Enzyms H₂O zugegeben wurde. Diese Kontroll-Probe sollte bei der sich anschließenden PCR kein Produkt liefern, da auch durch den DNase-Verdau bei der RNA-Isolation davon auszugehen war, dass die Proben keine genomische DNA mehr enthielten.

4.2.3 Real-time quantitative PCR (qPCR)

4.2.3.1 Theoretische Grundlagen der qPCR

Die Grundlage für die Real-time quantitative PCR bildet die konventionelle PCR (Polymerase-Kettenreaktion). 1986 wurde diese Methode von K. Mullis entwickelt, um spezifische DNA-Zielsequenzen in vitro amplifizieren zu können (197). Diese Standard-PCR besteht aus drei verschiedenen Phasen: Zuerst erfolgt bei ca. 90° C die thermische Denaturierung der zu amplifizierenden Doppelstrang-DNA. So können anschließend synthetisch hergestellte gegenläufig orientierte spezifische Oligonukleotid-Primerpaare an die komplementären Sequenzen der nun einzelsträngig vorliegenden DNA hybridisieren. Dieses sogenannte Annealing findet bevorzugt bei > 50° C statt und ist abhängig von den eingesetzten Primern. Im letzten Schritt bei ca. 72° C kann gezielt der zwischen den Primern liegende Sequenz-

abschnitt vom 3'OH-Ende aus als neuer Doppelstrang durch eine bei dieser Temperatur aktive und hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert werden (Elongation). Die einzelnen Reaktionsschritte werden zyklisch wiederholt. Da auch die neu entstehenden DNA-Stränge als Matrize dienen, kann der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert werden (198).

Allerdings verändert sich die Kinetik der PCR im Verlauf: Aufgrund der Akkumulation von Endprodukten, des zunehmenden Verbrauchs von Primern, dNTPs und Polymerase und der Entstehung unerwünschter Nebenprodukte kommt es in den letzten Zyklen zu einer Reduktion der PCR-Effizienz. Die Transkript-Produktion verläuft nicht mehr exponentiell, sondern nähert sich schließlich einem Plateau (199) (200) (201). Die Menge des insgesamt entstandenen Amplifikats, das am Ende der PCR vorliegt, lässt also keine Rückschlüsse auf die Menge der eingesetzten Nukleinsäure zu.

Um die Quantifizierung der Nukleinsäure in der Probe zu ermöglichen, werden DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und die Entstehung der Transkripte durch Kombination eines Thermocyclers mit einem Fluorometer kinetisch überwacht. So kann die exponentielle Phase der PCR, während der die Menge des Amplifikats mit der Menge der eingesetzten Nukleinsäure korreliert, in Echtzeit verfolgt werden. Diese Modifikation der PCR wurde erstmals von Higuchi et al. 1992 beschrieben: Dabei wurde der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet (202). Heutzutage gängiger bei der Real-time quantitativen PCR (auch als qPCR bezeichnet) ist der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Er bindet unspezifisch an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA und erzeugt dadurch ein Fluoreszenzsignal. Während der Amplifikation wird am Ende jedes einzelnen Reaktionszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals steht in der exponentiellen Phase in direkt proportionalem Zusammenhang zur Anzahl der entstandenen PCR-Produkte (203). So kann nicht nur auf die Menge der korrespondierenden eingesetzten DNA bzw. cDNA geschlossen werden, sondern es können auch – bei vorangeschalteter reverser Transkription – Veränderungen auf mRNA-Ebene und damit Veränderungen der Genexpression bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen detektiert werden.

4.2.3.2 $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wird häufig die sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen angewendet (204). Grundlage dieser Berechnungen bildet der C_T -Wert (Cycle Threshold), der dem PCR-Zyklus innerhalb der exponentiellen PCR-Phase entspricht, bei dem das Fluoreszenzsignal der Probe die Hintergrundfluoreszenz bzw. die Menge der amplifizierten PCR-Produkte einen definierten Schwellenwert signifikant überschreitet.

Je mehr Nukleinsäure vor der Amplifikation vorliegt, desto mehr Kopien entstehen in den Polymerisierungszyklen, desto früher übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert und desto niedriger ist der C_T -Wert.

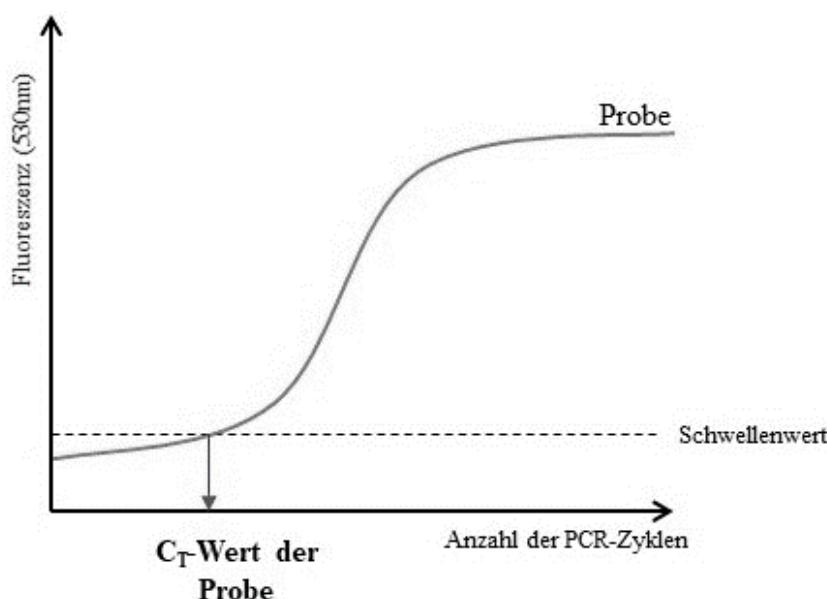


Abbildung 10: Mathematische Grundlage der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, modifiziert nach (201)

Die Anzahl der PCR-Zyklen und die dabei messbare Fluoreszenz sind gegeneinander aufgetragen. Der C_T -Wert lässt sich auf der Rechtswert-Achse ablesen.

Um verschiedene Proben anhand der C_T -Werte miteinander vergleichen zu können, müssen individuelle Probeneffekte wie unterschiedliche Effizienzen der RNA-Extraktion oder der reversen Transkription normalisiert werden. Diese Normalisierung kann durch Einbeziehung eines endogenen Referenzgens erreicht werden (199). Dafür wird ein sogenanntes Housekeeping-Gen (z. B. β -Actin) verwendet, dessen konstitutive Expression unabhängig von äußeren regulatorischen Einflüssen möglichst konstant ist. Der C_T -Wert (und damit die Expression des Zielgens) wird auf die Expression des Referenzgens in derselben Probe bezogen:

$$\Delta C_T = C_T\text{-Wert Zielgen} - C_T\text{-Wert Referenzgen}$$

Anschließend kann der normalisierte ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Probe mit dem ebenfalls normalisierten ΔC_T -Wert der Kontrollprobe (nicht verändert in Bezug auf das Zielgen) verglichen werden.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \text{Wert Behandlung} - \Delta C_T - \text{Wert Kontrolle}$$

Das Verhältnis von Ziel- zu Referenzgen in der Kontrollprobe ist stabil, in der behandelten Probe variiert es. Schließlich ergibt sich der relative Expressionsunterschied zwischen der Probe des experimentell veränderten Zielgens und der Kontrollprobe normalisiert zu einem Referenzgen aus der arithmetischen Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_T}$$

Dabei werden optimale und identische PCR-Effizienzen aller Proben vorausgesetzt. Zur besseren Veranschaulichung und Ermöglichung einer prozentualen Darstellung des Knock-downs wurden die Ratio-Werte abschließend mit dem Wert 100 multipliziert.

4.2.3.3 Schmelzkurvenanalyse

Da der Farbstoff SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, besteht die Möglichkeit, dass auch unerwünschte PCR-Nebenprodukte oder Primer-Dimere durch Anlagerung des Farbstoffs zu Fluoreszenzsignalen führen und dadurch die Messungen verfälschen (203).

Um die Spezifität der PCR-Reaktion bestimmen zu können und gegebenenfalls unspezifische Amplifikate zu identifizieren, wird die gesamte entstandene doppelsträngige DNA nach Beendigung der PCR-Zyklen kontinuierlich bis auf 95° C unter fortlaufender Fluoreszenzmessung erhitzt. Sobald sich die dsDNA in Einzelstränge auftrennt, wird der zuvor gebundene Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und eine sprunghafte Fluoreszenzabnahme kann detektiert werden. Dies geschieht, wenn eine spezifische Schmelztemperatur, die von Länge und Basenpaarung der dsDNA abhängig ist, erreicht wird. Durch die Software des LightCyclers wird eine Schmelzkurve erstellt, bei der die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur aufgetragen wird (siehe Abbildung 11). Diese Kurve sollte insgesamt nur einen Peak bei der für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur besitzen. Weitere Peaks bei meist niedrigeren Temperaturen sind unspezifischen kürzeren PCR-Nebenprodukten zuzuordnen und sprechen für eine geringere Spezifität der Amplifikation (203) (205) (206).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Verwendung sehr spezifisch bindender Primer eine spezifische Amplifikation ohne unerwünschte Nebenprodukte gewährleistet werden. Ein Beispiel der bei qPCR im Kontext dieser Arbeit entstandenen Schmelzkurven zeigt Abbildung 11.

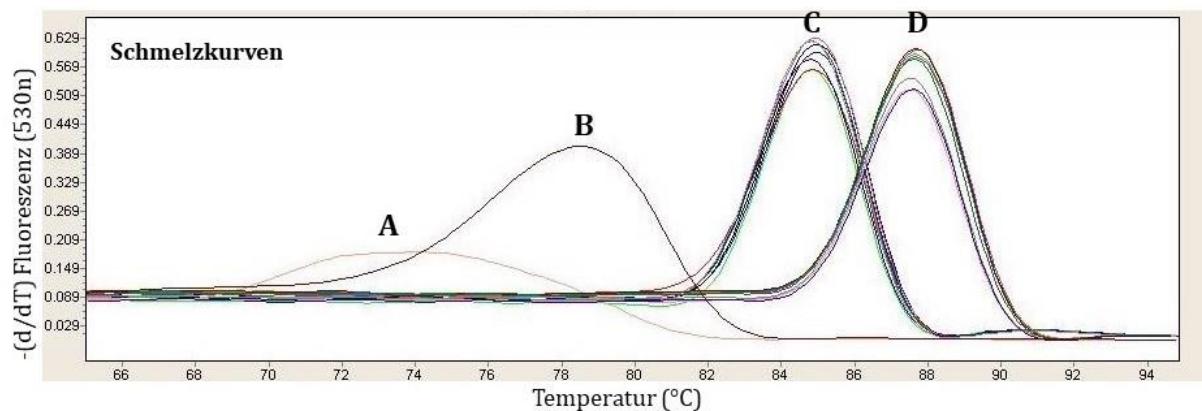


Abbildung 11: Darstellung der Schmelzkurven einer qPCR durch das bei dieser Arbeit verwendete Gerät „LightCycler® 2.0 PCR Device“

Die Kurven A und B bilden die Schmelzkurven der beiden Wasser-Negativkontrollen ab. C entspricht der Schmelzkurve der ESRRG-Amplifikate, während D die Schmelzkurve des Referenzgens β -Actin darstellt.

4.2.3.4 Durchführung der qPCR

Die qPCR wurde mit dem LightCycler® 2.0 PCR Device und dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche Diagnostics durchgeführt. Dazu wurden 4 μ l der zuvor hergestellten cDNA mit 6 μ l des vorgelegten Mastermix gemischt. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

- 3,4 μ l RNase freies Wasser
- 0,6 μ l MgCL Stock Solution
- 0,5 μ l 10 μ M Primer: je zwei gegenläufige Primer
(zu untersuchendes Gen bzw. β -Actin)
- 1 μ l Fast Start DNAMaster SYBR-Green

Als Referenz-Gen diente β -Actin, sodass jede cDNA-Probe in einem Ansatz mit Primern des zu untersuchenden Gens und in einem zweiten Ansatz mit β -Actin-Primern hybridisiert wurde. Außerdem wurde jedem PCR-Durchlauf eine Negativkontrolle ohne cDNA (6 μ l Mastermix + 4 μ l H₂O) beigefügt, um Verunreinigungen des Mastermix zu detektieren bzw. ausschließen zu können. Die Reaktionsgefäß (Glaskapillaren) wurden schließlich in den Block des Thermocyclers überführt und das Programm gestartet. Nach einer 15-minütigen Startschmelze bei 95° C folgten 40 Amplifikationszyklen nach folgendem Schema:

1. 95° C für 15 s (Denaturierung)
2. 57° C für 10 s (Annealing)
3. 72° C für 15 s (Elongation)

Nach dem letzten PCR-Zyklus fand eine kontinuierliche Temperaturerhöhung über 15 min bis auf 95° C statt. Eine Schmelzkurvenanalyse zur Kontrolle der Spezifität der Reaktion wurde durchgeführt und die Berechnung des Knockdowns erfolgte in Prozent anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der qPCR dazu genutzt, die ESRRG-Expression nach Transfektion mit spezifischer siRNA relativ zur ESRRG-Expression in Kontrollproben ohne Behandlung zu bestimmen, um damit Aussagen über den Erfolg des Knockdowns treffen zu können. Bei der Kontrollprobe handelte es sich um eine statt mit ESRRG-siRNA mit cosiRNA transfizierte Probe. Alle anderen experimentellen Bedingungen (Konzentrationsverhältnisse, Transfektionsreagenz, Zeitpunkt der Zellernte) entsprachen den Bedingungen der ESRRG-siRNA-Probe. Zusätzlich wurde die qPCR für Expressionsanalysen von an der Karzinogenese beteiligten Genen herangezogen. Eine medizinisch-technische Assistentin (MTA) führte diese Versuche zu einem späteren Zeitpunkt durch. Folgende Gene wurden dabei in der ESRRG-Knockdowngruppe im Vergleich zur Kontrolle untersucht:

1. Gene, die mit Wachstum und Proliferation assoziiert sind:

- CCND1 (kodiert für Cyclin D1)
- CCNE2 (kodiert für Cyclin E2)
- CCNA1 (kodiert für Cyclin A2)
- CDK2 (kodiert für CDK2)
- CDKN1A (kodiert für p21^{Cip1/Waf1})
- MKI67 (kodiert für Ki-67)

2. Gene, die am programmierten Zelltod beteiligt sind:

- BCL-2 (kodiert für das gleichnamige antiapoptotische Protein)
- XIAP (kodiert für das gleichnamige antiapoptotische Protein)
- AIFM1 (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- BAX (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- BAK (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- CASP1 (kodiert für die Cysteinprotease Caspase 1)

3. Epitheliale und mesenchymale Gene:

- CDH1 (kodiert für E-Cadherin)
- SCEL (kodiert für Scellin)

- MUC1 (kodiert für Mucin 1)
- CDH2 (kodiert für N-Cadherin)

Die dazugehörigen Primersequenzen sind Kapitel 3 zu entnehmen. Zur besseren Verständlichkeit werden in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnungen der jeweiligen Genprodukte anstatt der Genbezeichnungen verwendet.

4.3 Viabilitätsassay (CellTiter-Blue®)

4.3.1 Theoretische Grundlagen des Viabilitätsassays

Das Viabilitätsassay mit Alamarblau (chemisches Synonym: Resazurin) macht sich die Aktivität zellulärer Redoxenzyme und die reduzierende Umgebung in stoffwechselaktiven Zellen durch Bereitstellung von NADPH und anderen Elektronendonatoren zu Nutze (207). Der zellmembrangängige Farbstoff Resazurin wird innerhalb der Zellen zu Resorufin reduziert. Während der Redoxindikator Resazurin eine dunkelblaue nicht-fluoreszierende Farbe aufweist, ist seine reduzierte Form Resorufin rosafarben und hoch-fluoreszierend. Dieser die Redoxreaktion begleitende Farbumschlag kann im Zellkulturmedium durch ein Fluorometer bei $\lambda = 590$ nm gemessen werden. Da nur viable Zellen dieses fluoreszierende Endprodukt herstellen, nicht aber Zellen ohne Stoffwechselkapazität, ist das messbare Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl der vorhandenen viablen Zellen (208).

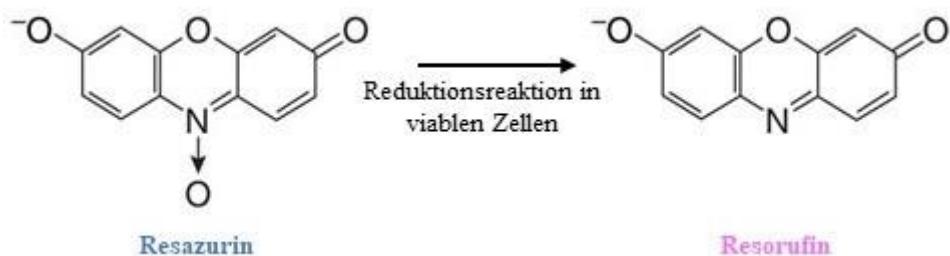


Abbildung 12: Schematische Darstellung des dem CTB-Assay zugrunde liegenden Mechanismus
Reduktion von Resazurin zu Resorufin mit Farbumschlag, modifiziert nach (209)

4.3.2 Durchführung des Viabilitätsassays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt des ESRRG-Knockdowns auf die relative Anzahl viabler Zellen 4 bis 7 Tage nach Transfektion mit Hilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays (CTB-Assay) von Promega untersucht. Dafür wurden bestimmte Zellzahlen (500, 1000, 2000 und 4000 Zellen) sowohl der mit ESRRG-siRNA transfizierten Zellen (Knockdownzellen) als auch der mit Negativ-Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Kontrollzellen) einen Tag nach Transfektion (entspricht Tag 0) auf 96-Well-Platten ausgesät. An jedem Messtag (Tag 0, 3, 4, 5 und 6) wurden je 10 μ l des Resazurin-haltigen CellTiter-Blue Reagenz pro Well hinzugegeben und die Menge des umgesetzten Farbstoffs im Wallac Victor3™ 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer) bei 579 Ex/590 Em nm bestimmt. An Tag 0 erfolgte die CTB-Zugabe erst 3 – 4 h nach der Aussaat, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Außerdem wurde

auf derselben Platte jeweils die Fluoreszenz des sogenannten Blanks (je 100 µl zellfreies Medium) gemessen und als Hintergrundfluoreszenz von den anderen Messwerten subtrahiert.

Die folgende Grafik zeigt exemplarisch den Aufbau einer 96-Well-Platte, die für das CTB-Assay eingesetzt wurde.

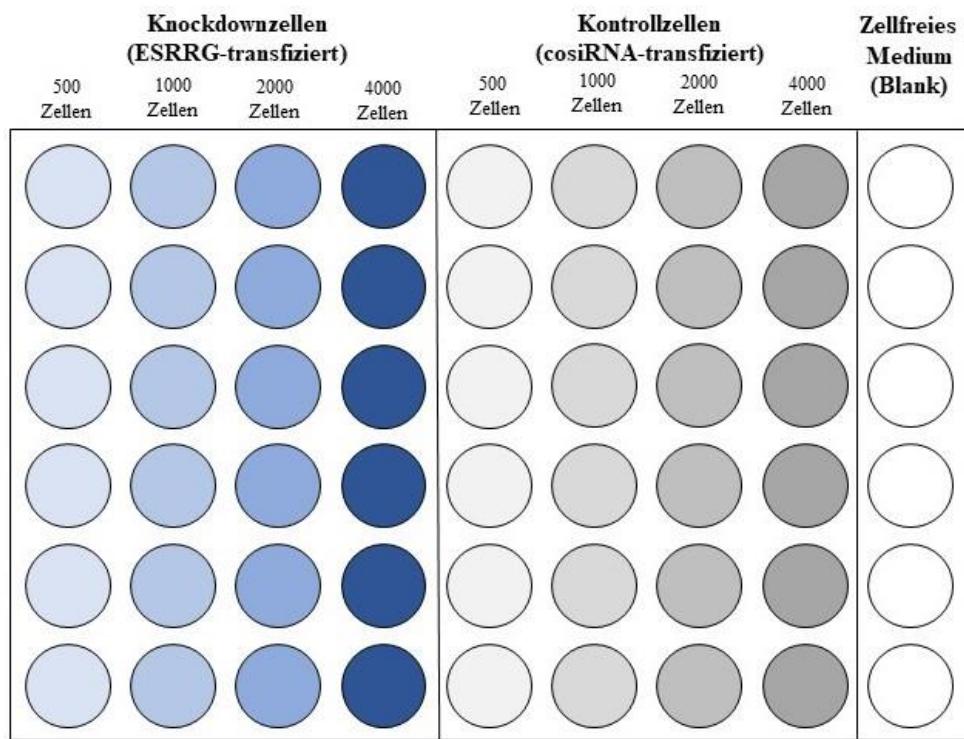


Abbildung 13: Aufteilung einer für das CTB-Assay angefertigten 96-Well-Platte

Aussaat definierter Zellzahlen pro Well (500, 1000, 2000, 4000 Zellen/Well) je für 6 Wells und je für die zwei Gruppen (Knockdownzellen und Kontrollzellen), außerdem eine Reihe zellfreies Medium (Blank) zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz

Da das CTB-Reagenz zytotoxisch wirkt und die damit versehenen Zellen im Anschluss an die Fluoreszenzmessung verworfen werden mussten, wurden an Tag 0 mehrere identische 96-Well-Platten (mit definierten Zellzahlen der beiden Gruppen und mit Blank) angefertigt. Auf diese Weise stand an jedem der Messtage eine für die CTB-Zugabe und Messung vorgesehene 96-Well-Platte zur Verfügung, die anschließend entsorgt werden konnte. Unter der Voraussetzung, dass die an Tag 0 ausgesäten 96-Well-Platten in ihrem Aufbau und den Bedingungen bei der Aussaat identisch waren und die darauf ausgesäten Zellen der beiden Gruppen im Verlauf ein jeweils identisches Proliferationsverhalten aufwiesen, konnte das Wachstum der Knockdownzellen über den Messzeitraum grafisch dargestellt werden. Die gemessenen Fluoreszenzwerte an Tag 0 bzw. die am jeweiligen Tag gemessenen Fluoreszenzwerte der Kontrollgruppe dienten dabei als Bezugswerte.

4.4 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft EXCEL 2016 und IBM SPSS Statistics 25 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden – sofern nicht anders angegeben – als signifikant betrachtet, wenn der t-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (dargestellt als *) bzw. $p < 0,01$ (dargestellt als **) ergab. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Grafiken bilden den Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) unter Angabe der Anzahl der Versuchsdurchführungen (n) ab.

4.5 Überblick über den Versuchsaufbau

Nachdem in den anderen Abschnitten dieses Kapitels bereits ausführlich auf die Grundlagen und die Methodik der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche eingegangen wurde, soll die folgende Grafik nun noch einmal einen kurzen schematischen Überblick über den Versuchsaufbau im Gesamten geben:

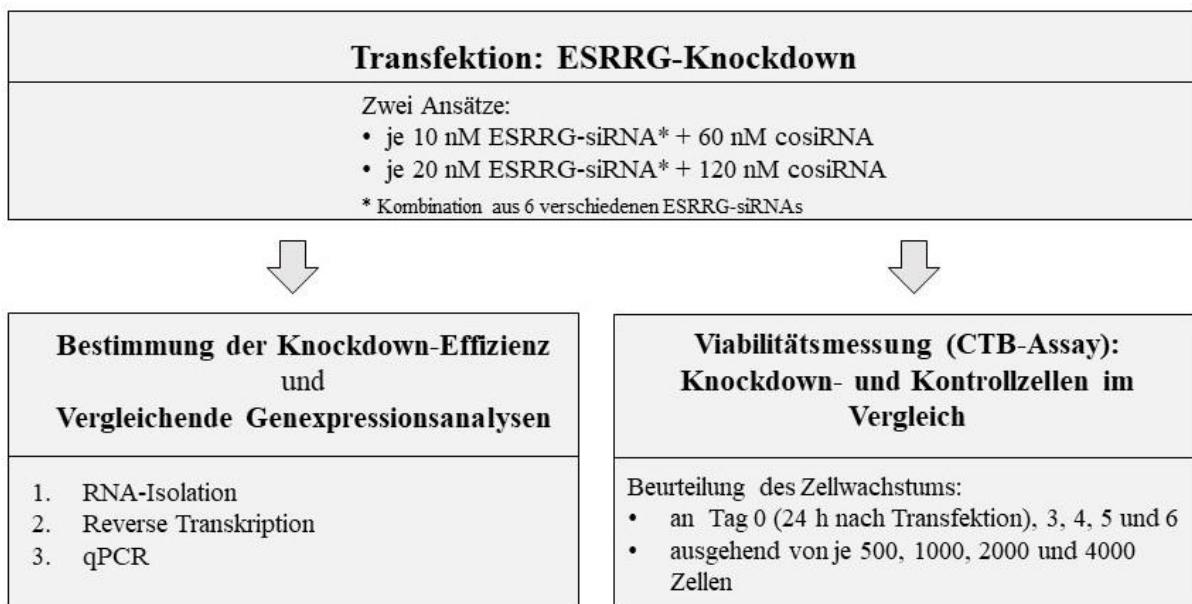


Abbildung 14: Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau

Sobald ein effektiver ESRRG-Knockdown in den OVCAR-3-Zellen etabliert worden war, folgte der weitere Versuchsablauf stets dem oben dargestellten Flussschema. Insgesamt wurde das Experiment sechsmal durchgeführt. Die durch die MTA bewerkstelligte Expressionsanalyse von Genen der Proliferation, des programmierten Zelltods und von epithelialen und mesenchymalen Markern erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt. Zu diesem Zweck wurde die zuvor gewonnene DNA von insgesamt 3 Probenpaaren (ESRRG-siRNA-transfizierte Zellen

versus cosiRNA-transfizierte Zellen) für erneute qPCRs mit für die zu untersuchenden Gene spezifischen Primern verwendet.

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Bestimmung der Knockdown-Effizienz und die Viabilitätsmessung nicht innerhalb derselben Zellpopulation durchgeführt werden konnten. Der Grund dafür ist, dass die Zellen, die für RNA-Isolation, reverse Transkription und qPCR herangezogen wurden, nicht mehr für die CTB-Messung verwendbar waren – und umgekehrt. Die Versuchsauswertung basierte deshalb auf der Annahme, dass die zu Beginn einer Versuchsreihe unter gleichen Bedingungen transfizierten Zellen sich in der Folge identisch verhielten. Es wurde davon ausgegangen, dass der Gen-Knockdown, der in einem Teil der transfizierten Zellen einer Versuchsreihe nachgewiesen wurde, auch in den Zellen vorhanden war, die im Anschluss für die Viabilitätsmessung eingesetzt wurden. Im Gegensatz dazu konnte die durch die MTA durchgeführte Genexpressionsanalyse in ESRRG-siRNA-transfizierten Zellen durchgeführt werden, in deren mRNA der ESRRG-Knockdown zuvor eindeutig nachgewiesen worden war.

Wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, wurden eigens für jede CTB-Messung transfizierte Zellen benötigt, die im Anschluss verworfen werden mussten. Auch hier wurde vorausgesetzt, dass alle Zellen der Versuchsreihe, die 24 h nach Transfektion auf 96-Well-Platten ausgesät wurden, innerhalb ihrer Gruppe (Knockdown- und Kontrollgruppe, jeweils definierte Ausgangszellzahl) ein jeweils identisches Wachstumsverhalten aufwiesen. Um eine Versuchsreihe vollständig durchführen zu können, mussten also von Beginn an ausreichend Zellen unter identischen Bedingungen transfiziert werden. Dies fasst Abbildung 15 schematisch zusammen.

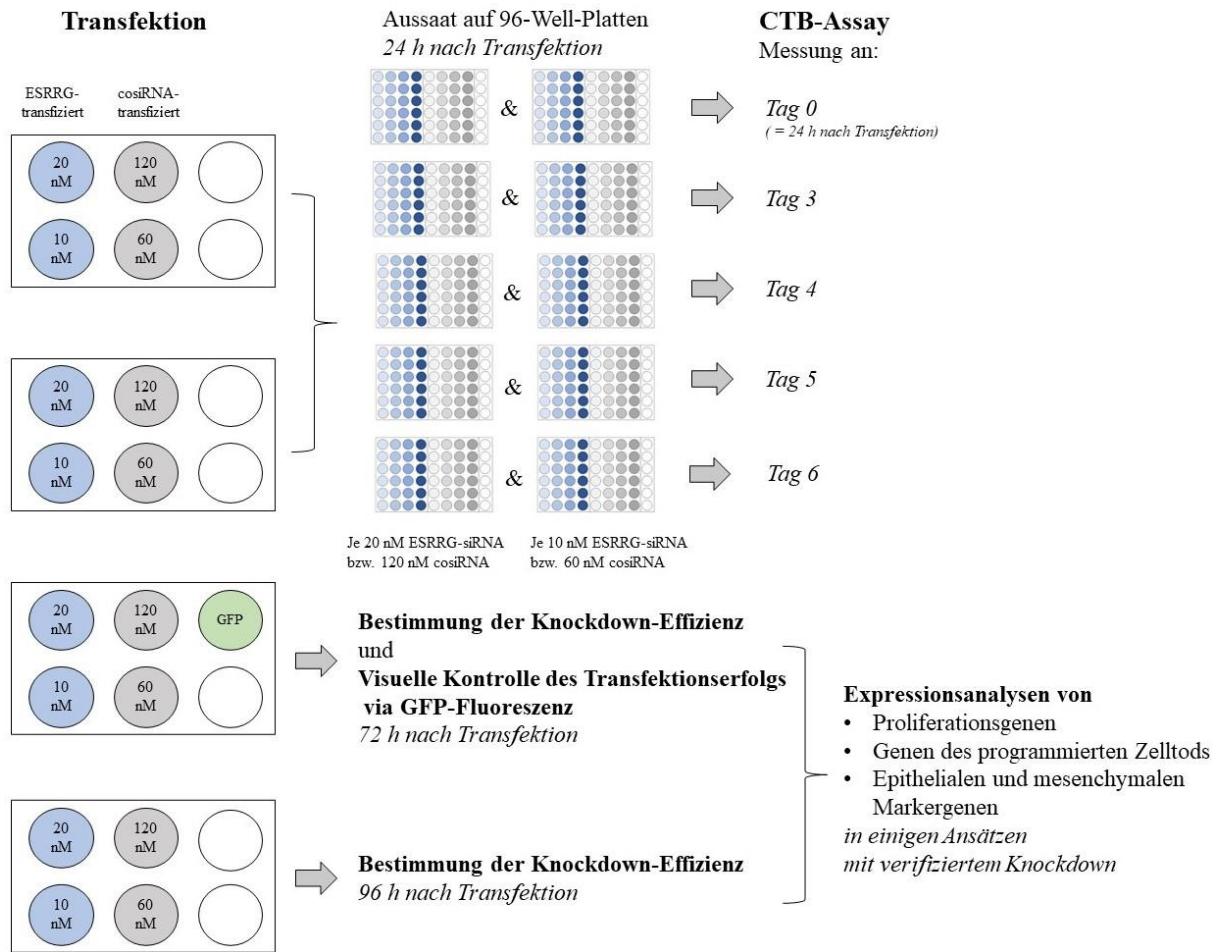


Abbildung 15: Übersicht über Anzahl und Verwendung der Transfektionsansätze

5 E R G E B N I S S E

5.1 Vorversuche

5.1.1 Etablierung des ESRRG-Knockdowns

Um die Bedeutung von ERR γ bzw. ESRRG valide untersuchen zu können, war ein effektiver Gen-Knockdown via RNA-Interferenz grundlegend. Drei verschiedene Ovarialkarzinom-Zelllinien (SK-OV-3, OAW-42 und OVCAR-3) wurden mit ESRRG-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten mit unspezifischer siRNA (cosiRNA) transfizierte Zellen. Der Erfolg dieses Knockdowns wurde nach Transfektion auf mRNA-Ebene mittels qPCR ermittelt. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber dem Referenzgen β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (siehe Kapitel 4.2.3.2). Das mRNA-Niveau der mit cosiRNA-transfizierten Zellen wurde als 100 % festgesetzt und das ESRRG-mRNA-Niveau der Knockdownzellen damit verglichen.

Während sich in den Zellen der Zelllinien SK-OV-3 und OAW-42 trotz Variation der Transfektionsreagenzien, Zellzahlen und Konzentrationen kein adäquater Knockdown verifizieren und reproduzieren lies, gelang ein transienter Knockdown in OVCAR-3-Zellen mit Hilfe des im Methodenteil (Kapitel 4.1.2.3) beschriebenen Transfektionsprotokolls. Dabei wurden vergleichend sechs verschiedene ESRRG-siRNAs entweder je 10 nM oder je 20 nM (und dementsprechend 60 nM oder 120 nM cosiRNA) eingesetzt. Die Effizienz des Knockdowns wurde sowohl 72 h als auch 96 h nach Transfektion bestimmt.

Nach Transfektion konnte eine signifikante Reduktion der ESRRG-mRNA-Menge und somit der ESRRG-Expression nachgewiesen werden. Die ESRRG-Expression betrug nach Transfektion von je 10 nM ESRRG-siRNA nach 72 h im Mittel 19 % und nach 96 h 25 %, nach Transfektion von je 20 nM ESRRG-siRNA nach 72 h 15 % und nach 96 h 21 % in Relation zur Kontrolle (jeweils $p < 0,01$), siehe Abbildung 16. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion mit niedrigerer (6 x 10 nM) und mit höherer (6 x 20 nM) Konzentration der ESRRG-siRNA bezüglich des Knockdown-Erfolgs.

Der erfolgreiche Knockdown rechtfertigte die Durchführung der folgenden Versuche und ermöglichte den Vergleich von OVCAR-3-Zellklonen, die sich nur hinsichtlich ihrer ESRRG-Expression unterschieden. So konnten Rückschlüsse auf die Funktion von ESRRG bzw. $\text{ERR}\gamma$ in Ovarialkarzinomzellen gezogen werden.

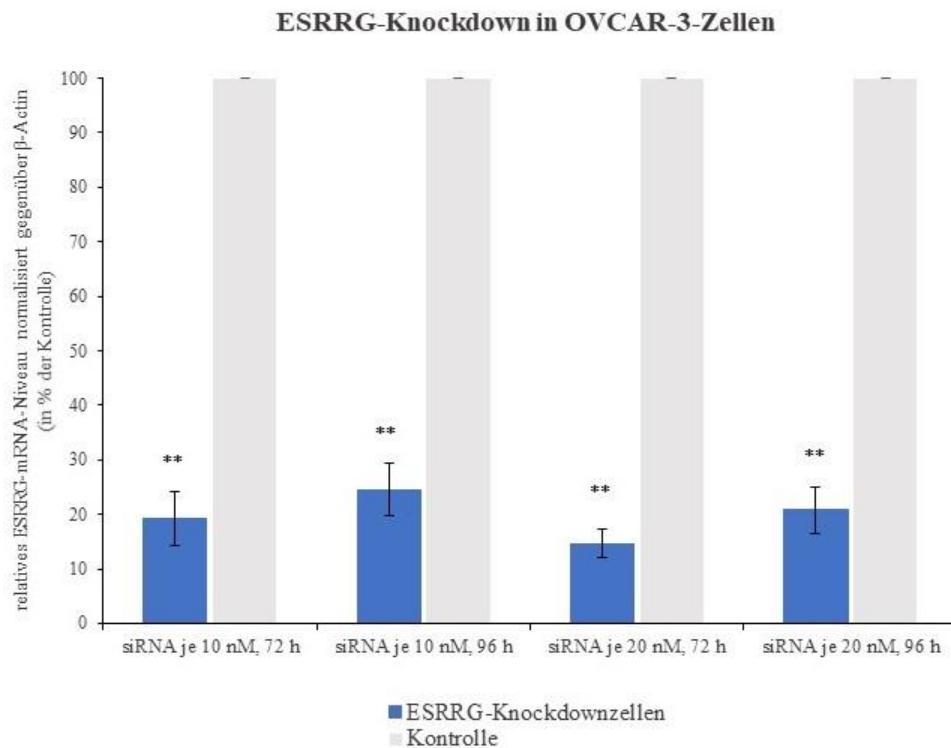


Abbildung 16: Grafische Darstellung des Knockdowns von ESRRG auf mRNA-Ebene

Gezeigt wird die durchschnittliche ESRRG-Expression von mit ESRRG-siRNA transfizierten OVCAR-3-Zellen (siRNA je 10 oder 20 nM, 72 oder 96 h nach Transfektion) im Vergleich zu unspezifisch bzw. mit cosiRNA transfizierten OVCAR-3-Kontrollzellen (dargestellt als 100 %). Die ESRRG-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber dem Referenzgen β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Livak und Schmittgen. $n = 6$ (72 h-Ansätze) bzw. $n = 5$ (96 h-Ansätze), $**p < 0,01$ versus Kontrolle

5.1.2 Wachstum untransfizierter OVCAR-3-Zellen

Bevor die Auswirkungen des ESRRG-Knockdowns auf das Wachstum der Zelllinie untersucht wurden, wurde zuerst das Wachstum untransfizierter OVCAR-3-Zellen mittels des CTB-Assays bestimmt, um die optimale Ausgangszellzahl für die folgenden Versuche zu ermitteln. Wie bereits im Kapitel 4.3 beschrieben, kann die im CTB-Assay gemessene Fluoreszenz als Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen verwendet werden und so auf die Viabilität und das Wachstum der Kultur geschlossen werden. Dabei wurden unterschiedliche Anzahlen von Zellen (500, 1000, 2000 und 4000) auf 96-Well-Platten ausgesät und deren Fluoreszenz bzw. Anzahl viabler Zellen im Mittel am Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. So ergab sich für jede Ausgangszellzahl eine Wachstumskurve.

Abbildung 17 zeigt ein deutliches Wachstum der OVCAR-3-Zellen, vor allem von Tag 3 auf Tag 4. Danach scheint das Wachstum eher zu stagnieren. Bei der höchsten eingesetzten Anfangs-Zellzahl (4000) ist die Zellzahl am Tag 6 sogar rückläufig. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der starken Zellproliferation und hohen Zelldichte ein Nährstoffmangel besteht, weshalb die Absterberate ansteigt. Für die folgenden CTB-Assays mit transfizierten Zellen wurden dieselben vier verschiedenen Zellzahlen eingesetzt.

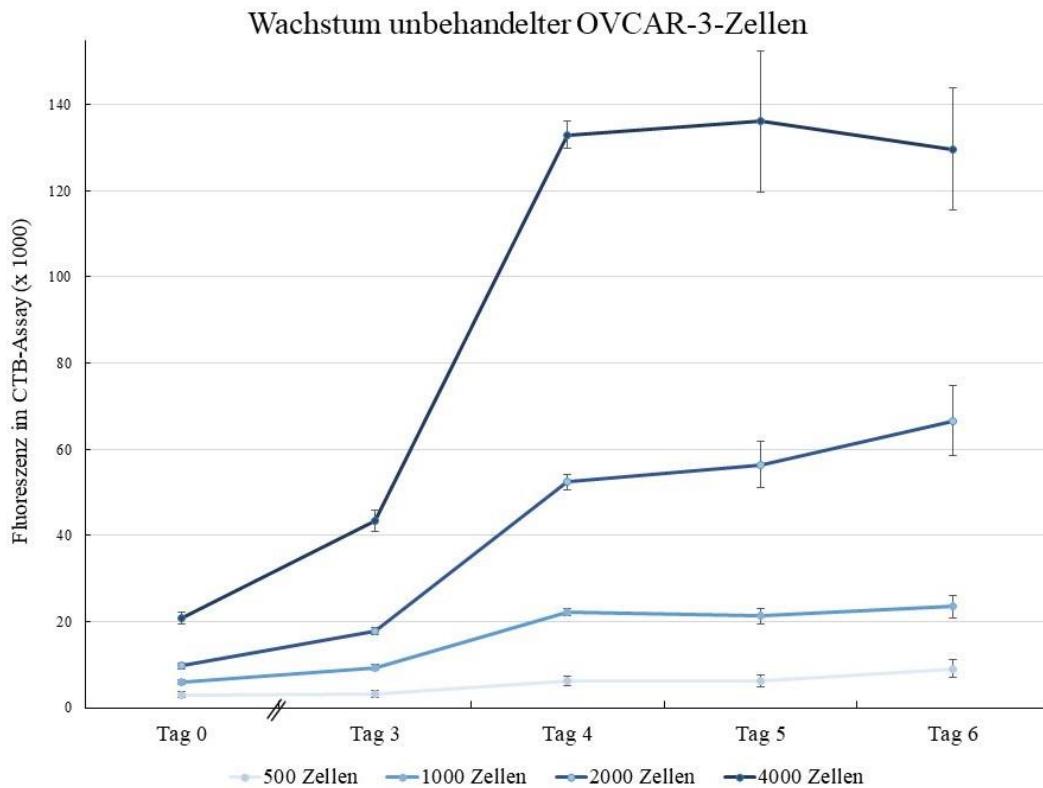


Abbildung 17: Wachstum unbehandelter OVCAR-3-Zellen

Ausgehend von 500, 1000, 2000 oder 4000 Zellen/96-Well. Das Wachstum wurde durch Messung der Viabilität der Zellen (CTB-Assay) am Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. Darstellung als MW \pm SEM, n = 6

Zur besseren Veranschaulichung zeigt Abbildung 17 die Veränderung der Zellviabilität bzw. die Zellproliferation als Wachstumskurve. Der bereits ausführlich beschriebene Versuchsaufbau (siehe Kapitel 4.5) lässt eine solche Darstellung eigentlich nicht zu: Über die verschiedenen Tage wurde nicht das Wachstum einer und derselben Zellpopulation beobachtet und gemessen; stattdessen wurden für jede CTB-Messung neue – unter identischen Bedingungen angezüchtete – Zellen herangezogen und anschließend verworfen. Im Folgenden wird daher auf die Darstellung als Wachstumskurven zugunsten der Darstellung als Balkendiagramm verzichtet.

5.2 Einfluss von ERR γ auf das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen

Um die Wirkung von ERR γ bzw. ESRRG auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 zu untersuchen, wurde das Wachstum von ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle via CTB-Assay ermittelt. Bei der Transfektion wurden entweder je 20 nM ESRRG-siRNA (und 120 nM cosiRNA) oder je 10 nM ESRRG-siRNA (und 60 nM cosiRNA) eingesetzt. Anschließend wurden je 500, 1000, 2000 und 4000 Knockdownzellen (ESRRG-siRNA-transfiziert) und als Referenz je dieselbe Anzahl Kontrollzellen (cosiRNA-transfiziert) auf 96-Well-Platten ausgesät und deren Viabilität bzw. Zellzuwachs am Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. Die folgenden Grafiken (Abbildung 18 und Abbildung 19) geben einen Überblick über die gemessene Zellviabilität der Knockdown- und Kontrollgruppe an den einzelnen Messtagen ausgehend von den vier verschiedenen Ausgangszellzahlen – jeweils für beide eingesetzten siRNA-Konzentrationen.

Es fiel auf, dass bei den Ansätzen mit transfizierten Zellen die Zellviabilität weniger stark zunahm als im CTB-Vorversuch mit untransfizierten OVCAR-3-Zellen (vergleiche Abbildung 17). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der Transfektion mit toxisch wirkenden Transfektionsreagenzien und siRNA ein Teil der ausgesäten Zellen zugrunde ging.

Bei der niedrigsten ausgesäten Zellzahl von 500 Zellen/Well einer 96-Well-Platte konnte an keinem der Messtage eine signifikante Abweichung des Wachstums der beiden Gruppen voneinander festgestellt werden. Auch bei den Ausgangszellzahlen 1000 Zellen/Well und 2000 Zellen/Well ergaben sich keine konsistenten (an allen Tagen) signifikanten Abweichungen des Wachstums der Knockdown- von der Kontrollgruppe. Nur an einzelnen Tagen konnte ein signifikanter Unterschied des Wachstums der beiden Gruppen nachgewiesen werden ($p < 0,05$): ausgehend von 1000 Zellen/Well beim Ansatz mit je 20 nM ESRRG-siRNA an Tag 4 und Tag 5 bzw. ausgehend von 2000 Zellen/Well beim Ansatz mit je 10 nM ESRRG-siRNA an Tag 4 und Tag 6 und beim Ansatz mit je 20 nM ESRRG-siRNA an Tag 5.

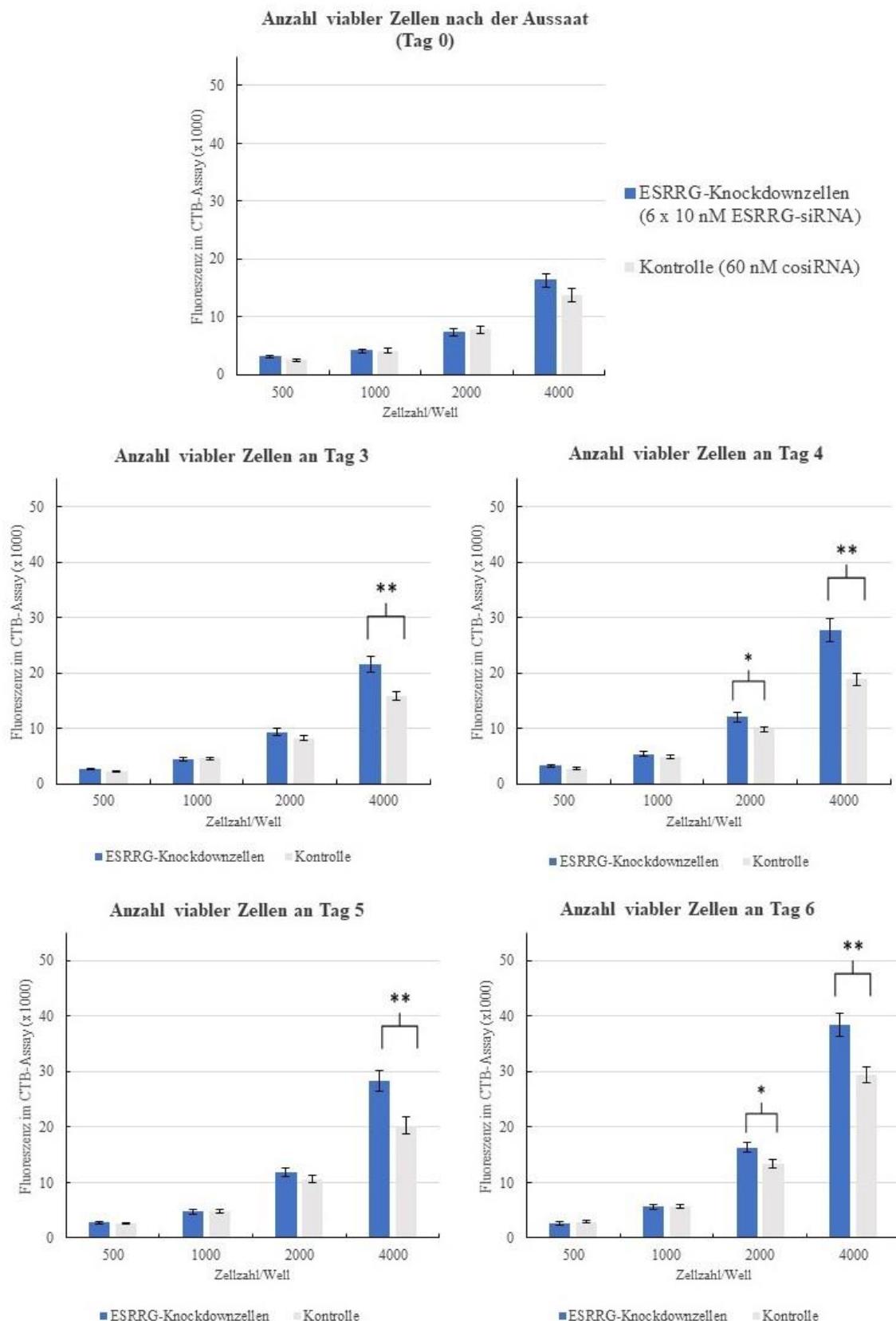


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Anzahl viabler ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) bei Einsatz von je 10 nM ESRRG-siRNA ausgehend von verschiedenen Zellzahlen

Dabei wurde die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. MW \pm SEM, n = 6 Versuche \pm 6 Ansätze, *p < 0,05 versus Kontrolle, **p < 0,01 versus Kontrolle

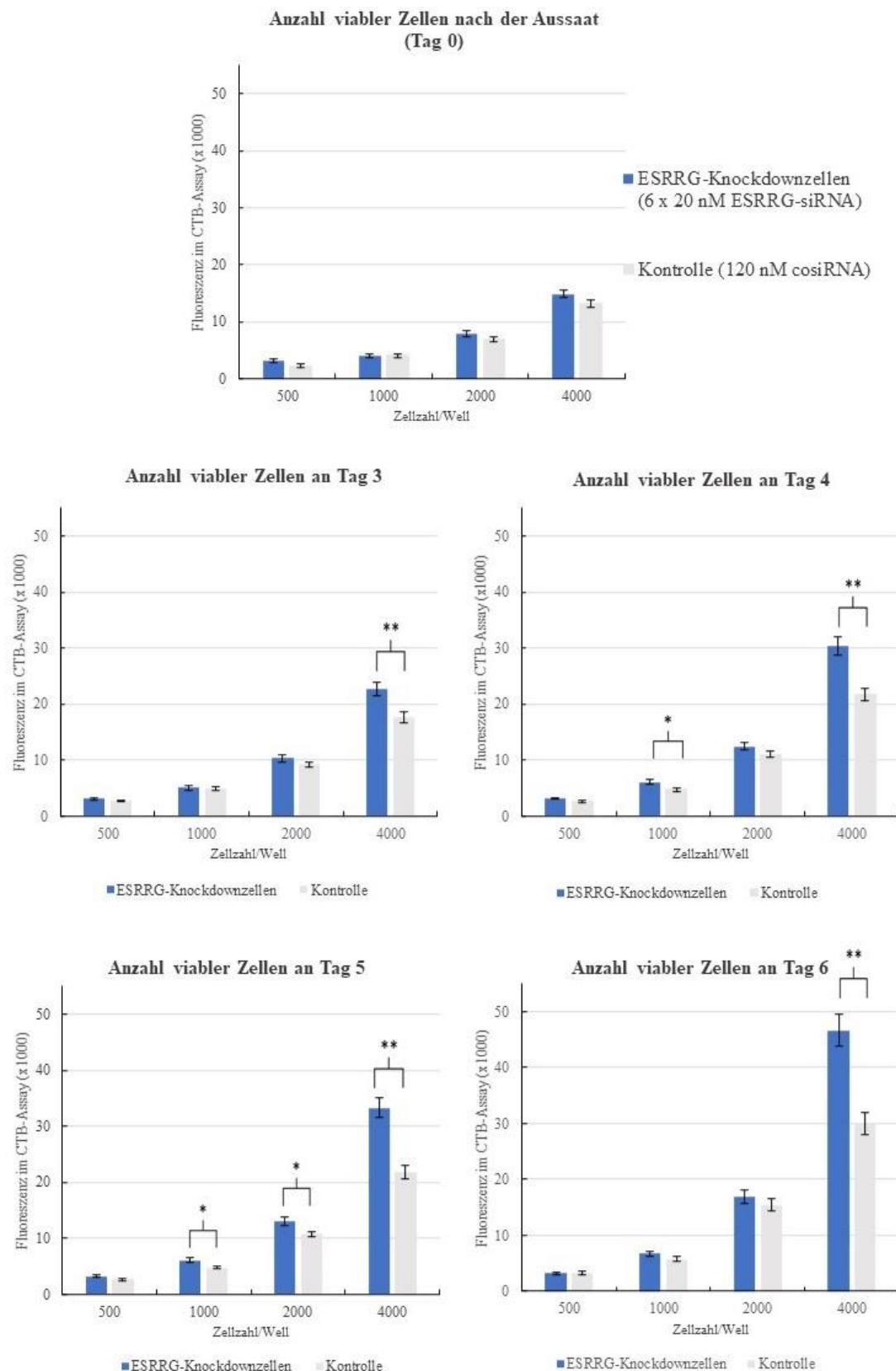


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Anzahl viabler ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) bei Einsatz von je 20 nM ESRRG-siRNA ausgehend von verschiedenen Zellzahlen

Dabei wurde die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. MW \pm SEM, n = 6 Versuche \pm 6 Ansätze, *p < 0,05 versus Kontrolle, **p < 0,01 versus Kontrolle

Während das Wachstum von 500, 1000 und 2000 Knockdownzellen pro 96-Well nicht an allen Tagen signifikant von der Kontrolle abwich, konnte ausgehend von 4000 Zellen ein signifikanter Unterschied (t-Test: $p < 0,01$) zwischen dem Wachstum der Knockdown- und der Kontrollzellen (sowohl beim Einsatz von je 10 nM als auch von je 20 nM siRNA) an allen Tagen der Messung (Tag 3, 4, 5 und 6) beobachtet werden. Bei der höchsten der im Rahmen dieses Versuches ausgesäten Zellzahl ließ sich sowohl für die ESRRG-Knockdownzellen als auch für die Kontrollzellen ein deutliches Wachstum auf bis zu 300 % des Ausgangswerts feststellen. Die folgende Grafik zeigt die Viabilitätsveränderung der Knockdown- versus Kontrollzellen ausgehend von 4000 Zellen/Well über den Messzeitraum.

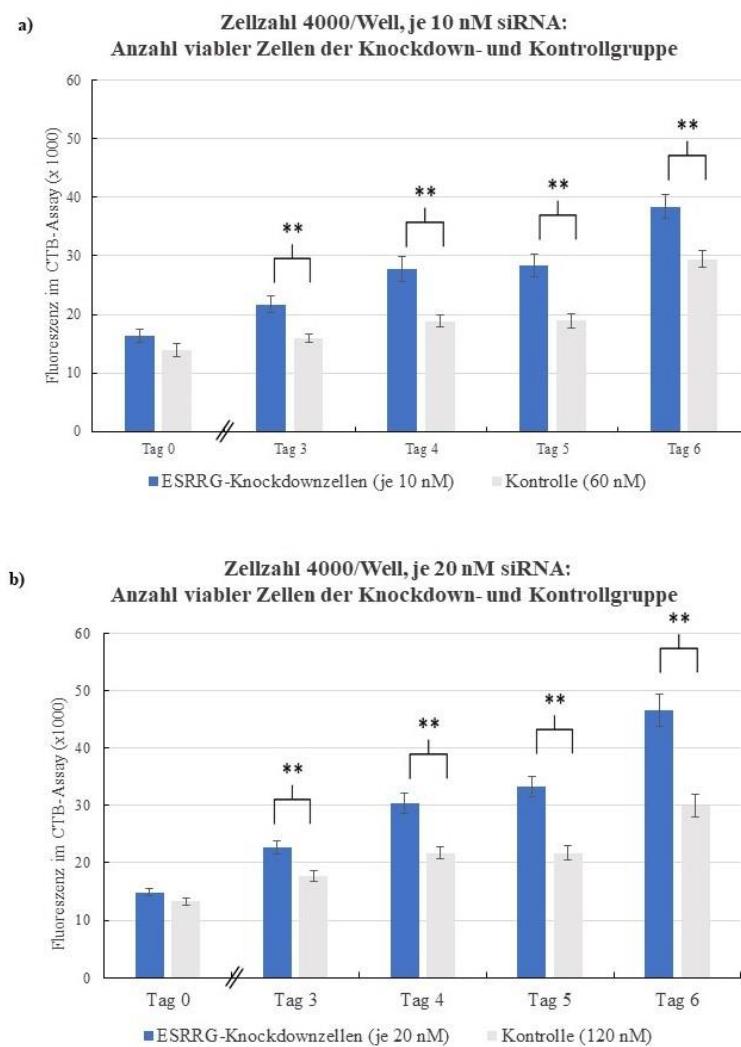


Abbildung 20: Grafische Darstellung des absoluten Wachstums der ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) ausgehend von 4000 Zellen/96-Well

Dabei wurde die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt.

a) Einsatz von 6 x 10 nM ESRRG-siRNA bzw. 60 nM cosiRNA

b) Einsatz von 6 x 20 nM ESRRG-siRNA bzw. 120 nM cosiRNA

$MW \pm SEM$, $n = 6$ Versuche á 6 Ansätze, $**p < 0,01$ versus Kontrolle

Um potentielle Unterschiede zwischen dem Wachstum der ESRRG-Knockdownzellen und dem Wachstum der Kontrollzellen noch deutlicher zu machen, wurde die Zellviabilität der ESRRG-Knockdownzellen an den einzelnen Tagen auch auf die jeweilige Zellviabilität der Kontrollzellen bezogen. Dies zeigt Abbildung 21.

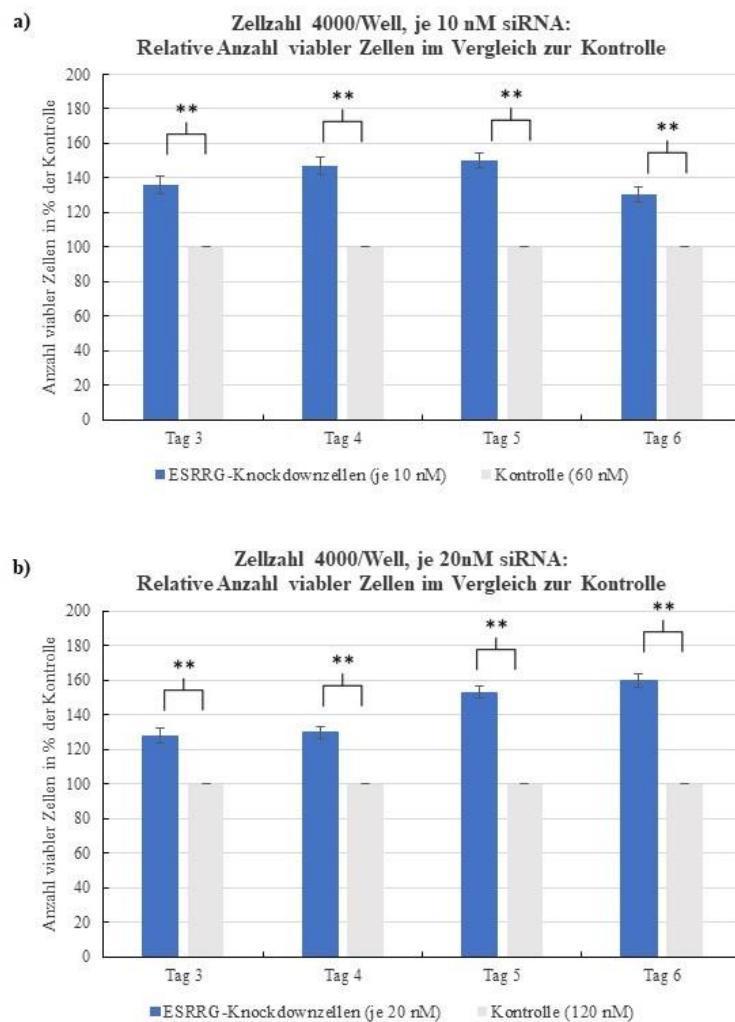


Abbildung 21: Grafische Darstellung des relativen Wachstums der ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) ausgehend von 4000 Zellen/Well

Dabei wurde die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt. Die jeweilige Zellzahl der Kontrolle wurde als 100 % festgelegt und die Zellzahl der ESRRG-Knockdownzellen darauf bezogen

- a) Einsatz von 6 x 10 nM ESRRG-siRNA bzw. 60 nM cosiRNA
 - b) Einsatz von 6 x 20 nM ESRRG-siRNA bzw. 120 nM cosiRNA
- MW \pm SEM, n = 6 Versuche \pm 6 Ansätze, **p < 0,01 versus Kontrolle

Auch der non-parametrische, auf Rangsummen basierte Mann-Whitney-U-Test, für dessen Durchführung im Gegensatz zum t-Test keine normalverteilten Daten nötig sind, ergab eine signifikante Abweichung der Zellzahl des ESRRG-Knockdown-Ansatzes von der Zellzahl der Kontrolle ausgehend von je 4000 Zellen/Well an allen gemessenen Tagen (siehe

Tabelle 7).

Tag nach Aussaat (4000 Zellen/Well)	ESRRG-Knockdowngruppe versus Kontrollgruppe: Signifikanzen anhand des Mann-Whitney-U-Test	
	je 20 nM ESRRG-siRNA	je 10 nM ESRRG-siRNA
Tag 3	p < 0,003	p < 0,005
Tag 4	p < 0,0005	p < 0,005
Tag 5	p < 0,0005	p < 0,001
Tag 6	p < 0,0005	p < 0,002

Tabelle 7: Übersicht über die Signifikanzen des Unterschieds der Anzahl viabler Zellen in der Knockdown- und Kontrollgruppe anhand des Mann-Whitney-U-Test

Dabei wurde die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 bestimmt, ausgehend von 4000 Zellen/Well. Die ESRRG Knockdownzellen wurden mit je 20 nM bzw. je 10 nM ESRRG-siRNA transzisiert, die Kontrollzellen mit 120 nM bzw. 60 nM cosiRNA. n = 6 Versuche á 6 Ansätze

Abbildung 22 stellt die Differenz zwischen den CTB-Messwerten der ESRRG-Knockdown- und der Kontrollgruppe grafisch als Box-Plot dar. Dabei wird nach Tag der Messung unterschieden. Es fällt auf, dass der Mittelwert der Differenz und somit der Viabilitätsunterschied zwischen den beiden Gruppen von Tag zu Tag größer wird. Innerhalb der ESRRG-Knockdowngruppe nahm die Zellviabilität bzw. die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen also stärker zu als in der Kontrollgruppe im gleichen Zeitraum. Dies zeigt sich beim Ansatz mit je 20 nM deutlicher als beim Ansatz mit je 10 nM.

Um die Veränderung der Viabilitätsunterschiede zwischen den beiden Gruppen über den Messzeitraum besser interpretieren zu können, wurde ein studentischer t-Test durchgeführt. Für den Ansatz mit je 10 nM siRNA ergab sich ein signifikanter Unterschied der Differenz zwischen Knockdown- und Kontrollgruppe an Tag 3, 4, 5 und 6 gegenüber Tag 0 (siehe Tabelle 8). Die ESRRG-Knockdownzellen wiesen also ausgehend vom Tag 0 ein signifikant stärkeres Wachstum auf als die Kontrollzellen. Beim Ansatz mit je 20 nM siRNA waren zusätzlich die Differenzen zwischen den beiden Gruppen an allen Tagen signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 9). Die Knockdownzellen proliferierten also von Messtag zu Messtag immer stärker als die Kontrollzellen.

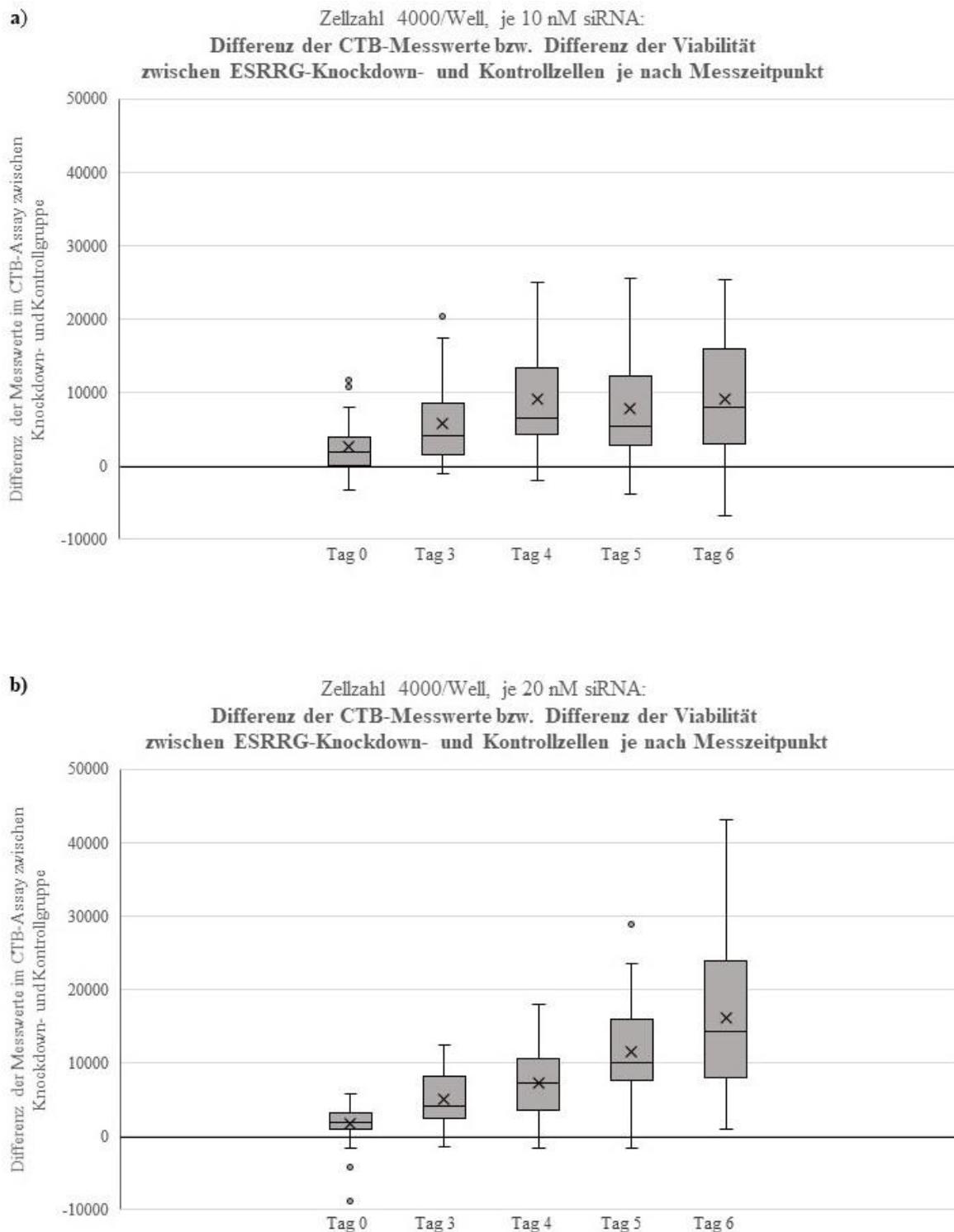


Abbildung 22: Grafische Darstellung (Boxplot) der Differenz zwischen den CTB-Messwerten der ESRRG-Knockdownzellen und der Kontrolle

Die Fluoreszenzmesswerte (bzw. die Zellviabilität) der Kontrollgruppe, die mittels CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 (ausgehend von je 4000 Zellen/Well) bestimmt wurden, wurden von den jeweiligen Messwerten (bzw. der Zellviabilität) der ESRRG-Knockdowngruppe subtrahiert.

- a) Einsatz von 6 x 10 nM ESRRG-siRNA bzw. 60 nM cosiRNA
- b) Einsatz von 6 x 20 nM ESRRG-siRNA bzw. 120 nM cosiRNA

$n = 6$ Versuche á 6 Ansätze

Ansatz mit je 10 nM siRNA				
Differenz der CTB-Messwerte bzw. Differenz der Zellviabilität zwischen ESRRG-Knockdowngruppe und Kontrollgruppe: Signifikanz der Unterschiede je nach Messtag				
	versus Tag 0	versus Tag 3	versus Tag 4	versus Tag 5
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 0</i>				
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 3</i>	p < 0,001			
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 4</i>	p < 0,001	p < 0,05		
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 5</i>	p < 0,001	nicht signifikant	nicht signifikant	
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 6</i>	p < 0,001	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 8: Signifikanzen der zeitlichen Veränderung der Zellviabilitätsdifferenz der 10 nM Ansätze

Die Signifikanz der Unterschiede der Viabilitätsdifferenz zwischen ESRRG-Knockdowngruppe und Kontrollgruppe an den verschiedenen Tagen wurde mit Hilfe des t-Tests ermittelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte via CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 (ausgehend von je 4000 Zellen/Well). Die Transfektion wurde mit je 10 nM ESRRG-siRNA (Knockdowngruppe) bzw. 60 nM cosiRNA (Kontrollgruppe) durchgeführt. n = 6 Versuche á 6 Ansätze

Ansatz mit je 20 nM siRNA				
Differenz der CTB-Messwerte bzw. Differenz der Zellviabilität zwischen ESRRG-Knockdowngruppe und Kontrollgruppe: Signifikanz der Unterschiede je nach Messtag				
	versus Tag 0	versus Tag 3	versus Tag 4	versus Tag 5
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 0</i>				
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 3</i>	p < 0,001			
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 4</i>	p < 0,001	p < 0,05		
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 5</i>	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	
<i>Viabilitätsdifferenz an Tag 6</i>	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

Tabelle 9: Signifikanzen der zeitlichen Veränderung der Zellviabilitätsdifferenz der 20 nM Ansätze

Die Signifikanz der Unterschiede der Viabilitätsdifferenz zwischen ESRRG-Knockdowngruppe und Kontrollgruppe an den verschiedenen Tagen wurde mit Hilfe des t-Tests ermittelt. Die Viabilitätsmessung erfolgte via CTB-Assay an Tag 0, 3, 4, 5 und 6 (ausgehend von je 4000 Zellen/Well). Die Transfektion wurde mit je 20 nM ESRRG-siRNA (Knockdowngruppe) bzw. 120 nM cosiRNA (Kontrollgruppe) durchgeführt. n = 6 Versuche á 6 Ansätze

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen in Zusammenschau, dass die Zellen mit geringerer Expression von ESRRG bzw. ERR γ ein signifikant stärkeres Wachstum aufwiesen als die Kontrollzellen, die in ihrer ESRRG-Expression unbeeinträchtigt waren.

5.3 Einfluss von ERR γ auf die Genexpression in Ovarialkarzinomzellen

Die Ergebnisse des ersten Versuchsteils gaben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Rezeptor ERR γ das Wachstum von Tumorzellen beeinflusst. Um die molekularen Mechanismen zu klären, die dem verstärkten Zellwachstum der OVCAR-3-Zellen bei ESRRG-Knockdown zugrunde liegen, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt: Es wurde untersucht, wie sich die Expression verschiedener Gene in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert. Diese Genexpressionsanalysen wurden in ESRRG-siRNA-transfizierten Zellen durchgeführt, in deren mRNA der ESRRG-Knockdown zuvor eindeutig nachgewiesen worden war. Der ESRRG-Knockdown der Zellen dieser Proben betrug im Durchschnitt 13,9 % (n = 3).

Wie auch bereits in Kapitel 4.2.3.4 beschrieben, wurden folgende Gene genauer betrachtet:

1. Gene, die mit Wachstum und Proliferation assoziiert sind:

- CCND1 (kodiert für Cyclin D1)
- CCNE2 (kodiert für Cyclin E2)
- CCNA1 (kodiert für Cyclin A2)
- CDK2 (kodiert für CDK2)
- CDKN1A (kodiert für p21^{Cip1/Waf1})
- MKI67 (kodiert für Ki-67)

2. Gene, die an der Apoptose beteiligt sind:

- BCL-2 (kodiert für das gleichnamige antiapoptotische Protein)
- XIAP (kodiert für das gleichnamige antiapoptotische Protein)
- AIFM1 (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- BAX (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- BAK (kodiert für das gleichnamige proapoptotische Protein)
- CASP1 (kodiert für die Cysteinprotease Caspase 1)

3. Epitheliale und mesenchymale Gene:

- CDH1 (kodiert für E-Cadherin)
- SCEL (kodiert für Scellin)
- MUC1 (kodiert für Mucin 1)
- CDH2 (kodiert für N-Cadherin)

Die durchschnittlichen mRNA-Niveaus der oben aufgezählten Gene wurden in den ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA transfiziert) sowie in den Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) mittels qPCR bestimmt und miteinander verglichen. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber dem Referenzgen β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (siehe Kapitel 4.2.3.2). Die Herstellung der RNA und anschließend der cDNA wurden gemäß Protokoll realisiert. Für die Durchführung der qPCR wurden die für die entsprechenden Gene spezifischen Primer verwendet (siehe Kapitel 3). Zur besseren Verständlichkeit werden die Bezeichnungen der jeweiligen Genprodukte anstatt der Genbezeichnungen verwendet.

Die Ergebnisse werden im Folgenden aus zwei verschiedenen Perspektiven betrachtet und grafisch dargestellt: Zuerst wird die Expression des zu untersuchenden Gens sowohl in den ESRRG-Knockdownzellen als auch in den Kontrollzellen in Relation zur jeweiligen Expression des Housekeeping-Gens β -Actin gebracht. Anschließend wird das mRNA-Niveau des zu untersuchenden Gens in den Kontrollzellen als 100 % festgesetzt und das jeweilige mRNA-Niveau desselben Gens in den ESRRG-Knockdownzellen darauf bezogen.

5.3.1 Einfluss von $ERR\gamma$ auf Proliferationsgene

Es ergaben sich unterschiedliche Effekte des ESRRG-Knockdowns auf die Expression von Genen, die am Zellzyklus und an der Zellproliferation beteiligt sind.

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Untersuchtes Gen	Relatives mRNA-Niveau in ESRRG-Knockdownzellen (in % bezogen auf das mRNA-Niveau der Kontrollzellen)	p
Cyclin D1	34,2	0,01
Cyclin E2	112,7	n.s.
CDK2	85,6	n.s.
p21 ^{Cip1/Waf1}	108,6	n.s.
Cyclin A2	73,5	0,00007
Ki-67	110,3	n.s.

Tabelle 10: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus der untersuchten Proliferationsgene

Auflistung der mRNA-Niveaus der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-transfiziert) in % der Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Signifikanz wird für $p < 0,05$ angenommen (Knockdownzellen versus Kontrolle).
 $n = 3$, n.s. \triangleq nicht signifikant

Die Genexpressionen von Cyclin E2, CDK2, p21^{Cip1/Waf1} und Ki-67 blieben vom ESRRG-Knockdown unbeeinflusst. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Expression dieser Gene zwischen den Knockdown- und den Kontrollzellen. Dagegen bewirkte der ESRRG-Knockdown eine signifikante Reduktion der Expression der Gene Cyclin D1 und Cyclin A2 in Relation zur Kontrolle: So lagen die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus von Cyclin D1 mit 34,2 % ($p = 0,00007$) und Cyclin A2 mit 73,5 % ($p = 0,011$) in den Ovarialkarzinomzellen mit reduzierter ESRRG-Expression signifikant unter denen der Kontrollzellen.

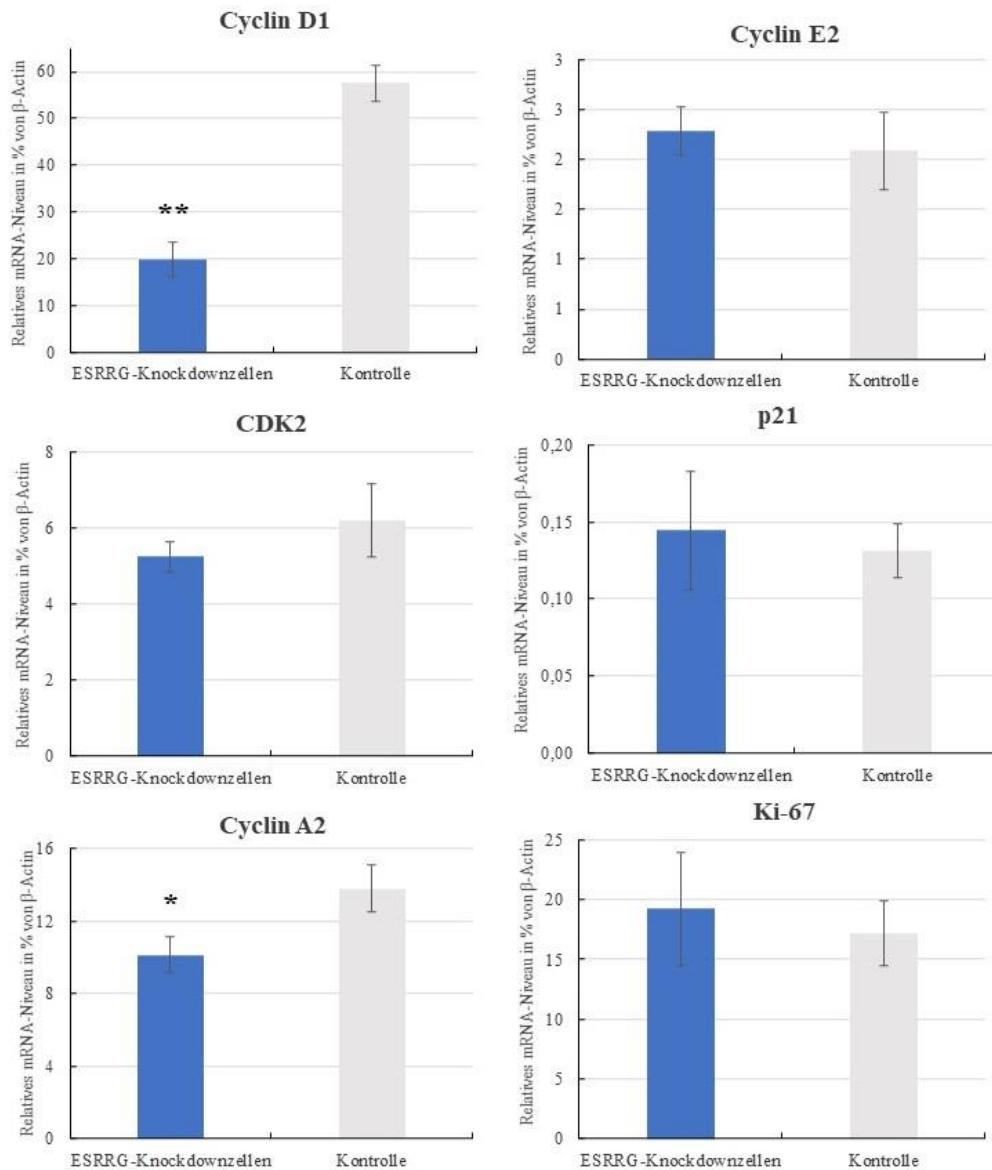


Abbildung 23: Genexpression von Cyclin D1, Cyclin E2, CDK2, p21^{Cip1/Waf1}, Cyclin A2 und Ki-67 in Relation zu β -Actin

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in den ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) und in den unspezifisch transfizierten Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, jeweils bezogen auf die Genexpression des Referenzgens β -Actin (festgesetzt als 100 %) und berechnet anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. MW \pm SD. $n = 3$, * $p < 0,05$ versus Kontrolle, ** $p < 0,01$ versus Kontrolle

Abbildung 23 zeigt die Expression der untersuchten Gene in den beiden Gruppen (Knockdown- und Kontrollgruppe) in Relation zum Referenzgen β -Actin, während Abbildung 24 die jeweilige Genexpression in den ESRRG-Knockdownzellen in Bezug zur Genexpression in den Kontrollzellen setzt.

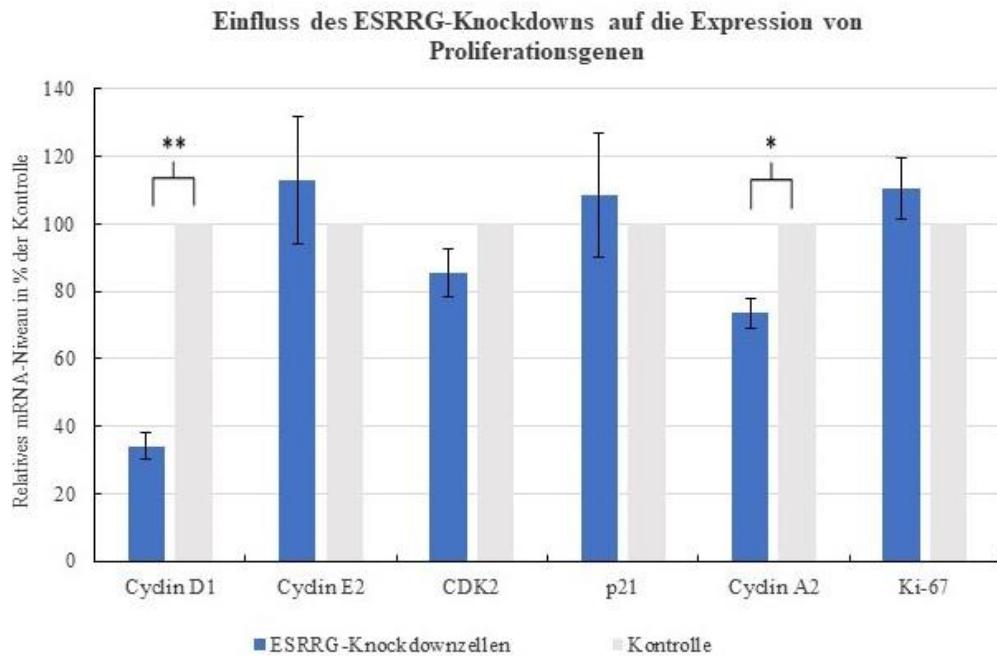


Abbildung 24: Genexpression von Cyclin D1, Cyclin E2, CDK2, p21^{Cip1/Waf1}, Cyclin A2 und Ki-67 in Relation zur Kontrolle

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, bezogen auf die Genexpression unspezifisch transfizierter Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert, festgesetzt als 100 %). Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt und anhand des Referenzgens β -Actin und der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen normalisiert. MW \pm SD, n = 3, * p < 0,05 versus Kontrolle, ** p < 0,01 versus Kontrolle

Die geschilderten Ergebnisse sind nicht konsistent mit der in Kapitel 5.2 beschriebenen Beobachtung, dass Zellen mit geringerer ESRRG-Expression ein signifikant stärkeres Wachstum aufwiesen als die Kontrollzellen: Es wäre eher eine Hochregulation der Cycline, CDK2 und Ki-67 bzw. eine Herunterregulation von p^{21Cip1/Waf1} durch ESRRG-Knockdown zu erwarten gewesen. Der inhibierende Effekt von ERR γ auf die Zellproliferation scheint also auf andere molekulare Mechanismen zurückzuführen sein als auf die Veränderung der Expression von Proliferationsgenen.

5.3.2 Einfluss von $ERR\gamma$ auf Gene des programmierten Zelltods

Weiterhin wurde die Genexpression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und XIAP und der proapoptotischen bzw. propyoptotischen Gene AIFM1, Bax, Bak und Caspase-1 untersucht. Die folgende Tabelle zeigt deren relative mRNA-Niveaus in den ESRRG-Knockdownzellen in Relation zur Kontrolle sowie die Signifikanz dieser Ergebnisse im Überblick:

Untersuchtes Gen	Relatives mRNA-Niveau in ESRRG-Knockdownzellen (in % bezogen auf das mRNA-Niveau der Kontrollzellen)	p
Bcl-2	47,7	0,014
XIAP	45,6	0,04
AIFM1	90,7	n.s.
Bax	94,6	n.s.
Bak	119,0	n.s.
Caspase-1	40,8	0,007

Tabelle 11: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus der untersuchten Gene des programmierten Zelltods

Auflistung der mRNA-Niveaus der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-transfiziert) in % der Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Signifikanz wird für $p < 0,05$ angenommen (Knockdownzellen versus Kontrolle).
 $n = 3$, n.s. \triangleq nicht signifikant

Die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und XIAP war in den ESRRG-Knockdownzellen signifikant herunterreguliert. Die relative Genexpression von Bcl-2 betrug in den ESRRG-siRNA-transfizierten Zellen im Mittel nur 47,7 % ($p = 0,014$), die XIAP-Expression nur 45,6 % ($p = 0,04$) bezogen auf die mit cosiRNA-transfizierten Kontrollzellen. Aber auch die Expression eines proapoptotischen bzw. propyoptotischen Gens war in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert: Die Expression des Gens für Caspase-1 betrug nur 40,8 % ($p = 0,007$) in den Knockdownzellen in Relation zur Kontrolle. Die Expression der anderen untersuchten proapoptotischen Gene AIFM1, Bax und Bak zeigte keine signifikante Veränderung in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Der Einfluss von $ERR\gamma$ auf die Expression der anti- und proapoptotischen Gene scheint also nicht einheitlich zu sein: Einerseits bewirkte der ESRRG-Knockdown die signifikante Expressionsreduktion von zwei antiapoptotischen Genen, andererseits war auch ein propyoptotisches Gen signifikant herunterreguliert. Nur letztere Beobachtung lässt sich mit dem verstärkten Zellwachstum in den ESRRG-Knockdownzellen vereinbaren.

Die beschriebenen Zusammenhänge werden in den folgenden beiden Abbildungen grafisch dargestellt. Abbildung 25 zeigt die Genexpression der Apoptosegene in den Knockdown- und den Kontrollzellen in Relation zur jeweiligen Expression von β -Actin. Abbildung 26 zeigt die Genexpression der Apoptosegene in den Knockdownzellen in Relation zu den Kontrollzellen.

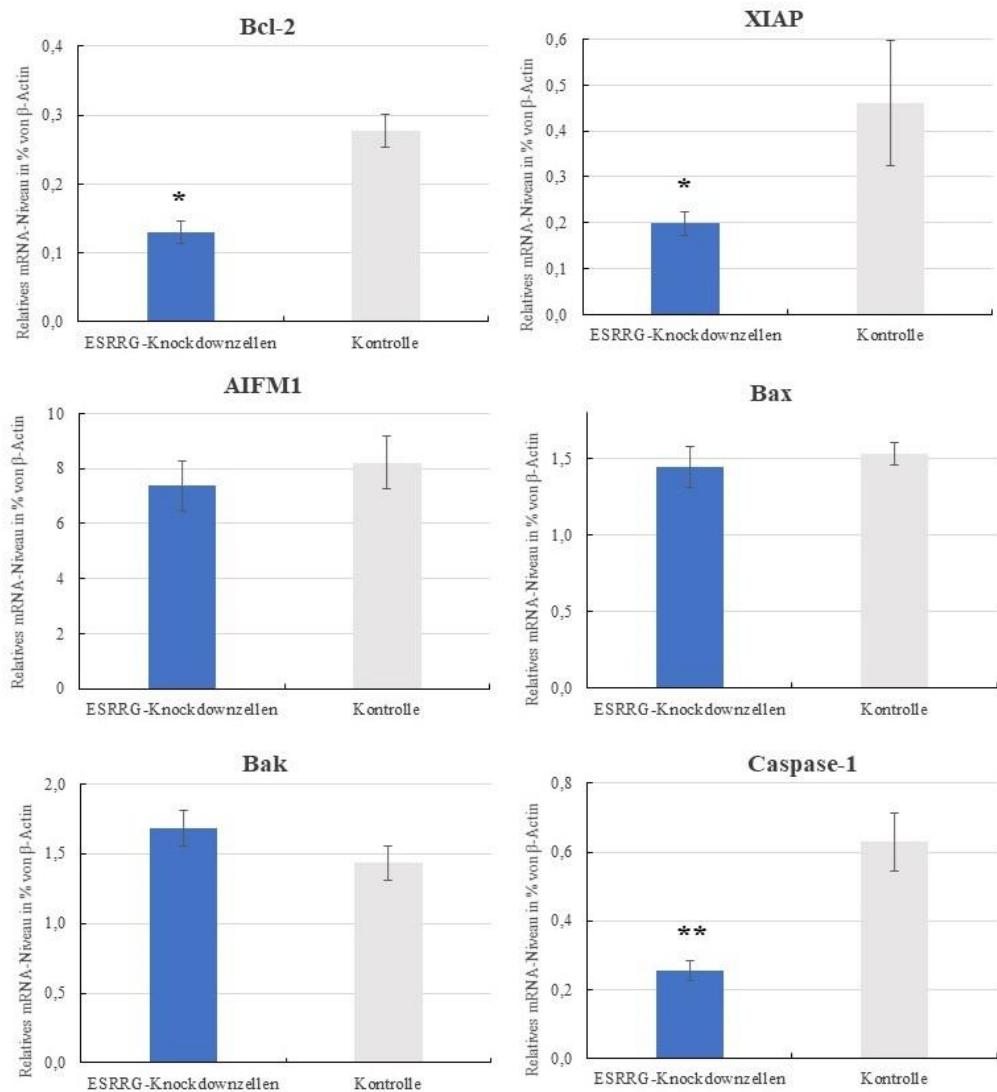


Abbildung 25: Genexpression von Bcl-2, XIAP, AIFM1, Bax, Bak und Caspase-1 in Relation zu β -Actin

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in den ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) und in den unspezifisch transfizierten Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, jeweils bezogen auf die Genexpression des Referenzgens β -Actin (festgesetzt als 100 %) und berechnet anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. MW \pm SD. n = 3, *p < 0,05 versus Kontrolle, **p < 0,01 versus Kontrolle

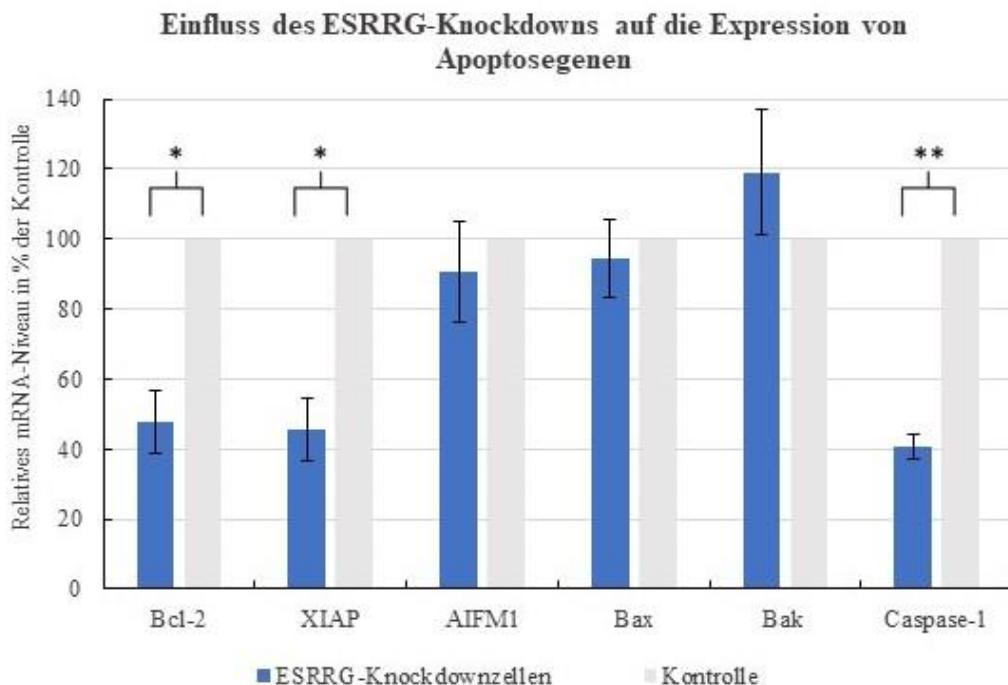


Abbildung 26: Genexpression von Bcl-2, XIAP, AIFM1, Bax, Bak und Caspase-1 in Relation zur Kontrolle

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, bezogen auf die Genexpression unspezifisch transzierter Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert, festgesetzt als 100 %). Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt und anhand des Referenzgens β -Actin und der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen normalisiert. MW \pm SD, n = 3, * p < 0,05 versus Kontrolle, ** p < 0,01 versus Kontrolle

5.3.3 Einfluss von $\text{ERR}\gamma$ auf epitheliale und mesenchymale Gene

Schließlich wurde die Genexpression der Adhäsionsproteine E-Cadherin und N-Cadherin sowie von Mucin-1 und Sciellin untersucht. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die relative Expression der genannten Gene in den ESRRG-Knockdownzellen in Relation zu den Kontrollzellen.

Untersuchtes Gen	Relatives mRNA-Niveau in ESRRG-Knockdownzellen (in % bezogen auf das mRNA-Niveau der Kontrollzellen)	p
E-Cadherin	86,9	0,006
Sciellin	48,9	0,003
Mucin-1	73,3	n.s.
N-Cadherin	131,9	0,014

Tabelle 12: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus von epithelialen und mesenchymalen Genen

Auflistung der mRNA-Niveaus der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-transfiziert) in % der Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung gegenüber β -Actin anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Signifikanz wird für p < 0,05 angenommen (Knockdownzellen versus Kontrolle).

n = 3, n.s. \triangleq nicht signifikant

Die Genexpression von E-Cadherin war in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant auf 86,9 % reduziert ($p = 0,006$). Auch das relative mRNA-Niveau von Sciellin lag in den ESRRG-Knockdownzellen bei 48,9 % ($p = 0,003$) und damit signifikant unter dem mRNA-Niveau desselben Gens in den Kontrollzellen. Die relative Genexpression von N-Cadherin lag im Mittel bei 131,9 % ($p = 0,014$) im Vergleich zu den Kontrollzellen und war damit signifikant hochreguliert. Dagegen blieb die Expression von Mucin-1 vom ESRRG-Knockdown unbeeinflusst.

Abbildung 27 zeigt die relative mRNA-Menge der epithelialen und mesenchymalen Gene in Relation zur mRNA-Menge des Housekeeping-Gens β -Actin in den ESRRG-siRNA-transfizierten Knockdownzellen und in den cosiRNA-transfizierten Kontrollzellen. In Abbildung 28 werden die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus der vier untersuchten epithelialen Gene in den ESRRG-Knockdownzellen in Relation zu den relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus derselben Gene in den Kontrollzellen grafisch dargestellt.

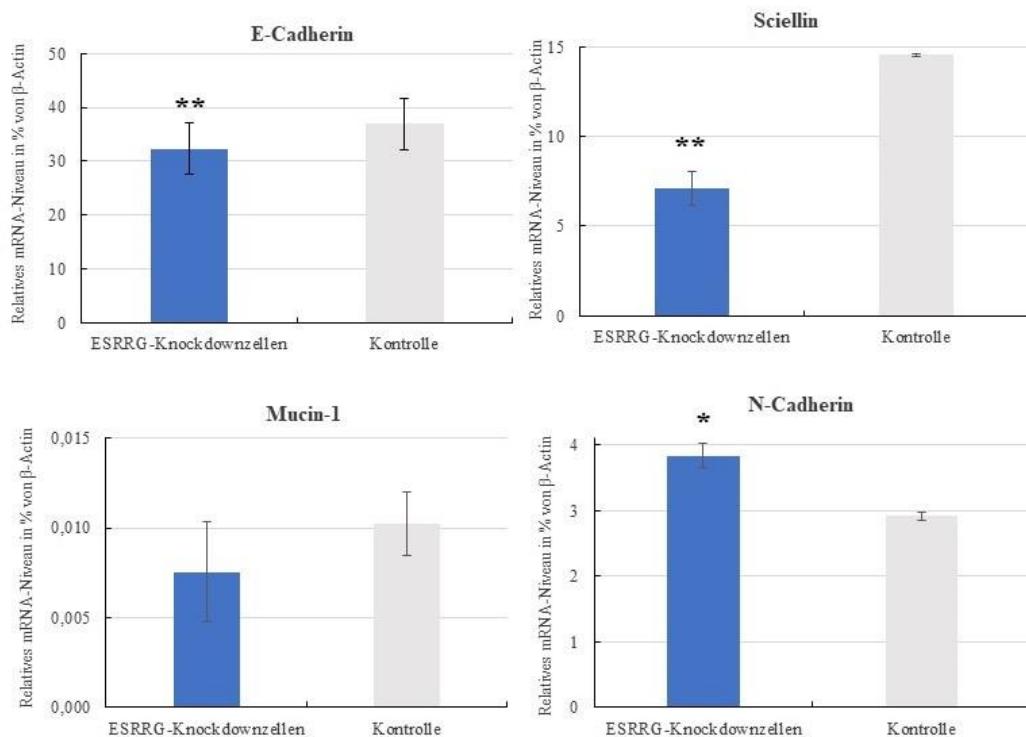


Abbildung 27: Genexpression von E-Cadherin, Sciellin, Mucin-1 und N-Cadherin in Relation zu β -Actin

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in den ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) und in den unspezifisch transfizierten Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, jeweils bezogen auf die Genexpression des Referenzgens β -Actin (festgesetzt als 100 %) und berechnet anhand der $\Delta\Delta CT$ -Methode nach Livak und Schmittgen. Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt. MW \pm SD. $n = 3$, * $p < 0,05$ versus Kontrolle, ** $p < 0,01$ versus Kontrolle

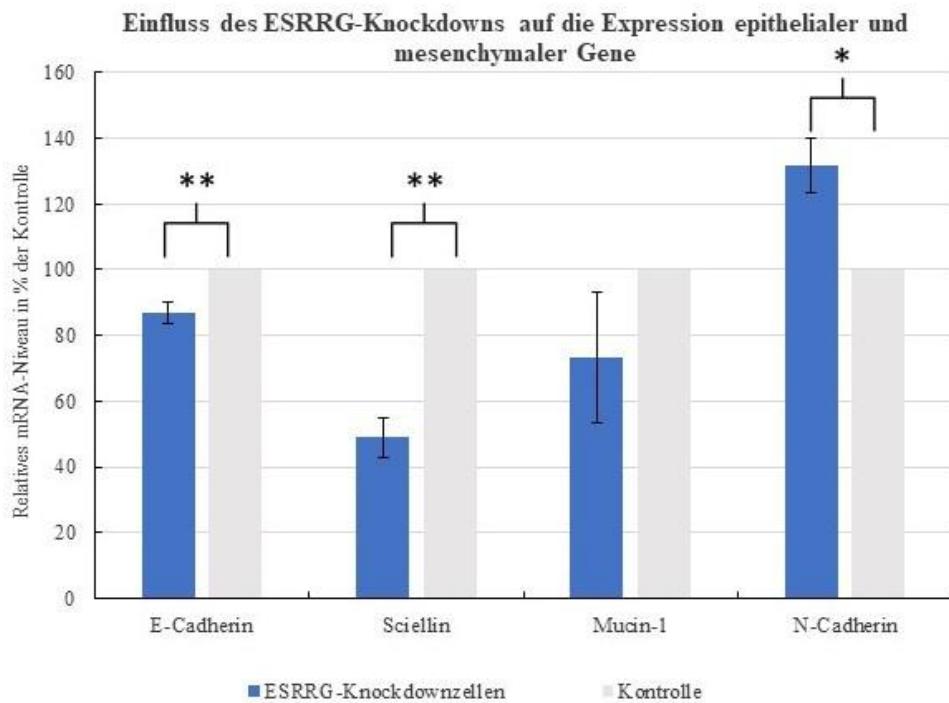


Abbildung 28: Genexpression von E-Cadherin, Sciellin, Mucin-1 und N-Cadherin in Relation zur Kontrolle.

Gezeigt wird die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene in ESRRG-Knockdownzellen (20 nM ESRRG-siRNA-transfiziert) der Zelllinie OVCAR-3, bezogen auf die Genexpression unspezifisch transzierter Kontrollzellen (120 nM cosiRNA-transfiziert, festgesetzt als 100 %). Die Gen-mRNA-Menge wurde mittels qPCR bestimmt und anhand des Referenzgens β -Actin und der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen normalisiert. MW \pm SD, n = 3, * p < 0,05 versus Kontrolle, ** p < 0,01 versus Kontrolle

Die beobachteten Veränderungen der Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Gene durch ESRRG-Knockdown ergeben ein einheitliches Bild: Während die Genexpression von E-Cadherin und Sciellin signifikant herunterreguliert wurde, war eine Hochregulation von N-Cadherin, das in der mesenchymal-epithelialen Transition die Rolle eines Gegenspielers von E-Cadherin einnimmt, zu beobachten. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen des ersten Versuchsteils – dem verstärkten Zellwachstum in den Zellen mit reduzierter ESRRG-Expression.

6 DISKUSSION

6.1 Einfluss von ERR γ auf das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen

Eine hohe Expression von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen ist mit einem länger progressionsfreien Krankheitsverlauf assoziiert (159). Diese Beobachtung von Sun et al. gab Anlass dazu, die Rolle von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen genauer zu betrachten. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, sowohl den Einfluss dieses Rezeptors auf das Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen als auch die molekularen Mechanismen, die diese Effekte vermitteln.

Die vorliegende Arbeit konnte zunächst die durch Sun et al. postulierte tumorsuppressive Wirkung von ERR γ im Ovarialkarzinom bestätigen (159). Im ersten Versuchsteil wurde der siRNA-vermittelte Knockdown von ERR γ bzw. ESRRG in den Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 etabliert. Es erfolgte eine Verifizierung des Knockdowns auf mRNA-Ebene via RNA-Isolation, reverser Transkription und qPCR zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. Die Expression von ESRRG konnte anhand des in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Transfektionsprotokolls auf durchschnittlich 15 - 25 % reduziert werden – in Relation zu mit unspezifischer cosiRNA transfizierten Kontrollzellen. Die Effizienz des transienten Knockdowns nahm von 72 h auf 96 h nach Transfektion nicht signifikant ab. Es bestand weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion mit niedrigerer (10 nM) und mit höherer (20 nM) Konzentration der ESRRG-siRNA bezüglich des Knockdown-Erfolgs.

Die Anzahl viabler ESRRG-Knockdownzellen wurde an mehreren Tagen via CTB-Assay gemessen und jeweils mit der Anzahl der Kontrollzellen verglichen. Dadurch konnten Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten bzw. die Proliferation der ESRRG-Knockdownzellen 3 bis 6 Tage nach Aussaat gezogen werden. Bei Aussaat geringer Zellzahlen (500, 1000, 2000) pro 96-Well waren nur sehr vereinzelt signifikante Abweichungen der Anzahl viabler Zellen zwischen Knockdown- und Kontrollgruppe über den Messzeitraum zu verzeichnen. Ursache für diese inkonsistenten Ergebnisse könnte einerseits sein, dass die geringeren Zellzahlen anfälliger für die Toxizität der siRNA und des Transfektionsreagenz waren und so in ihrem Wachstum zu stark eingeschränkt wurden. Andererseits könnte auch die Fehler-

wahrscheinlichkeit bei Aussaat dieser geringeren Zellzahlen recht hoch gewesen sein, sodass bereits die Ausgangswerte an Tag 0 innerhalb und zwischen den beiden Gruppen variierten.

Bei der Aussaat von 4000 Zellen/96-Well dagegen zeigten sich an jedem Messtag signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es wurde deutlich, dass die Zellen mit geringerer Expression von ESRRG bzw. ERR γ ein signifikant stärkeres Wachstum aufwiesen als die Kontrollzellen, die in ihrer ESRRG-Expression unbeeinträchtigt waren. Daraus kann die These abgeleitet werden, dass ERR γ durch Beeinflussung des Wachstumsverhalten der Zellen eine antiproliferative und damit tumorsuppressive Wirkung auf Ovarialkarzinomzellen ausübt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung von Sun et al., dass ERR γ im klinischen Kontext einen günstigen prognostischen Marker darstellt (159).

Als experimentelle Limitation der beschriebenen Ergebnisse muss erwähnt werden, dass der Nachweis des ESRRG-Knockdowns nur auf mRNA-Ebene erfolgte und nicht zusätzlich auf Proteinebene via Western Blot verifiziert wurde. Des Weiteren muss darauf hingewiesen werden, dass die Bestimmung der Knockdown-Effizienz und die Viabilitätsmessung nicht innerhalb derselben Zellpopulation durchgeführt werden konnten. Die Versuchsauswertung basierte auf der Annahme, dass sich die am Beginn einer Versuchsreihe unter gleichen Bedingungen transfizierten Zellen in der Folge identisch verhielten. Diese Problematik wurde bereits in Kapitel 4.5 ausführlich erklärt und schematisch dargestellt.

Es stellt sich nun die Frage, durch welche molekularen Mechanismen der beobachtete proliferative Effekt des ESRRG-Knockdowns bzw. der antiproliferative Effekt von ERR γ vermittelt wird. Das folgende Kapitel betrachtet daher die Expressionsveränderungen verschiedener Gene, die der Wirkung von ERR γ auf das Wachstum der Krebszellen zugrunde liegen könnten.

6.2 Einfluss von ERR γ auf die Genexpression in Ovarialkarzinomzellen

Die ERR haben nicht nur durch ihre Interaktion mit Östrogen-Signalwegen oder ihre Funktionen als Regulatoren des Metabolismus Einfluss auf die Tumorentstehung (siehe Kapitel 1.2.5), sondern auch durch direkte Bindung an und Modulation von potentiell an der Karzinogenese beteiligten Genen. Dabei handelt es sich vor allem um Gene für Wachstum, Proliferation und Migration (147) (149). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die ERR γ -vermittelte Veränderung der Expression von Genen, die eine Rolle in der Karzinogenese spielen, genauer in den Blick genommen werden. Im zweiten Versuchsteil wurden daher die molekularen Effekte von ERR γ in Ovarialkarzinomzellen anhand von Expressionsanalysen von Genen der Proliferation, von Genen des programmierten Zelltods und von epithelialen und mesenchymalen Genen ermittelt. Dafür erfolgte eine Genexpressionsanalyse via qPCR in ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu mit cosiRNA transfizierten Kontrollzellen.

6.2.1 Einfluss von ERR γ auf Proliferationsgene

Zunächst wurde die Expression der proliferationsassoziierten Gene von Cyclin D1, Cyclin E2, p21^{Cip1/Waf1}, Cyclin A2, CDK2, und des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Der ESRRG-Knockdown bewirkte eine signifikante Reduktion der Genexpression von Cyclin A1 und Cyclin D1, während sich die Genexpression von Cyclin E2, p21^{Cip1/Waf1}, CDK2 und Ki-67 in den Knockdownzellen nicht signifikant von der jeweiligen Expression in den Kontrollzellen unterschied. Diese Ergebnisse können die in Kapitel 6.1 beschriebene Beobachtung, dass Zellen mit geringerer ESRRG-Expression ein signifikant stärkeres Wachstum aufwiesen als die Kontrollzelle, nicht erklären – im Gegenteil: Es wäre am ehesten eine Hochregulation der Cycline, CDK und Ki-67 sowie eine Herunterregulation des CDK-Inhibitors p21^{Cip1/Waf1} durch ESRRG-Knockdown zu erwarten gewesen. Im Folgenden werden die untersuchten Gene bzw. deren Bedeutung für das Tumorzellwachstum genauer vorgestellt.

6.2.1.1 Einordnung der untersuchten Gene in den Zellzyklus

Eines der Charakteristika von Krebszellen ist der Verlust der Kontrolle des Zellzyklus, der zu ungehemmter Zellproliferation führt (210). Der Zellzyklus lässt sich folgendermaßen gliedern und dessen wichtigste Mechanismen wie folgt beschreiben (zitiert nach den Reviews (211), (212), (213), (214), (215) und (216)):

In der G₁-Phase werden in der Zelle Proteine, Zellorganellen und Nukleotide für die DNA-Replikation synthetisiert, die in der darauffolgenden S-Phase erfolgt; in der G₂-Phase werden Replikationsfehler repariert und die Zelle wird auf die Mitose vorbereitet, die anschließend in der M-Phase stattfindet. Terminal differenzierte Zellen befinden sich in der G₀-Phase, die auch als Ruhephase bezeichnet wird. Der Übergang zwischen diesen Phasen wird reguliert durch CDKs (Cyclin-Dependent Kinases bzw. Cyclin-abhängige Kinasen) und phasenspezifisch exprimierte Cycline, die miteinander heterodimere Komplexe bilden. Durch die Bindung der Cycline wird die Kinase-Funktion der CDKs aktiviert, sodass die Phosphorylierung verschiedener Signalproteine erfolgen kann, die schließlich den Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste einleiten.

In der G₁-Phase ist der Komplex aus Cyclin D und CDK4 bzw. 6 von Bedeutung, der durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F bewirkt. Dadurch kommt es zur E2F-vermittelten Transkription von Cyclin E, das zusammen mit CDK2 den Eintritt in die S-Phase initiiert. Der Komplex Cyclin E/CDK2 ist an der Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins im Sinne einer positiven Rückkopplung beteiligt, sodass durch E2F zahlreiche für die DNA-Replikation benötigte Gene transkribiert und deren Genprodukte synthetisiert werden können. In der S-Phase angekommen ersetzt Cyclin A Cyclin E im Komplex mit CDK2 und reguliert durch die Phosphorylierung von Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie die DNA-Replikation. Am Ende der S-Phase wechselt Cyclin A seinen Interaktionspartner und assoziiert mit CDK1. In der G₂-Phase wird Cyclin A schließlich durch Cyclin B ersetzt und der Komplex Cyclin B/CDK1 triggert die Progression der G₂-Phase zur M-Phase.

Das Fortschreiten des Zellzyklus kann durch sogenannte CDK-Inhibitor-Proteine beeinflusst werden. Diese Proteine werden zwei verschiedenen Familien zugeordnet: Während die Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} als Vertreter der INK4-Familie die Aktivität der CDK4 und CDK6 durch kompetitive Verdrängung von Cyclin D inhibieren, können die Proteine p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} der CIP/KIP-Familie alle Cyclin-CDK-Komplexe binden und deren Aktivität modulieren. Es kann vereinfacht gesagt werden, dass die CIP/KIP-

Proteine die CDK-2-Aktivität hemmen, während sie CDK4 und CDK6 sowohl inhibieren als auch aktivieren können.

Die folgende Grafik fasst die geschilderten Zusammenhänge abschließend schematisch zusammen:

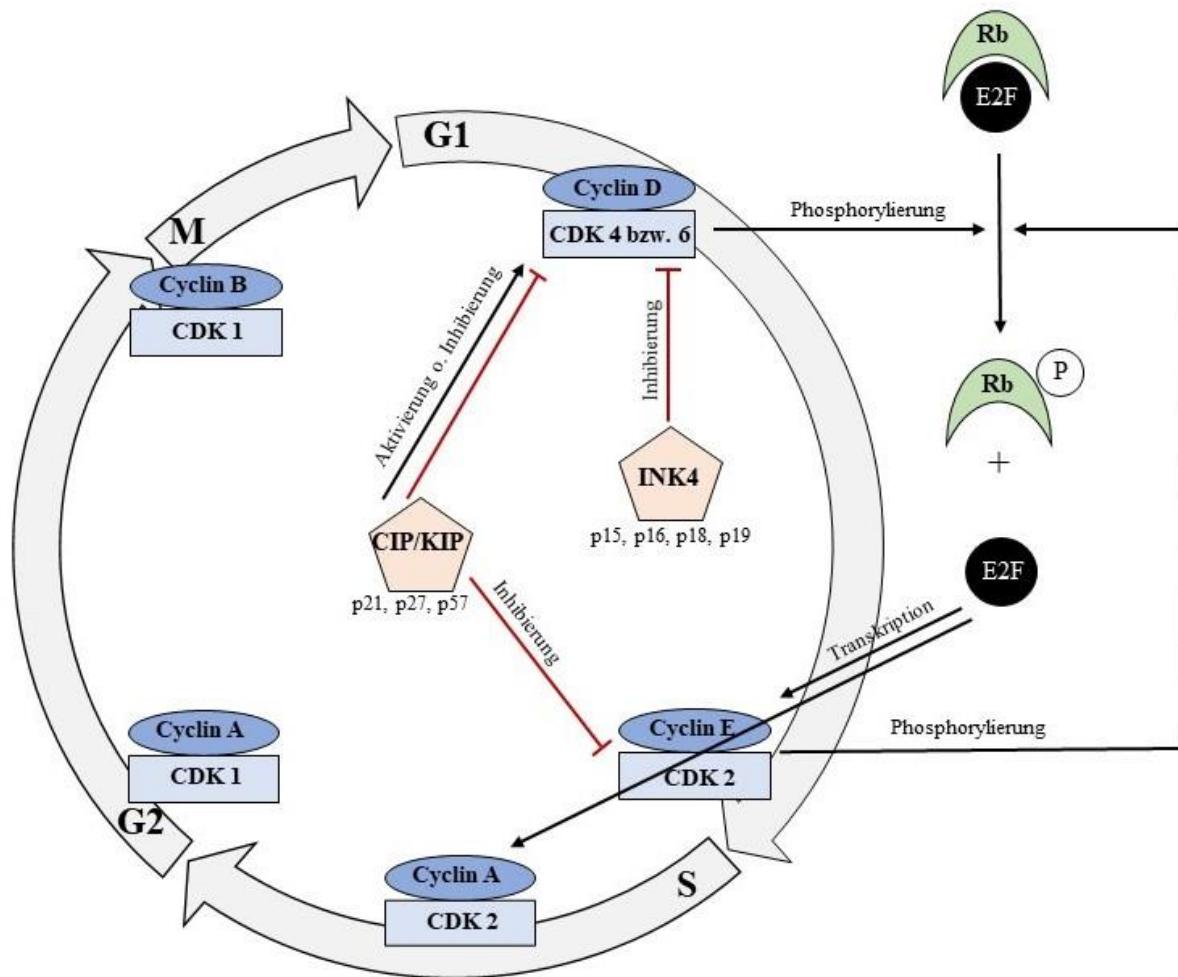


Abbildung 29: Vereinfachte schematische Darstellung des Zellzyklus

Gezeigt wird die Einteilung des Zellzyklus in die Phasen G₁, S, G₂ und M, aus Gründen der Übersichtlichkeit ohne Darstellung der G₀-Phase. Die G₁-S Transition wird durch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (initiiert durch Cyclin D/CDK 4 bzw. 6) und die anschließende Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F in Gang gesetzt. E2F vermittelt die Gentranskription von Cyclin E, Cyclin A und von weiteren für die DNA-Synthese benötigten Gene. Cyclin E/CDK2 tragen via Phosphorylierung des Retinoblastomproteins zu einer positiven Rückkopplung dieses Vorgangs bei. Durch die CDK-Inhibitoren der CIP/KIP- und INK4-Familie besteht ein zusätzlicher Kontrollmechanismus.

Rb = Retinoblastom-Protein, P = Phosphatrest, Grafik modifiziert nach (212) und (214)

6.2.1.2 Cyclin D1

Wie oben beschrieben, trägt Cyclin D zur Progression der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus bei. Cyclin D kann onkogene Funktionen ausüben, indem durch eine Beschleunigung des Zellzyklus die Zellproliferation und dadurch die Tumorgenese gefördert wird (217). Die drei Cyclin D-Isoformen Cyclin D1, Cyclin D2 und Cyclin D3 werden gewebespezifisch exprimiert (212). In der Literatur wurde eine Überexpression von Cyclin D1 in diversen Tumorentitäten beschrieben (217), darunter auch im Ovarialkarzinom (218) (219). Während in einigen Publikationen kein Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression in Ovarialkarzinomzellen und Tumorstadium, Tumorgrading oder klinischem Outcome festgestellt werden konnte (218) (220), berichten andere Autoren von der signifikanten Assoziation einer Cyclin D1-Überexpression mit aggressivem Phänotyp sowie schlechterer Prognose bei Ovarialkarzinompatientinnen (221) (222) (223).

Es liegt eine Studie vor, die eine reduzierte Cyclin D1-Expression bei reduzierter Proliferation von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* beobachtete (219). Demnach wäre im Rahmen der vorliegenden Versuche in den stärker proliferierenden ESRRG-Knockdownzellen eine Hochregulation von Cyclin D1 im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erwarten gewesen. Die vorliegende Arbeit ergab aber überraschenderweise eine signifikante Reduktion der Expression von Cyclin D1 in den Knockdownzellen. Ein Erklärungsansatz für das verstärkte Zellwachstum trotz Reduktion der Genexpression von Cyclin D1 könnte sein, dass der Zellzyklus in den untersuchten Zellen durch andere Regulationsmechanismen weiter fortschreiten konnte. Es wurde in mehreren Studien davon berichtet, dass Cyclin E den Verlust von Cyclin D kompensieren könnte (224) (225) (226). Das bedeutet, dass trotz Herunterregulierung von Cyclin D eine Zellzyklus-Progression durch Vorhandensein von Cyclin E begünstigt wird. Dies könnte auch bei den vorliegenden Experimenten der Fall gewesen sein und die fehlende antiproliferative Wirkung der Cyclin D1-Expressionsreduktion erklären.

Masamha et al. konnten diesen Kompensationsmechanismus in einer anderen Ovarialkarzinomzelllinie allerdings nicht beobachten (227). Die Arbeitsgruppe konnte durch Verlust von Cyclin D1 einen G₁-Arrest trotz kontinuierlicher Cyclin E2-Expression induzieren. Sie erklärten die fehlende Kompensation durch Cyclin E2 durch die p21^{Cip1/Waf1}-vermittelte Inhibition der CDK2-Aktivität (227): Wenn weniger Cyclin D1 vorhanden sei, stehe mehr p21^{Cip1/Waf1} frei zur Verfügung, das statt an den Komplex von Cyclin D1/CDK 4 bzw. 6 vermehrt an den Komplex Cyclin E2/CDK2 binde und dessen Aktivität hemme. Dadurch werde ein durch Cyclin E induziertes Fortschreiten des Zellzyklus verhindert. Interessant wären in

diesem Zusammenhang weitere Versuche, die die Expression und den Phosphorylierungsstatus des Retinoblastom-Proteins sowie die Aktivität von E2F in den ESRRG-Knockdownzellen und Kontrollzellen vergleichen.

Außerdem wurde in Magenkarzinomzellen nachgewiesen, dass ESRRG keinen direkten inhibierenden oder aktivierenden Einfluss auf Cyclin D1 hat (156). Allerdings unterdrückte die Induktion einer ERR γ -Überexpression die Wnt-Signalkaskade durch Blockade der Bindung des Transkriptionsfaktors TCF4/LEF1 an den Promotor des Gens von Cyclin D1 (156). Die Autoren folgerten, dass der tumorsuppressive Effekt von ERR γ in Magenkarzinomzellen unter anderem auf eine Antagonisierung des Wnt-Signalwegs zurückzuführen sei. Auch eine ERR γ -Aktivierung durch den spezifischen Agonisten DY131 supprimierte die Expression von Genen des Wnt-Signalwegs und inhibierte dadurch das Krebszellwachstum (156). Der Einfluss von ERR γ bzw. des ESRRG-Knockdowns auf die mit dem Wnt-Signalweg assoziierten Gene in Ovarialkarzinomzellen sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

6.2.1.3 Cyclin E2

Die beiden Cyclin E-Isoformen (Cyclin E1 und Cyclin E2) sind im Komplex mit CDK2 – wie Cyclin D1/CDK 4 bzw. 6 – ebenfalls an der Progression der G₁- zur S-Phase beteiligt. Eine Überexpression von Cyclin E in Tumorgeweben ist assoziiert mit Zellproliferation und schlechterer Prognose (228). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keine signifikante Veränderung der Cyclin E2-Expression durch ESRRG-Knockdown.

Die Transkription bzw. Expression von Cyclin E2 wird durch die Cyclin D1-vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und anschließende Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F reguliert. Da in den ESRRG-Knockdownzellen Cyclin D1 signifikant herunterreguliert war, stellt sich die Frage, warum dies die Cyclin E2-Expression nicht beeinflusste. Es ist davon auszugehen, dass in der in dieser Arbeit untersuchten Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 die Cyclin E2-Expression unabhängig von Cyclin D1 reguliert wird. Darauf gibt es auch in einer anderen Ovarialkarzinomzelllinie bereits Hinweise (227). Wie im Kapitel 6.4.1.2 bereits beschrieben, könnte Cyclin E2 die Herunterregulierung von Cyclin D1 in den vorliegenden Experimenten kompensiert haben und so zum regelrechten Fortschreiten des Zellzyklus beigetragen haben.

6.2.1.4 CDK2

Die CDK2 ist eine Cyclin-abhängige Kinase, die an der Regulation des Übergangs der G₁- in die S-Phase beteiligt ist (siehe Kapitel 6.2.1.1.). In vielen Tumorentitäten trägt CDK2 zur Vermittlung onkogener Signale und zum Tumorwachstum bei (229) (230). Auch in Ovarialkarzinomzellen wurde eine Assoziation zwischen einer Überexpression von CDK2 und einer Steigerung der Zellproliferation beobachtet (231) (232).

Der proliferative Effekt des ESRRG-Knockdowns ist jedoch nicht auf eine Hochregulation der CDK-2-Expression zurückzuführen: Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen des Knockdowns auf die CDK-2-Expression.

6.2.1.5 P21^{CIP1/WAF1}

P21^{CIP1/WAF1} verhindert durch Inhibition der CDK-2-Aktivität den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase und induziert dadurch ein Sistieren des Zellzyklus (233). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinen signifikanten Effekt des ESRRG-Knockdowns auf die Expression von P21^{CIP1/WAF1}. Es gibt jedoch einige Publikationen, die bei anderen Tumorentitäten einen Zusammenhang zwischen ERR γ - und p21^{Cip1/Waf1}-Expression beschreiben:

Yu et al. beobachteten bei retroviraler Transduktion von ERR γ in Prostatakarzinom-Zelllinien mit niedriger ERR γ -Expression eine Reduktion des Zellwachstums in vitro und der Kanzerogenität in vivo (153). Dieser Effekt ließ sich auf einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase aufgrund erhöhter p21^{Cip1/Waf1}- und p27^{Kip1}-Expression zurückführen. Yu et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass ERR γ seine antiproliferative Wirkung im Prostatakarzinom durch direkte Transaktivierung der Gen-Promotoren von p21^{Cip1/Waf1} und p27^{Kip1} vermittelt (153).

Im Gegensatz dazu steht die von Kim et al. untersuchte Rolle von ERR γ im hepatozellulären Karzinom: Hier scheint ERR γ p21^{Cip1/Waf1} und p27^{Kip1} zu unterdrücken und dementsprechend onkogen statt tumorsuppressiv zu wirken (150). Sowohl ein Knockdown von ERR γ als auch der inverse ERR γ -Agonist GSK5182 induzieren in Leberkarzinomzellen einen Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase via p21^{Cip1/Waf1} und p27^{Kip1}. Auch ERR α aktiviert den Promotor von p21^{Cip1/Waf1} und müsste deswegen ebenfalls mit einer niedrigeren Proliferationsrate einhergehen (122) (234). Dies widerspricht den Beobachtungen, dass eine hohe ERR α -Expression in verschiedenen Tumorgeweben mit einer schlechten Prognose und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert ist (siehe Kapitel 1.2.5.1). Bianco et al. versuchen dieses Paradoxon durch die Hypothese zu erklären, dass ERR α die p21^{Cip1/Waf1}-Expression vor allem gemeinsam mit dem sonst als Korepressor wirkenden RIP140 aktiviere und daher nur bei niedrigen RIP140-

Konzentrationen proliferativ wirke (234). Die Wirkung von $ERR\gamma$ auf $p21^{Cip1/Waf1}$ scheint also sowohl vom zellulären Kontext als auch von der Anwesenheit von Kofaktoren abhängig zu sein.

6.2.1.6 Cyclin A2

Man unterscheidet zwei verschiedene Typen von Cyclin A: Während Cyclin A1 hauptsächlich während der Meiose und Embryogenese exprimiert wird, ist Cyclin A2 ubiquitär in proliferierenden Zellen zu finden (235). In der Literatur wurde eine erhöhte Cyclin A2-Expression in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (228) (235). Das Expressionsniveau von Cyclin A2 eignet sich dabei als prognostischer Marker, der mit einer schlechteren Überlebensrate einhergeht (228) (235). Auch im Ovarialkarzinom wurde eine Überexpression von Cyclin A2 beobachtet (236) (237), die unter anderem mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist (238).

Die Inhibition der Cyclin A2/CDK-Komplexe beeinträchtigt das Tumorzellwachstum in vivo und in vitro (239) (240). So war eine Herunterregulierung von Cyclin A2 im Mausmodell mit reduzierter Tumorzellproliferation assoziiert (240). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen überraschenderweise eine signifikante Expressionsreduktion von Cyclin A2 bei ESRRG-Knockdown. Dies scheint im Widerspruch damit zu stehen, dass die Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen stärker proliferierten. Es ist nicht abschließend geklärt, ob die in vielen Tumorentitäten beobachtete erhöhte Cyclin A2-Expression wirklich Ursache der Tumorgenese oder lediglich Folge der erhöhten Zellproliferation in Tumorgeweben ist (235). Yam et al. schreiben Cyclin A auch eine Beteiligung am Zellzyklus-Checkpoint zu, an dem die DNA auf Fehler kontrolliert wird. Daraus folgern sie, dass anstelle einer Überexpression von Cyclin A2 vielmehr eine Reduktion von Cyclin A2 zur Tumorgenese beitragen könnte (235).

Dennoch wäre bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Cyclin A2-Expression im Vergleich zur Kontrolle als Ausdruck der hohen Proliferationsrate zu erwarten gewesen. Allerdings war in den ESRRG-Knockdownzellen, wie bereits ausführlich beschrieben, die Cyclin D1-Expression signifikant reduziert. Die Cyclin A-Expression ist unter anderem abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F durch Cyclin D1/CDK 4 bzw. 6 (235). Die Herunterregulierung der Cyclin A2-Aktivität könnte also lediglich eine Folge der Cyclin D1-Herunterregulierung sein.

6.2.1.7 Ki-67

Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das durch das Gen MKI67 kodiert wird. Es wird in proliferierenden Zellen während des gesamten Zellzyklus exprimiert – nicht aber in den ruhenden Zellen der G₀-Phase (241) (242) (243). Daher dient es bei vielen Tumorentitäten als Marker für das Zellwachstum (244). Eine Metaanalyse, die 38 Studien und 5004 Patientinnen mit Ovarialkarzinom inkludierte, bestätigte eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen Ki-67-Expression und einem reduzierten Gesamt-Überleben (245). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Ki-67 auch im Ovarialkarzinom als prognostischer Marker dienen könnte. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Ovarialkarzinomzellen bei ESRRG-Knockdown eine signifikant verstärkte Proliferation aufwiesen, war die Ki-67-Expression nicht signifikant erhöht.

6.2.1.8 Zusammenfassung: ERR γ im Zellzyklus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Expression der genannten Proliferationsgene in ESRRG-Knockdownzellen geben keinen Hinweis darauf, wie die antiproliferative Wirkung von ERR γ auf Ovarialkarzinomzellen vermittelt wird. Ein Teil der Ergebnisse – die signifikante Expressionsreduktion von Cyclin D1 und A2 – scheint mit dem Einfluss des ESRRG-Knockdowns auf die Zellproliferation auf den ersten Blick sogar im Widerspruch zu stehen. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtungen könnte sein, dass die unveränderte Cyclin E2-Expression die Herunterregulation von Cyclin D1 kompensierte und dadurch ein Fortschreiten des Zellzyklus gewährleistet wurde. Die Expressionsreduktion von Cyclin A2 ist in diesem Zusammenhang lediglich als Folge der Veränderung der Cyclin D1-Expression zu sehen. Der im ersten Teil der Arbeit entdeckte Effekt von ERR γ auf das Wachstum der Ovarialkarzinomzellen scheint also auf andere molekulare Mechanismen zurückzuführen sein als auf die Veränderung der Expression der untersuchten Proliferationsgene.

6.2.2 Einfluss von ERR γ auf Gene des programmierten Zelltods

Weiterhin wurde untersucht, ob der proliferative Effekt des ESRRG-Knockdowns mit einer Veränderung der Expression von Genen des programmierten Zelltods bzw. Genen der Apoptose und Pyroptose einhergeht. Sowohl die Expression der beiden antiapoptotischen Gene XIAP und Bcl-2 als auch die Expression des proapoptotischen Gens der Caspase-1 war in den Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Die proapoptotischen Gene Bax, Bak und AIFM1 dagegen unterschieden sich in ihrer Expression in den ESRRG-Knockdownzellen nicht signifikant von ihrer Expression in den Kontrollzellen. Im Folgenden werden die Mechanismen der Apoptose und Pyroptose sowie die damit assoziierten untersuchten Gene genauer betrachtet.

6.2.2.1 Einordnung der untersuchten Gene in den programmierten Zelltod

„Programmierter Zelltod“ ist ein Überbegriff für verschiedene Formen des durch die Zellen selbst induzierten und kontrolliert ablaufenden Zelltods – im Gegensatz zum passiven Prozess der Nekrose, der durch pathologische Stimuli ausgelöst wird (246). Während die Apoptose die Selbstzerstörung der Zelle ohne entzündliche Schädigung des umliegenden Gewebes herbeiführt (247), geht die Pyroptose mit einer Inflammationsreaktion einher (248). Defekte in der Vermittlung dieser beiden Mechanismen können zur Karzinogenese und zum Tumorzellwachstum beitragen, indem entartete Zellen nicht eliminiert, sondern vor dem Zelluntergang bewahrt werden und akkumulieren (210) (249). Die zwei genannten Varianten des programmierten Zelltods werden nun getrennt voneinander kurz beschrieben.

Apoptose

Die Apoptose kann über verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Hauptsächlich erfolgt sie über den extrinsischen (bzw. Todesrezeptor-assozierten) oder den intrinsischen (bzw. mitochondrialen) Weg, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden (250). Die folgende Kurzzusammenfassung dieser Mechanismen orientiert sich an den Referenzen (250), (251) und (252).

- a) Die extrinsische Signalkaskade beginnt mit der Bindung extrazellulärer Faktoren an sogenannte Todesrezeptoren. Die intrazelluläre Domäne der Todesrezeptoren rekrutiert daraufhin Adapterproteine. Dieser Komplex aus Ligand, Rezeptor und Adapterprotein wird als DISC (Death-Inducing Signaling Complex) bezeichnet. Der DISC aktiviert die Cystein-Aspartat-Protease Caspase-8. Die Caspase-8 ist eine Initiatorcaspase und spaltet

nachgeschaltete Vorstufen sogenannter Effektorcaspasen, die dadurch aktiv werden und durch Schneidung zellulärer Proteine den Zelltod verursachen.

- b)** Die intrinsische Signalkaskade wird durch intrazelluläre Stimuli wie irreparable DNA-Schädigung oder oxidativen Stress in Gang gesetzt. Dies führt zu einer erhöhten mitochondrialen Permeabilität und zum Austritt von Cytochrom c und weiterer proapoptotischer Faktoren (darunter auch AIF) aus dem Mitochondrium ins Zytosol. Dieser Schritt wird durch Proteine der sogenannten Bcl-2-Familie reguliert, unter deren Mitgliedern man proapoptotische (z. B. Bax, Bak) und antiapoptotische (z. B. Bcl-2) Proteine unterscheidet. Während Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c fördern, blockiert Bcl-2 diesen Vorgang. Dabei spielt nicht die absolute Anzahl der verschiedenen Bcl-2-Proteine eine Rolle, sondern viel mehr das Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren. Cytochrom c bildet im Zytosol mit Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) und der Initiatorcaspase Caspase-9 einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird. Die Caspase- 9 wird dadurch aktiviert.

Beide Signalwege enden schließlich in der Aktivierung der Caspase-3 und weiterer Effektor-Caspasen und damit im apoptotischen Zerfall der Zelle unter Aufrechterhaltung der Membranintegrität (250). Die Proteine der IAP-Familie (z. B. XIAP) stellen ein weiteres Kontrollsysteem der Apoptose dar, indem sie die Aktivität der Caspasen hemmen (253).

Pyroptose

Der im Folgenden geschilderte Ablauf der Pyroptose wurde den Reviews (249), (254) und (255) entnommen:

Die Pyroptose wird hauptsächlich durch sogenannte Inflammasomen vermittelt. Inflammasomen sind zytosolische Proteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, die aus einem Rezeptorkomplex, einem Adaptorprotein und dem Effektorenzym Caspase-1 bestehen. Sobald die Rezeptoren Pathogene oder weitere stressassoziierte Reize erkennen, wird die Caspase-1 durch das Adaptorprotein aktiviert. Die aktive Caspase-1 induziert die Reifung von Vorstufen proinflammatorischer Zytokine und prozessiert das zytosolische Protein Gasdermin D (GSDMD). Die Spaltprodukte von GSDMD oligomerisieren und bilden transmembranöse Poren. Durch diese treten die Interleukine IL-18 und IL-1 β , die durch die Caspase-1 aktiviert wurden, aus und rufen eine Entzündungsreaktion hervor: Es kommt zur Zellschwellung, zur osmotischen Zellyse und schließlich zur Freisetzung von Zellbestandteilen. Zusätzlich sind auch weitgehend Caspase-1-unabhängige Wege der Pyroptose bekannt:

Sowohl die inflammatorischen Caspaseen Caspase-4 und -5 können die Pyroptose in Gang setzen als auch die an der Apoptose beteiligte Caspase-3.

Die folgende Grafik stellt die geschilderten Vorgänge der Apoptose und der Pyroptose abschließend schematisch dar.

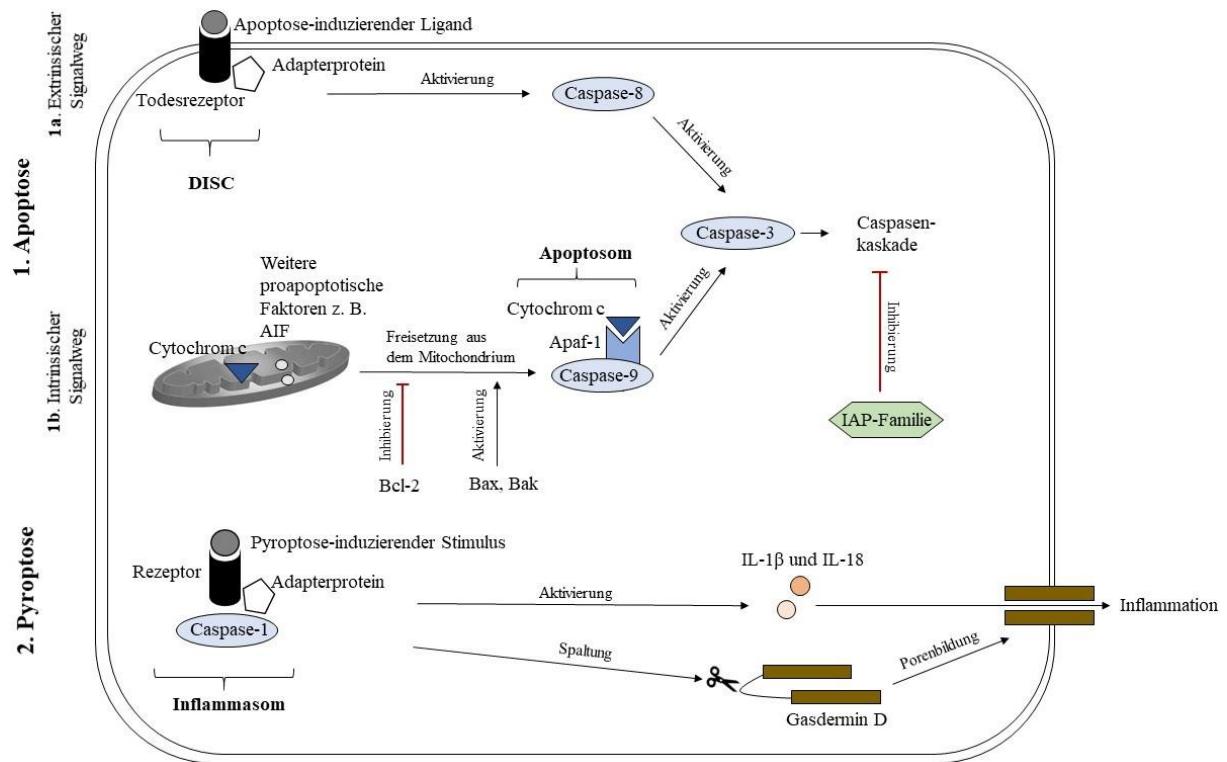


Abbildung 30: Vereinfachte schematische Darstellung der Mechanismen der Apoptose (1a und 1b) und der Pyroptose (2)

1a. Extrinsischer bzw. Todesrezeptor-assozierter Signalweg der Apoptose:

Nach Bindung eines Apoptose-induzierenden Liganden an den Todesrezeptor bildet sich der DISC (Death Inducing Signaling Complex) aus Ligand, Rezeptor und Adapterprotein. Im Anschluss kommt es zur Aktivierung der Caspase-8, die über die Aktivierung der Caspase-3 die Caspasekaskade auslöst, die zum apoptotischen Zelltod führt.

1b. Intrinsischer bzw. mitochondrialer Signalweg der Apoptose:

Durch intrazelluläre Apoptosesignale kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium. Die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran wird durch Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert. Cytochrome c bildet im Zytosol mit Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) und Caspase-9 das Apoptosom. Die dadurch aktivierte Caspase-9 leitet ebenfalls über die Aktivierung der Caspase-3 die Caspasekaskade und den apoptotischen Zelltod ein.

Die Proteine der IAP-Familie, die verschiedene Caspaseen inhibieren, fungieren als zusätzliche Regulatoren der extrinsischen und intrinsischen Apoptose.

2. Pyroptose:

Nach Bindung bestimmter extra- oder intrazellulärer Faktoren kommt es zur Bildung des Inflammasoms aus Adapterprotein, Rezeptor und Caspase-1, die dadurch aktiviert wird. Die Caspase-1 aktiviert nun die Interleukine IL-1β und IL-18 und spaltet Gasdermin D, das im Anschluss Poren in der Plasmamembran bildet. Es kommt zum pyroptotischen Zellzerfall. Die Freisetzung der Interleukine führt zur Inflammationsreaktion.

Grafik modifiziert nach (249)(250)(251)(252)

6.2.2.2 Bcl-2, Bax und Bak

Die Bcl-2-Familie umfasst sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Proteine, die die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran regulieren (256). Während die proapoptotischen Proteine Bax (Bcl-2-associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) die mitochondriale Porenbildung durch Oligomerisierung fördern, so dass im Anschluss Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt und die Caspasenkaskade ausgelöst wird, trägt das antiapoptotische Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) durch Blockade von Bax und Bak zur Erhaltung der Membranintegrität bei (257). Ein verändertes Gleichgewicht zwischen diesen pro- und antiapoptotischen Faktoren resultiert in einer Dysregulation der Apoptose, einem der Charakteristika maligner Zellen (210). Meist sind antiapoptotische Proteine in Krebszellen überexprimiert und/oder proapoptotische Proteine unterexprimiert bzw. inaktiviert (258) (259).

Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante Expressionsreduktion des antiapoptotischen Bcl-2 in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, während die Genexpression von Bax und Bak nicht signifikant verändert war. Dieses Ergebnis passt nicht zu der Tatsache, dass die ESRRG-Knockdownzellen ein stärkeres Wachstum aufwiesen als die Kontrollzellen.

Die Rolle der Bcl-2-Familie im Ovarialkarzinom wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Eine Hemmung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 durch verschiedene niedermolekulare Bcl-2-Inhibitoren, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden, führt in Ovarialkarzinomzellen zu einer Verminderung des Zellwachstums, einem Anstieg der Apoptoserate sowie einer Steigerung der Chemosensitivität (260). Dementsprechend erscheint die erniedrigte Expression von Bcl-2 in den stärker proliferierenden ESRRG-Knockdownzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit paradox. Die Apoptose ist allerdings von weit mehr Faktoren als nur von den Proteinen der Bcl-2-Familie abhängig (siehe Kapitel 6.2.2.1). Aus diesem Grund wurde die Expression weitere Gene, die mit dem programmierten Zelltod in Verbindung stehen, untersucht.

6.2.2.3 XIAP

Das Protein XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) gehört zur IAP-Familie, einer Familie aus Proteinen, die die Apoptose inhibieren (253). XIAP hemmt den Apoptoseprozess durch Blockierung der Aktivität der Initiatorcaspase Caspase-9 sowie der Effektorcaspasen Caspase-3 und -7 (261) (262). In Malignomen findet sich häufig eine Überexpression von XIAP, die unter anderem mit gesteigerter Zellproliferation und schlechterer Prognose assoziiert ist (263) (264) (265).

Die experimentelle Reduktion der XIAP-Expression in Ovarialkarzinomzellen führt zur Steigerung der Apoptose, zur Hemmung des Wachstums und zu erhöhter Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika-induziertem Zelltod (266) (267) (268) (269). Es gibt Hinweise darauf, dass XIAP die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen nicht nur durch Inhibition der Apoptose fördert, sondern auch durch direktes Eingreifen in die Regulation des Zellwachstums (270).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überraschenderweise festgestellt, dass die Expression von XIAP in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert war. Dieses Ergebnis steht auf den ersten Blick nicht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Knockdownzellen ein stärkeres Wachstum aufwiesen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass eine Herunterregulierung von XIAP nicht zwingend mit einer erhöhten Apoptoserate bzw. vermehrtem Zelltod einhergeht, solange keine Stimuli die Caspasekaskade auslösen bzw. die Apoptose initiieren (269).

6.2.2.4 AIFM1

AIFM1 bezeichnet eine Isoform des mitochondrialen „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF). Es handelt sich dabei um ein Flavoprotein, das im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist (271). Ausgelöst durch apoptotische Stimuli kommt es – wie unter 6.2.2.1 beschrieben – zur Störung der mitochondrialen Membranpermeabilität. Dadurch wird neben Cytochrom c auch AIF freigesetzt, dessen Translokation in Zytosol und Nukleus zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung und damit Caspase-unabhängig zum Zelltod beiträgt (271). Es gibt einige Studien, die bei AIF-Inaktivierung eine reduzierte zelluläre Apoptoserate beobachteten (272). Allerdings ist AIF durch eine Oxidoreduktase-Aktivität zusätzlich an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt, wodurch es neben seiner zelltodfördernden auch überlebens- und wachstumsfördernde Funktionen ausübt (272) (273).

Die Rolle von AIF in Tumorzellen ist daher komplex: Einerseits gibt es Hinweise auf eine tumorsuppressive Funktion von AIF durch Förderung der Apoptose (274), andererseits wurde eine Assoziation der AIF-Expression mit gesteigerter Tumorzellproliferation beobachtet (275). Letzteres könnte darauf zurückzuführen sein, dass AIF in Krebszellen eine wachstumsfördernde Stoffwechselleage herstellt (275).

Das verstärkte Wachstum der ESRRG-Knockdownzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist hingegen nicht mit einer Veränderung der Expression von AIFM1 assoziiert: Der ESRRG-Knockdown hatte keinen signifikanten Einfluss auf die AIFM1-Expression. ERR γ scheint in Ovarialkarzinomzellen nicht an der Regulation der AIFM1-Expression beteiligt zu sein.

6.2.2.5 Caspase-1

Die Caspase-1 ist eine Cystein-Aspartat-spezifische Protease und spielt – wie im Kapitel 6.2.2.1 beschrieben – eine entscheidende Rolle in der Pyroptose. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Caspase-1 auch an der Apoptose beteiligt ist (unter anderem durch Aktivierung von verschiedenen proapoptotischen Caspasen) (252) (276) (277) (278) (279) (280).

Die Genexpression der Caspase-1 war im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den stärker proliferierenden ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant herunterreguliert. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Caspase-1-Expression und Zellwachstum wurde bereits in Brustkrebszellen beobachtet: Die Reduktion der Caspase-1-Expression war mit einem Anstieg der Tumorzellproliferation sowie einem Rückgang der Apoptose assoziiert (279). In Gliomzellen wurde jedoch Gegenteiliges festgestellt: Jiang et al. führten den tumorsuppressiven Effekt einer miRNA auf die Herunterregulierung der Caspase-1-Expression zurück, wodurch Tumorzellproliferation, -migration und -invasion supprimiert wurden (281). Die Arbeitsgruppe postulierte, dass die durch Caspase-1 vermittelte Inflammation zur Tumorprogression beitrage. Die Rolle der Pyroptose in Krebszellen scheint also komplex und gewebespezifisch zu sein: Einerseits könnte die Pyroptose maligne Zellen als Reaktion auf bestimmte Stimuli beseitigen und so die Tumorentwicklung verzögern, andererseits könnte die Bildung eines proinflammatorischen Mikromilieus in Folge des Pyroptoseprozesses das Tumorwachstum fördern (255).

Es existieren bisher nur wenige Studien, die die Rolle der Pyroptose bzw. der Caspase-1 im Ovarialkarzinom untersucht haben. Feng et al. stellten fest, dass die Expression der Caspase-1 in Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu gesunden Ovarialzellen herunterreguliert ist. Außerdem schrieben sie der Caspase-1 eine proapoptotische Wirkung zu, da die Induktion einer

Caspase-1-Überexpression zum Anstieg von Caspase-9 und -3 führte (280). Die Forschungsgruppe um Li et al. stieß bei der Untersuchung der tumorsuppressiven Wirkung von lncRNA GAS5 (Long Noncoding RNA Growth Arrest-Specific Transcript 5) in Ovarialkarzinomzellen auf einen Zusammenhang mit Caspase-1. lncRNA GAS5 induziere eine Caspase-1-Hochregulation und fördere so Pyroptose und Apoptose der Ovarialkarzinomzellen (282). Eine Reduktion der lncRNA-GAS5-Expression dagegen resultierte in einer Steigerung der Proliferation und einer Supprimierung der Pyroptose und Apoptose (282).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eine Reduktion der Caspase-1-Expression in Ovarialkarzinomzellen zu Tumorwachstum und -progression beiträgt. Mit dieser These konsistent ist die Beobachtung, dass die stärker proliferierenden ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Herunterregulierung der Caspase-1-Expression aufwiesen. ERR γ scheint also an der Regulation der molekularen Mechanismen der Caspase-1-abhängigen Pyroptose und Apoptose beteiligt zu sein. Dies könnte eine Erklärungsansatz für die proliferative Wirkung des ESRRG-Knockdowns sein.

6.2.2.6 Zusammenfassung: ERR γ im programmierten Zelltod

Die Auswirkungen des ESRRG-Knockdowns auf die Expression von Genen, die mit dem programmierten Zelltod assoziiert sind, ergeben kein einheitliches Bild. Einerseits war die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und XIAP in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant herunterreguliert, andererseits zeigte sich eine Herunterregulierung der Genexpression der propyroptotischen und proapoptotischen Caspase-1. Während sich letzteres Ergebnis sehr gut mit dem beobachteten Effekt des ESRRG-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten der Zellen vereinbaren lässt, scheint ersteres damit im Widerspruch zu stehen. Die Vorgänge des programmierten Zelltods werden jedoch nicht durch ein einzelnes Gen bzw. ein einzelnes Genprodukt in Gang gesetzt, sondern resultieren aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener pro- und antiapoptotischer Faktoren (258), siehe auch Kapitel 6.2.2.1. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Untersuchung einzelner Gene des programmierten Zelltods keinen eindeutigen Erklärungsansatz für das vermehrte Wachstum der ESRRG-Knockdownzellen bietet.

Um die Rolle von ERR γ in der Apoptose und Pyroptose von Ovarialkarzinomzellen genauer differenzieren zu können, ist weitere Forschung nötig. So sollten unter anderem die Effekte des ESRRG-Knockdowns auf die induzierte Apoptose geprüft werden. Aufgrund der entscheidenden Rolle der Bcl-2-Familie in der Vermittlung der Resistenz gegenüber

Chemotherapeutika wäre es außerdem von Interesse, die Auswirkungen des ESRRG-Knockdowns auf die Chemosensibilität von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen.

6.2.3 Einfluss von $ERR\gamma$ auf epitheliale und mesenchymale Gene

Schließlich wurde die Veränderung der Expression verschiedener epithelialer und mesenchymaler Gene in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen untersucht. Während die epithelialen Markergene für E-Cadherin und Scillin in den Knockdownzellen signifikant herunterreguliert waren, fand sich eine verstärkte Expression des mesenchymalen Gens für N-Cadherin. Lediglich die Expression des epithelialen Gens für Mucin-1 blieb vom ESRRG-Knockdown unbeeinträchtigt. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich ein einheitliches Bild: Die Herunterregulierung epithelialer Gene und die gleichzeitige Hochregulierung mesenchymaler Gene sind Ausdruck der epithelial-mesenchymalen Transition, einem Prozess, der entscheidend zur Tumorprogression beiträgt (283). Im Folgenden wird dieser Vorgang genauer erklärt.

6.2.3.1 Einordnung der untersuchten Gene in den Prozess der EMT

Als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man die Umwandlung polarisierter Epithelzellen in motile Zellen mit mesenchymalem Phänotyp (283). Dieser Prozess spielt nicht nur in der Embryonalentwicklung und Organogenese sowie in der Wundheilung und Geweberegeneration eine Rolle, sondern auch in der Tumorprogression (284). Durch Verlust der interzellulären Adhäsion und der apikobasalen Polarität, durch Reorganisierung des Zytoskeletts und durch Veränderungen der Zellform erleichtert die EMT den Tumorzellen Migration, Infiltration von umliegendem Gewebe und Metastasierung (285). Dabei geht sie mit Veränderungen der Protein- und Genexpression epithelialer und mesenchymaler Marker einher: Während epitheliale Marker (z. B. E-Cadherin, Claudine, Occludine, Zytokeratine, Mucine) in den Zellen vermindert exprimiert werden, werden mesenchymale Marker (z. B. N-Cadherin, Vimentin, Fibronektin) aktiviert (286). E-Cadherin und N-Cadherin gelten als Schlüsselproteine der EMT. Die Herunterregulierung von E-Cadherin mit gleichzeitiger Hochregulierung von N-Cadherin wird als „Cadherin-Switch“ bezeichnet (287).

Die EMT fördert nicht nur die Migrations- und Invasionskapazität der Tumorzellen, sondern auch deren Wachstum und Proliferation. Dafür sind verschiedene Mechanismen verantwortlich: Zum einen erlangen die Zellen, in denen die EMT abgelaufen ist, eine höhere Resistenz gegenüber Apoptose und Seneszenz (288). Zum anderen beeinflusst der Cadherin-Switch die Signalwege von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die durch den Wechsel von

E-Cadherin- zu N-Cadherin aktiviert werden (287). So werden z. B. bei der Auflösung von Adhärensverbindungen β -Catenine freigesetzt, die im Anschluss über den Wnt-Signalweg als transkriptionelle Aktivatoren der Zellproliferation fungieren (286) (289). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die EMT den eng aneinander gedrängten Zellen im proliferierenden Tumorgewebe eine größere mechanische Kraft verleiht, um sich vor der Mitose aufzurunden (290). Dadurch werden Zellteilung und Tumorwachstum begünstigt.

Das Gegenstück zur EMT ist die mesenchymal-epitheliale Transition (MET). Es wird postuliert, dass die Tumorzellen nach stattgefunder Invasion, Migration und Metastasierung ihre zuvor im Rahmen der EMT verlorenen epithelialen Eigenschaften durch die MET wiedererlangen können (291). Die MET trägt dabei zur Etablierung und Stabilisierung der migrierten und metastasierten Tumorzellen bei (291). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die MET aus der Deaktivierung des EMT-Programms resultiert oder durch spezifische MET-aktivierende Mechanismen eingeleitet wird (292).

Abbildung 31 zeigt die Veränderungen während der EMT bzw. MET schematisch:

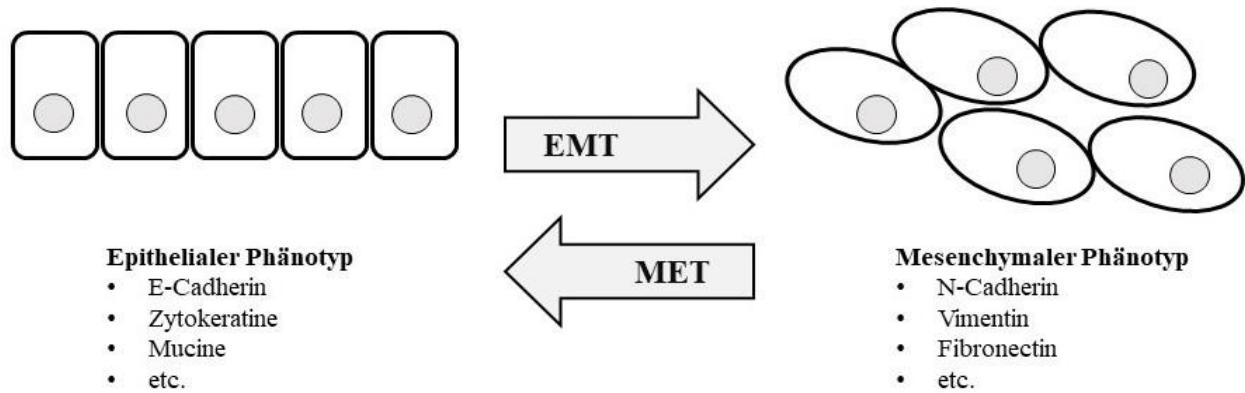


Abbildung 31: Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bzw. mesenchymal-epitheliale Transition (MET)

Die Umwandlung polarisierter Epithelzellen in spindelförmige, motile Zellen mit mesenchymalem Phänotyp wird in dieser Abbildung schematisch dargestellt. Einige epitheliale bzw. mesenchymale Marker sind unter den jeweiligen Zellen aufgelistet. Grafik modifiziert nach (284) (286) (289)

6.2.3.2 E-Cadherin und N-Cadherin

Die Familie der Cadherine umfasst eine Gruppe aus transmembranösen Glykoproteinen, die kalziumabhängig die Zelladhäsion vermitteln (293). Sie sind an der Regulation von Zellkontakte und der Zelldifferenzierung beteiligt (294). Die bekanntesten Vertreter der Cadherin-Familie sind E-Cadherin (epitheliales Cadherin) und N-Cadherin (neuronales Cadherin), jeweils benannt nach dem Gewebe, aus dem sie erstmals isoliert wurden (294).

E-Cadherin gilt als Tumorsuppressor, da in vielen malignen epithelialen Tumoren eine Herunterregulierung seiner Expression festgestellt wurde (295). Die Expression von N-Cadherin ist in vielen epithelialen und auch einigen nicht-epithelialen Tumoren dagegen erhöht und assoziiert mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Invasivität, Metastasierung und mit einer schlechteren Prognose (287) (296) (297). Rosso et al. untersuchten die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin in Ovarialkarzinomzellen im Zusammenhang mit klinischen und histopathologischen Parametern (298). Hier war eine niedrige E-Cadherin-Expression mit schlechterer Prognose assoziiert. Außerdem stellten Rosso et al. fest, dass Zellen mit hoher N-Cadherin-Expression eine geringere Anfälligkeit gegenüber Apoptosemechanismen und eine höhere Invasivität aufwiesen als Zellen mit hoher E-Cadherin-Expression (298).

Mit dem E-Cadherin-Verlust und der Hochregulation von N-Cadherin assoziiert ist die EMT, die – wie oben bereits ausführlich beschrieben – den epithelialen Zellen zu einem motilen mesenchymalen Phänotyp verhilft, zur Tumorprogression beiträgt und Proliferationsprozesse aktiviert (283). Dass die EMT auch in der Progression des Ovarialkarzinoms eine Rolle spielt, ist in der Literatur mehrfach beschrieben (299) (300).

Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante Herunterregulierung von E-Cadherin und eine signifikante Hochregulierung von N-Cadherin in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Beobachtungen entsprechen dem „Cadherin-Switch“, der sich im Rahmen der EMT in der Tumorprogression abspielt (287). Tiraby et al. identifizierten E-Cadherin bereits als direktes Zielgen von $ERR\gamma$ (301). Außerdem stieß diese Arbeitsgruppe auf einen Zusammenhang zwischen $ERR\gamma$ und der EMT bzw. MET in Brustkrebszellen: $ERR\gamma$ induzierte die vermehrte Expression von E-Cadherin und weiterer epithelialer Gene (darunter auch Mucin-1 und Sciellin), die verminderte Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin, morphologische Veränderungen der Zellen, einen Rückgang der Invasivität in vitro sowie des Tumorzellwachstums in vivo (301). Tiraby et al. leiteten aus ihren Beobachtungen die These ab, dass $ERR\gamma$ die MET fördere und dadurch Zellinvasivität und Tumorzellwachstum supprimiere (301).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Schlussfolgerungen von Tiraby et al. Es kann davon ausgegangen werden, dass die verstärkte Proliferation in den ESRRG-Knockdownzellen mit dem beobachteten Cadherin-Switch und der damit verbundenen Förderung der EMT in Zusammenhang steht. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass $ERR\gamma$ seine anti-proliferativen und tumorsuppressiven Effekte in Ovarialkarzinomzellen durch Induktion der MET vermittelt.

6.2.3.3 Sciillin

Das Protein Sciillin ist eine Vorstufe der sogenannten „cornified envelope“, einer schützenden Proteinschale an der Plasmamembran von Keratinozyten (302). Es wird vor allem in Zellen der Haut, der Mundhöhle, des Ösophagus und der Vagina exprimiert, wurde aber auch in verschiedenen Malignomen nachgewiesen (302) (303) (304). Sciillin war in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant herunterreguliert. Diese Beobachtung ist konsistent mit der im vorherigen Kapitel aufgestellten These, dass der ESRRG-Knockdown die EMT induziere und epitheliale Marker daher eine verminderte Expression aufweisen.

Sciillin wurde bereits in anderen Tumorentitäten eine Rolle in der EMT bzw. MET zugeschrieben: Es wurde postuliert, dass Sciillin in kolorektalen Lebermetastasen als MET-Induktor fungiere (303). Ein Sciillin-Knockdown war dabei assoziiert mit erhöhter Migration und Invasion, erhöhte Expression mesenchymaler Marker und erniedrigter E-Cadherin-Expression – vereinbar mit den Vorgängen im Rahmen der EMT (303). In Mammakarzinomzellen mit $ERR\gamma$ -Überexpression beobachteten Tiraby et al. die vermehrte Expression von Sciillin. Diese war assoziiert mit der Hochregulierung der Expression weiterer epithelialer Marker, der Herunterregulierung mesenchymaler Marker und einer Verminderung der Invasivität der Tumorzellen (301). Die Erkenntnisse dieser beiden Studien stehen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang. Die Herunterregulierung der Genexpression von Sciillin scheint auch in Ovarialkarzinomzellen mit der EMT assoziiert zu sein.

6.2.3.4 Mucin-1

Mucin-1 gehört zu den membranständigen Mucinen, einer Gruppe transmembranöser Glykopeptide, die von Epithelzellen synthetisiert werden (305). Die physiologischen Funktionen von Mucin-1 umfassen die Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sowie die Steuerung von Zelldifferenzierungs- und Wachstumsprozessen durch Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne von Mucin-1 mit Signaltransduktionswegen (306). Mucin-1 gilt als Onkoprotein, da es in Karzinomen zur Steigerung der Zellproliferation und zur Inhibition von Apoptosemechanismen beiträgt (307) (308). In Ovarialkarzinom- und anderen epithelialen Krebszellen findet sich oftmals eine Überexpression von Mucin-1 (309).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Mucin-1-Expression in den ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Obwohl die Expression der anderen untersuchten epithelialen Gene (E-Cadherin und Sciellin) in den Knockdownzellen – im Sinne der EMT – herunterreguliert war, blieb die Expression von Mucin-1 unbeeinflusst.

Mucin-1 scheint in der EMT allerdings sehr wohl eine Rolle zu spielen: Dem Glycoprotein wird in der Literatur eine Begünstigung der EMT durch Aktivierung verschiedener EMT-induzierender Signalwege (z. B. des Wnt-Signalwegs) nachgesagt (308) (310) (311). Roy et al. wiesen in Pankreaskarzinomzellen nach, dass Mucin-1 die molekularen Mechanismen der EMT triggert (312). Eine durch diese Arbeitsgruppe induzierte Mucin-1-Überexpression ging mit Steigerung der Expression von EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren, Reduktion der E-Cadherin-Expression sowie verstärkter Invasivität und Metastasierung einher (312). Der Zusammenhang zwischen Mucin-1 und der EMT in der bereits im vorherigen Kapitel beschriebenen Arbeit von Tiraby et al. steht dazu im Gegensatz: Brustkrebszellen mit gesteigerter ERR γ -Expression wiesen eine Hochregulierung von E-Cadherin und von verschiedenen epithelialen Markergenen – darunter auch Mucin-1 – auf; Wachstum und Invasivität dieser Zellen waren reduziert (301). Die verstärkte Mucin-1-Expression war also nicht mit einer Förderung der EMT assoziiert, sondern mit verstärkter E-Cadherin-Expression sowie verminderter Invasivität und damit laut Tiraby et al. mit Induktion der MET (301). Die vorliegende Arbeit zeigte keinen Einfluss des Rezeptors ERR γ auf die Mucin-1-Expression sowie keine Beteiligung von Mucin-1 an der ERR γ -vermittelten EMT in der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinie. Die Rolle von Mucin-1 in der EMT scheint komplex und gewebe-spezifisch zu sein und bedarf weiterer Forschung.

6.2.3.5 Zusammenfassung: ERR γ in der EMT

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor ERR γ an der Expression einiger epithelialer und mesenchymaler Gene beteiligt zu sein scheint. Der ESRRG-Knockdown induzierte eine Expressionsänderung dieser Gene bzw. einen Cadherin-Switch in Ovarialkarzinomzellen, wie er Ausdruck der EMT ist. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgt werden, dass ERR γ die EMT supprimiert bzw. zur MET beiträgt und so seine tumor-suppressiven und antiproliferativen Funktionen vermitteln könnte.

Einem anderen Mitglied der ERR-Familie - nämlich ERR α - wurde sowohl in vitro als auch in vivo ebenfalls eine Rolle in der Regulation der EMT nachgewiesen: ERR α induziert den EMT-assoziierten Transkriptionsfaktor Snail und fördert die EMT sowie die Metastasierung im Ovarialkarzinom (313). ERR α und ERR γ scheinen also gegensätzliche Rollen in der Steuerung der EMT einzunehmen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass ERR α mit einer schlechteren Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert ist, während ERR γ mit einer guten Prognose einhergeht (159).

6.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Wie in Kapitel 1 bereits erwähnt, gilt das Ovarialkarzinom als das tödlichste der gynäkologischen Malignome. Neue Ansätze zu Früherkennung und Therapie weden daher dringend benötigt. Dem Estrogen-Related Receptor γ wurde im klinischen Kontext bereits eine Rolle als günstiger prognostischer Marker im Ovarialkarzinom zugeschrieben (159). Die vorliegende Arbeit bestätigt diese tumorsuppressive Wirkung in vitro durch den antiproliferativen Einfluss des Rezeptors auf Ovarialkarzinomzellen. Dieser Effekt scheint am ehesten durch den Einfluss von $ERR\gamma$ auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Gene vermittelt zu werden: $ERR\gamma$ kann in Ovarialkarzinomzellen als Gegenspieler der EMT bzw. als Induktor der MET gesehen werden.

Um diese These zu untermauern, sind weitere Versuche nötig, die EMT-typische Veränderungen in den ESRRG-Knockdownzellen zu untersuchen. Hier wäre es ratsam, mögliche morphologische Veränderungen, die Reorganisierung des Zytoskeletts, die Invasivität und die Metastasierung im Vergleich zu den Kontrollzellen zu verifizieren. Gegenstand weiterer Forschung sollte sein, auf welche Art und Weise $ERR\gamma$ in die Mechanismen der EMT eingreift. Vermittelt wird die EMT nämlich durch ein komplexes Regulationsnetzwerk, in das insbesondere drei Familien von Transkriptionsfaktoren involviert sind: Snail, Twist und ZEB. Diese Transkriptionsfaktor-Familien üben neben der Induktion der EMT viele weitere gewebespezifische und größtenteils onkogene Funktionen in Tumorzellen aus (314) (315). Sie fördern die Tumorprogression also nicht alleine durch Steigerung der Zellmotilität, sondern auch durch zusätzliche pleiotrope Effekte (315). Es wäre daher von großem Interesse, mögliche Veränderungen der genannten Transkriptionsfaktoren in Ovarialkarzinomzellen in Abhängigkeit der $ERR\gamma$ -Expression zu untersuchen. Die transkriptionelle Kontrolle der EMT durch Snail, Twist und ZEB wird durch klassische Signalwege wie z. B. den TGF- β -, Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signalweg beeinflusst (285). In Magenkarzinomzellen wurde bereits eine Antagonisierung des Wnt-Signalwegs durch $ERR\gamma$ beobachtet (156). Eine genauere Untersuchung des Einflusses von $ERR\gamma$ auf die genannten Signaltransduktionsmechanismen in Ovarialkarzinomzellen sollte erfolgen.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit – nämlich die antiproliferative Wirkung des Rezeptors $ERR\gamma$ sowie dessen Rolle in der Regulation der EMT bzw. MET in Ovarialkarzinomzellen – könnten neue Anhaltspunkte im Rahmen einer zielgerichteten Tumortherapie schaffen. Östrogen-Derivate wie Diethylstilbestrol, 4-Hydroxy-Tamoxifen und Bisphenol A, aber auch

neu entwickelte synthetische Verbindungen wie GSK5182, GSK4716 und GSK90989 können selektiv die ERR-Aktivität modulieren (siehe Kapitel 1.2.3.2). Die Durchführung weiterer Experimente, die den Einfluss dieser verschiedenen agonistischen und antagonistisch wirkenden Substanzen auf das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen und die Vorgänge der EMT untersuchen, wäre wünschenswert. Im systemischen Kontext *in vivo* sollten die biologischen Konsequenzen der Veränderung der ERR γ -Aktivität, die nicht nur den Tumormetabolismus, sondern auch den Energiestoffwechsel beeinflussen, vorsichtig abgewogen werden (147).

Die EMT mit ihren Auswirkungen auf Tumorzellproliferation, -migration, -invasion und Metastasierung scheint auf den ersten Blick sehr gut geeignet als Angriffspunkt für die Krebstherapie. Dennoch ist bei therapeutischen Interventionen Vorsicht geboten. Einerseits könnte eine Inhibition der EMT bzw. eine Induktion der MET die Tumorprogression verlangsamen, andererseits könnte sie aber auch zur Bildung von Metastasen beitragen, da sich bereits migrierte Tumorzellen durch Wiedererlangung ihrer epithelialen Eigenschaften besser stabilisieren können (316). In der Literatur wurde außerdem beschrieben, dass die EMT oft nur partiell abläuft: Tumorzellen können in verschiedenen intermediären Stadien vorliegen und einen hybriden epithelial-mesenchymalen Phänotyp aufweisen (317). Es gibt Hinweise darauf, dass diese „Zwischenstufen“ eine höhere Aggressivität aufweisen als Zellen mit rein epithelialem oder mesenchymalem Phänotyp (317). Die Vorgänge der EMT sind gewebespezifisch und sehr komplex. Trotz der zahlreichen wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte besteht weiterhin großer Forschungsbedarf. Durch Identifizierung des Estrogen-Related Receptor γ als EMT-Modulator in Ovarialkarzinomzellen trägt die vorliegende Arbeit zum besseren Verständnis des multidimensionalen Netzwerks der EMT bei.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ , Gen: ESRRG) ist ein konstitutiv aktiver Rezeptor, der – trotz seiner hohen Homologie zum Östrogenrezeptor ER – natürliche Östrogene und deren Derivate nicht zu seinen Liganden zählt. Stattdessen wird ERR γ eine Rolle in der Steuerung des zellulären Energiestoffwechsels zugeschrieben. Auch in onkogene Prozesse scheint ERR γ involviert zu sein: Nicht nur durch seine Interaktion mit Östrogen-Signalwegen und seine Aufgabe als Regulator des Metabolismus nimmt ERR γ Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression, sondern auch durch direkte Bindung an und Modulation von potentiell an der Karzinogenese beteiligten Genen. Die konkrete Funktion von ERR γ in Tumorgeweben ist aufgrund der unzureichenden Studienlage allerdings noch weitgehend ungeklärt. Erste Publikationen kamen zu dem Ergebnis, dass die Expression von ERR γ im Ovarialkarzinom mit einer günstigen Prognose assoziiert ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die diesem Effekt zugrunde liegenden Mechanismen zu erforschen.

Grundlegend für die Durchführung der weiteren Experimente war die Etablierung eines siRNA-vermittelten ESRRG-Knockdowns in Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3, der auf mRNA-Ebene verifiziert wurde. Die dadurch entstandenen Zellen mit deutlich verminderter ESRRG-Expression konnten im Anschluss im Vergleich zu mit cosiRNA transfizierten Kontrollzellen untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte eine Viabilitätsmessung via CTB-Assay, um den Einfluss von ERR γ auf das Wachstumsverhalten der Ovarialkarzinomzellen zu ermitteln. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung des Wachstums in den ESRRG-Knockdownzellen. ERR γ scheint also im Ovarialkarzinom antiproliferativ zu wirken. Dies könnte eine Erklärung für die Assoziation der ERR γ -Expression mit einer günstigen Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen sein.

Mit der Intention, die molekularen Mechanismen, die den proliferativen Effekt des ESRRG-Knockdowns bzw. den antiproliferativen Effekt von ERR γ vermitteln, enthüllen zu können, wurde im zweiten Versuchsteil die ERR γ -vermittelte Veränderung der Expression von potentiell an der Karzinogenese beteiligten Genen genauer in den Blick genommen. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Genen der Proliferation (Cyclin D1, Cyclin E2, Cyclin A2, p21^{Cip1/Waf1}, CDK2, Ki-67), von Genen des programmierten Zelltods (Bcl-2, Bax, Bak, XIAP, AIFM1, Caspase-1) und von epithelialen und mesenchymalen Genen (E-Cadherin, N-Cadherin, Scillin, Mucin-1) via qPCR analysiert.

Während die Expression der meisten untersuchten Gene des Zellzyklus nicht signifikant verändert war, zeigte sich eine Herunterregulierung der Genexpression von Cyclin D1 und Cyclin A2, die auf den ersten Blick mit dem verstärkten Wachstum der ESRRG-Knockdownzellen im Widerspruch zu stehen scheint. Die Effekte dieser Expressionsreduktion könnten aber durch andere Zellzyklusregulatoren kompensiert worden sein. Als Nächstes wurde die Expression von Genen untersucht, die mit dem programmierten Zelltod assoziiert sind. Sowohl die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und XIAP als auch die Expression der proapoptotischen und propyroptotischen Caspase-1 waren in den ESRRG-Knockdownzellen herunterreguliert. Ersteres scheint ebenfalls nicht zum beobachteten proliferativen Effekt des ESRRG-Knockdowns zu passen, letzteres dagegen lässt sich damit gut vereinbaren. Eine detailliertere Untersuchung der Apoptose in den ESRRG-Knockdownzellen wäre wünschenswert.

Die Expressionsanalyse der letzten „Gengruppe“ – den epithelialen und mesenchymalen Markergenen – ergab ein einheitliches Bild: Es zeigte sich eine signifikante Expressionsreduktion von E-Cadherin und Scellin sowie eine Expressionssteigerung von N-Cadherin. Diese Veränderungen können als Ausdruck der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) gewertet werden. Daraus kann die These abgeleitet werden, dass der proliferative Effekt des ESRRG-Knockdowns auf eine Förderung der EMT zurückzuführen ist. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass ERR γ in Ovarialkarzinomzellen als Induktor der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) gesehen werden kann. Es sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die EMT-typische Veränderungen in Abhängigkeit der ERR γ -Expression sowie die Rolle von ERR γ im komplexen Regulationsnetzwerk der EMT-Signalwege untersuchen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich postulieren, dass der Rezeptor ERR γ – aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung auf Ovarialkarzinomzellen sowie seiner Assoziation mit einer günstigen Prognose – im Ovarialkarzinom als Tumorsuppressor wirkt. Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise darauf, dass dieser Effekt durch Regulation der EMT bzw. MET vermittelt werden könnte. Diese Erkenntnisse geben Anlass zu weiterführenden Untersuchungen und könnten neue Anhaltspunkte im Rahmen einer zielgerichteten Tumortherapie schaffen.

8 A N H A N G

8.1 Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
AF-1 bzw. AF-2	Aktivierungsfunktion 1 bzw. Aktivierungsfunktion 2
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AIFM1	Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
AR	Androgen-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer (Klassifikation für hepatzelluläres Karzinom)
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar (Einheit zur Längenangabe von Genen)
BPA	Bisphenol A
BRAF	Gen kodierend für die Serin/Threonin-Kinase B-Raf (B-raf = V-Rafmurine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B)
BRCA1 bzw. 2	Breast Cancer Associated Gene 1 bzw. 2
CA-125	Cancer-Antigen 125
CDK	Cyclin-Dependent Kinase(s) bzw. Cyclin-abhängige Kinase(n)
cDNA	Complementary DNA
cosiRNA	Control small interfering RNA bzw. Kontroll-siRNA
C_T	Cycle Treshold
CT	Computertomographie
CTB	CellTiter-Blue
DBD	DNA-bindende Domäne (eines Rezeptors)
DES	Diethylstilbestrol
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonucleic Acid bzw. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

dsRNA bzw. dsDNA	Doppelsträngige RNA bzw. DNA
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER (α/β)	Estrogen Receptor bzw. Östrogen-Rezeptor (α bzw. β)
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2; auch: HER2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
ERBB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
ERE	Estrogen Responsive Element
ERR (α/β/γ)	Estrogen-Related Receptor (α bzw. β bzw. γ)
ERRE	Estrogen-Related Response Element
ESRRα ESRRβ ESRRγ	Gen kodierend für Estrogen-Related Receptor α bzw. β bzw. γ
FBS	Fetal Bovine Serum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GABPα	GA-Binding Protein α
GFP	Green Fluorescent Protein
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GSDMD	Gasdermin D
HGSC	High-Grade Serous Carcinoma bzw. high-grade seröses Karzinom (des Ovars)
HNPPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma Syndrome bzw. hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
HR	Hazard Ratio
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LBD	Liganden-bindende Domäne (eines Rezeptors)
LBP	Ligand Binding Pocket bzw. Liganden-bindende Tasche (eines Rezeptors)
LGSC	Low-Grade Serous Carcinoma bzw. low-grade seröses Karzinom (des Ovars)
LH	Luteinisierendes Hormon
lncRNA GAS5	Long Noncoding RNA Growth Arrest-Specific Transcript 5
LPA	Lysophosphatidic Acid
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition

miRNA	Micro RNA
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-technische/r Assistent/in
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NTD	N-terminale Domäne (eines Rezeptors)
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PGC-1α bzw. -1β	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator 1 α bzw. 1 β
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PR	Progesteron-Rezeptor
qPCR	Real-time quantitative PCR
RIP140	Receptor Interacting Protein 140
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid bzw. Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RR	Relatives Risiko
SHP	Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner
siRNA	Small interfering RNA
SRC-1/2/3	Steroidrezeptor-Koaktivatoren
ssRNA bzw. ssDNA	Einzelsträngige RNA bzw. DNA
STIC	Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma
TNM	Tumor-Klassifikation nach Tumogröße, Nodus, Metastasen
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation bzw. Weltgesundheitsorganisation
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZEB	Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risiko- und protektive Faktoren des Ovarialkarzinoms	10
Tabelle 2: Charakteristika des Ovarialkarzinoms Typ I und Typ II.....	14
Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms.....	16
Tabelle 4: Verteilung der mRNA-Expression der ERR-Isoformen nach Geweben.....	26
Tabelle 5: Expression von ERR α und ERR γ in Tumoren und deren Korrelation mit der Tumorprognose	28
Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs für ESRRG	43
Tabelle 7: Übersicht über die Signifikanzen des Unterschieds der Anzahl viabler Zellen in der Knockdown- und Kontrollgruppe anhand des Mann-Whitney-U-Test	68
Tabelle 8: Signifikanzen der zeitlichen Veränderung der Zellviabilitätsdifferenz der 10 nM Ansätze.....	70
Tabelle 9: Signifikanzen der zeitlichen Veränderung der Zellviabilitätsdifferenz der 20 nM Ansätze.....	70
Tabelle 10: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus der untersuchten Proliferationsgene	72
Tabelle 11: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus der untersuchten Gene des programmierten Zelltods	75
Tabelle 12: Überblick über die relativen durchschnittlichen mRNA-Niveaus von epithelialen und mesenchymalen Genen	77

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überleben und Häufigkeit des Ovarialkarzinoms nach TNM-Stadium	7
Abbildung 2: Die wichtigsten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms.....	13
Abbildung 3: Einordnung von ERR γ in die Subfamilie NR3 der Superfamilie der nukleären Rezeptoren	19
Abbildung 4: Struktur von ERR γ	20
Abbildung 5: Homologie der Domänen der drei ERR-Isoformen.....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung des transkriptionellen Netzwerks zur Regulation der mitochondrialen Funktionen.....	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Einflusses von ERR α und ERR γ auf den Tumormetabolismus.....	32
Abbildung 8: Mechanismus der RNA-Interferenz.....	41
Abbildung 9: RNA-Isolierung	45
Abbildung 10: Mathematische Grundlage der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	50
Abbildung 11: Darstellung der Schmelzkurven einer qPCR.....	52

Abbildung 12: Schematische Darstellung des dem CTB-Assay zugrunde liegenden Mechanismus.....	55
Abbildung 13: Aufteilung einer für das CTB-Assay angefertigten 96-Well-Platte	56
Abbildung 14: Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau	57
Abbildung 15: Übersicht über Anzahl und Verwendung der Transfektionsansätze	59
Abbildung 16: Grafische Darstellung des Knockdowns von ESRRG auf mRNA-Ebene	61
Abbildung 17: Wachstum unbehandelter OVCAR-3-Zellen	62
Abbildung 18: Grafische Darstellung der Anzahl viabler ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) bei Einsatz von je 10 nM ESRRG-siRNA ausgehend von verschiedenen Zellzahlen	64
Abbildung 19: Grafische Darstellung der Anzahl viabler ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) bei Einsatz von je 20 nM ESRRG-siRNA ausgehend von verschiedenen Zellzahlen	65
Abbildung 20: Grafische Darstellung des absoluten Wachstums der ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) ausgehend von 4000 Zellen/96-Well.....	66
Abbildung 21: Grafische Darstellung des relativen Wachstums der ESRRG-Knockdownzellen im Vergleich zur Kontrolle (cosiRNA-transfiziert) ausgehend von 4000 Zellen/Well	67
Abbildung 22: Grafische Darstellung (Boxplot) der Differenz zwischen den CTB-Messwerten der ESRRG-Knockdownzellen und der Kontrolle.....	69
Abbildung 23: Genexpression von Cyclin D1, Cyclin E2, CDK2, p21 ^{Cip1/Waf1} , Cyclin A2 und Ki-67 in Relation zu β -Actin	73
Abbildung 24: Genexpression von Cyclin D1, Cyclin E2, CDK2, p21 ^{Cip1/Waf1} , Cyclin A2 und Ki-67 in Relation zur Kontrolle	74
Abbildung 25: Genexpression von Bcl-2, XIAP, AIFM1, Bax, Bak und Caspase-1 in Relation zu β -Actin	76
Abbildung 26: Genexpression von Bcl-2, XIAP, AIFM1, Bax, Bak und Caspase-1 in Relation zur Kontrolle	77
Abbildung 27: Genexpression von E-Cadherin, Sciellin, Mucin-1 und N-Cadherin in Relation zu β -Actin	78
Abbildung 28: Genexpression von E-Cadherin, Sciellin, Mucin-1 und N-Cadherin in Relation zur Kontrolle	79
Abbildung 29: Vereinfachte schematische Darstellung des Zellzyklus	84
Abbildung 30: Vereinfachte schematische Darstellung der Mechanismen der Apoptose und der Pyroptose.....	92
Abbildung 31: Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bzw. mesenchymale-epitheliale Transition (MET).....	98

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2015/2016. 12. Ausgabe. Berlin; 2019.
2. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2(7716):163. PubMed PMID: 4104488.
3. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(4):717–21. PubMed PMID: 6578367.
4. Crum CP, Drapkin R, Miron A, Ince TA, Muto M, Kindelberger DW, et al. The distal fallopian tube: A new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19(1):3–9. doi: 10.1097/GCO.0b013e328011a21f. PubMed PMID: 17218844.
5. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 2001;195(4):451–6. doi: 10.1002/path.1000. PubMed PMID: 11745677.
6. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007;31(2):161–9. doi: 10.1097/01.pas.0000213335.40358.47. PubMed PMID: 17255760.
7. Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih I-M, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol* 2010;34(10):1407–16. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181ef7b16. PubMed PMID: 20861711.
8. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol* 2013;24 Suppl 10:x16–21. doi: 10.1093/annonc/mdt463. PubMed PMID: 24265397.
9. Salvador S, Rempel A, Soslow RA, Gilks B, Huntsman D, Miller D. Chromosomal instability in fallopian tube precursor lesions of serous carcinoma and frequent monoclonality of synchronous ovarian and fallopian tube mucosal serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008;110(3):408–17. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.05.010. PubMed PMID: 18597838.
10. Kuhn E, Kurman RJ, Vang R, Sehdev AS, Han G, Soslow R, et al. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *J Pathol* 2012;226(3):421–6. doi: 10.1002/path.3023. PubMed PMID: 21990067.
11. Kuhn E, Meeker A, Wang T-L, Sehdev AS, Kurman RJ, Shih I-M. Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: An early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 2010;34(6):829–36. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181dcede7. PubMed PMID: 20431479.
12. Ness RB, Cottreau C. Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 1999;91(17):1459–67. doi: 10.1093/jnci/91.17.1459.
13. Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(23):1774–86. PubMed PMID: 9839517.
14. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biol Med* 2017;14(1):9–32. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084. PubMed PMID: 28443200.
15. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eydjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;72(5):1117–30. doi: 10.1086/375033. PubMed PMID: 12677558.
16. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, La Chapelle A de, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81(2):214–8. PubMed PMID: 10188721.
17. Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ, Dossus L, Lukanova A, Bakken K, et al. Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer* 2011;105(9):1436–42. doi: 10.1038/bjc.2011.371. PubMed PMID: 21915124.
18. Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, Taneja S, Bhandari N, Rollins N, et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* 2015;104(467):96–113. doi: 10.1111/apa.13102. PubMed PMID: 26172878.
19. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: A systematic review. *Reprod Biomed Online* 2009;19(3):398–405. PubMed PMID: 19778486.
20. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and oral contraceptives: Collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. *The Lancet* 2008;371(9609):303–14. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60167-1.
21. Beral V, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2007;369(9574):1703–10. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60534-0. PubMed PMID: 17512855.
22. Cibula D, Widschwendter M, Májek O, Dusek L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: Review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17(1):55–67. doi: 10.1093/humupd/dmq030. PubMed PMID: 20634209.
23. Rice MS, Hankinson SE, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy, unilateral oophorectomy, and risk of ovarian cancer in the Nurses' Health Studies. *Fertil Steril* 2014;102(1):192–198.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.041. PubMed PMID: 24825424.
24. Boyd J. Specific keynote: Hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 2003;88(1 Pt 2):S8–10; discussion S11–3. PubMed PMID: 12586076.
25. Prat J, Ribé A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* 2005;36(8):861–70. doi: 10.1016/j.humpath.2005.06.006. PubMed PMID: 16112002.

26. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001;68(3):700–10. doi: 10.1086/318787. PubMed PMID: 11179017.
27. Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, et al. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006;296(2):185–92. doi: 10.1001/jama.296.2.185. PubMed PMID: 16835424.
28. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002;346(21):1609–15. doi: 10.1056/NEJMoa020119. PubMed PMID: 12023992.
29. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;346(21):1616–22. doi: 10.1056/NEJMoa012158. PubMed PMID: 12023993.
30. Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(2):80–7. doi: 10.1093/jnci/djn442. PubMed PMID: 19141781.
31. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0. AWMF-Registernummer: 032/035OL.; 2020.
32. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992;136(10):1184–203. PubMed PMID: 1476141.
33. Adami HO, Hsieh CC, Lambe M, Trichopoulos D, Leon D, Persson I, et al. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. *Lancet* 1994;344(8932):1250–4. PubMed PMID: 7967985.
34. Titus-Ernstoff L, Perez K, Cramer DW, Harlow BL, Baron JA, Greenberg ER. Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. *Br J Cancer* 2001;84(5):714–21. doi: 10.1054/bjoc.2000.1596. PubMed PMID: 11237375.
35. Jordan SJ, Siskind V, C Green A, Whiteman DC, Webb PM. Breastfeeding and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Causes Control* 2010;21(1):109–16. doi: 10.1007/s10552-009-9440-x. PubMed PMID: 19779839.
36. Luan N-N, Wu Q-J, Gong T-T, Vogtmann E, Wang Y-L, Lin B. Breastfeeding and ovarian cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2013;98(4):1020–31. doi: 10.3945/ajcn.113.062794. PubMed PMID: 23966430.
37. Li D-P, Du C, Zhang Z-M, Li G-X, Yu Z-F, Wang X, et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: A systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(12):4829–37. PubMed PMID: 24998548.
38. Cetin I, Cozzi V, Antonazzo P. Infertility as a cancer risk factor - a review. *Placenta* 2008;29 Suppl B:169–77. doi: 10.1016/j.placenta.2008.08.007. PubMed PMID: 18790330.
39. Brinton LA, Lamb EJ, Moghissi KS, Scoccia B, Althuis MD, Mabie JE, et al. Ovarian cancer risk associated with varying causes of infertility. *Fertil Steril* 2004;82(2):405–14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.02.109. PubMed PMID: 15302291.
40. Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 72. Lyon, France, Geneva: IARC; Distributed by IARC Press and the World Health Organization Distribution and Sales; 1999. 1 online resource (x, 660).
41. Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: The Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216(6):580.e1–580.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2017.02.002. PubMed PMID: 28188769.
42. Hannaford PC, Selvaraj S, Elliott AM, Angus V, Iversen L, Lee AJ. Cancer risk among users of oral contraceptives: Cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ* 2007;335(7621):651. doi: 10.1136/bmj.39289.649410.55. PubMed PMID: 17855280.
43. La Vecchia C, Altieri A, Franceschi S, Tavani A. Oral contraceptives and cancer: An update. *Drug Saf* 2001;24(10):741–54. PubMed PMID: 11676302.
44. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Lewis JL, Strom BL, et al. A case-control study of oral contraceptive use and invasive epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1994;139(7):654–61. PubMed PMID: 8166126.
45. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: Individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *The Lancet* 2015;385(9980):1835–42. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61687-1.
46. Garg PP, Kerlikowske K, Subak L, Grady D. Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: A meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;92(3):472–9. PubMed PMID: 9721791.
47. Hildebrand JS, Gapstur SM, Feigelson HS, Teras LR, Thun MJ, Patel AV. Postmenopausal hormone use and incident ovarian cancer: Associations differ by regimen. *Int J Cancer* 2010;127(12):2928–35. doi: 10.1002/ijc.25515. PubMed PMID: 21351271.
48. Pearce CL, Chung K, Pike MC, Wu AH. Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. *Cancer* 2009;115(3):531–9. doi: 10.1002/cncr.23956. PubMed PMID: 19127543.
49. Greiser CM, Greiser EM, Dören M. Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2007;13(5):453–63. doi: 10.1093/humupd/dmm012. PubMed PMID: 17573406.
50. Rosenblatt KA, Thomas DB. Reduced risk of ovarian cancer in women with a tubal ligation or hysterectomy. The World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(11):933–5. PubMed PMID: 8922304.

51. Green A, Purdie D, Bain C, Siskind V, Russell P, Quinn M, et al. Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. Survey of Women's Health Study Group. *Int J Cancer* 1997;71(6):948–51. PubMed PMID: 9185694.
52. Kreiger N, Sloan M, Cotterchio M, Parsons P. Surgical procedures associated with risk of ovarian cancer. *Int J Epidemiol* 1997;26(4):710–5. PubMed PMID: 9279601.
53. Graham J, Graham R. Ovarian cancer and asbestos. *Environmental Research* 1967;1(2):115–28. doi: 10.1016/0013-9351(67)90008-4.
54. Risch HA, Howe GR. Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4(5):447–51. PubMed PMID: 7549798.
55. Lin H-W, Tu Y-Y, Lin SY, Su W-J, Lin WL, Lin WZ, et al. Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: A population-based study. *The Lancet Oncology* 2011;12(9):900–4. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70165-6.
56. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2007;43(4):690–709. doi: 10.1016/j.ejca.2006.11.010. PubMed PMID: 17223544.
57. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci* 2016;17(12). doi: 10.3390/ijms17122113. PubMed PMID: 27983698.
58. Kurman RJ, editor. WHO classification of tumours of female reproductive organs: [...] reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, June 13–15, 2013]. 4th ed. World Health Organization Classification of tumours, 6 (der 4. ed.). Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. 307 p.
59. Prat J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012;460(3):237–49. doi: 10.1007/s00428-012-1203-5. PubMed PMID: 22322322.
60. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164(5):1511–8. PubMed PMID: 15111296.
61. Kurman RJ, Shih I-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: A proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010;34(3):433–43. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79. PubMed PMID: 20154587.
62. Kurman RJ, Shih I-M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 2016;186(4):733–47. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011. PubMed PMID: 27012190.
63. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2011;305(22):2295–303. doi: 10.1001/jama.2011.766. PubMed PMID: 21642681.
64. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): A randomised controlled trial. *The Lancet* 2016;387(10022):945–56. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01224-6.
65. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG* 2005;112(7):857–65. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x. PubMed PMID: 15957984.
66. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA* 2004;291(22):2705–12. doi: 10.1001/jama.291.22.2705. PubMed PMID: 15187051.
67. Goff B. Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55(1):36–42. doi: 10.1097/GRF.0b013e3182480523. PubMed PMID: 22343227.
68. Prat J. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* 2015;26(2):87–9. doi: 10.3802/jgo.2015.26.2.87. PubMed PMID: 25872889; PubMed Central PMCID: PMC4397237.
69. Berek JS, Kehoe ST, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2018;143 Suppl 2:59–78. doi: 10.1002/ijgo.12614. PubMed PMID: 30306591.
70. Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115(6):1234–44. doi: 10.1002/cncr.24149. PubMed PMID: 19189349.
71. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, et al. Impact of Adjuvant Chemotherapy and Surgical Staging in Early-Stage Ovarian Carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(2):113–25. doi: 10.1093/jnci/95.2.113.
72. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010;363(10):943–53. doi: 10.1056/NEJMoa0908806. PubMed PMID: 20818904.
73. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365(26):2473–83. doi: 10.1056/NEJMoa1104390. PubMed PMID: 22204724.
74. Du Bois A, Floquet A, Kim J-W, Rau J, del Campo JM, Friedlander M, et al. Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(30):3374–82. doi: 10.1200/JCO.2014.55.7348. PubMed PMID: 25225436.
75. Du Bois A, Kristensen G, Ray-Coquard I, Reuss A, Pignata S, Colombo N, et al. Standard first-line chemotherapy with or without nintedanib for advanced ovarian cancer (AGO-OVAR 12): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2016;17(1):78–89. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00366-6.

76. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim B-G, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018;379(26):2495–505. doi: 10.1056/NEJMoa1810858. PubMed PMID: 30345884.
77. Sólé-tormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RHM, Tholander B, Bast RC, et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer* 2016;26(1):43–51. doi: 10.1097/IGC.0000000000000586. PubMed PMID: 26588231.
78. Jacobs I, Bast RC. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989;4(1):1–12. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136832. PubMed PMID: 2651469.
79. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, Rustin GJS, Soletormos G, Torre GC, et al. CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(5):679–91. doi: 10.1111/j.1525-1438.2005.00130.x. PubMed PMID: 16174214.
80. Terry KL, Sluss PM, Skates SJ, Mok SC, Ye B, Vitonis AF, et al. Blood and urine markers for ovarian cancer: a comprehensive review. *Dis Markers* 2004;20(2):53–70. doi: 10.1155/2004/241982. PubMed PMID: 15322314; PubMed Central PMCID: PMC3839278.
81. Badgwell D, Bast RC. Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 2007;23(5–6):397–410. doi: 10.1155/2007/309382. PubMed PMID: 18057523; PubMed Central PMCID: PMC3851959.
82. Suh KS, Park SW, Castro A, Patel H, Blake P, Liang M, et al. Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(8):1069–83. doi: 10.1586/erm.10.87. PubMed PMID: 21080822.
83. Gagnon A, Ye B. Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20(1):9–13. doi: 10.1097/GCO.0b013e3282f226a5. PubMed PMID: 18196999.
84. Yang W-L, Lu Z, Bast RC. The role of biomarkers in the management of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(6):577–91. doi: 10.1080/14737159.2017.1326820. PubMed PMID: 28468520.
85. Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, et al. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2006;66(3):1570–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3550. PubMed PMID: 16452214.
86. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, et al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* 1998;280(8):719–23. PubMed PMID: 9728644.
87. Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG, et al. Prostasin, a potential serum marker for ovarian cancer: Identification through microarray technology. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2001;93(19):1458–64. PubMed PMID: 11584061.
88. Kim J-H, Skates SJ, Uede T, Wong K-k, Schorge JO, Feltmate CM, et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002;287(13):1671–9. PubMed PMID: 11926891.
89. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):402–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.10.017. PubMed PMID: 18061248.
90. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240(4854):889–95. PubMed PMID: 3283939.
91. Giguère V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999;20(5):689–725. doi: 10.1210/edrv.20.5.0378. PubMed PMID: 10529899.
92. Horard B, Vanacker J-M. Estrogen receptor-related receptors: Orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocrinol* 2003;31(3):349–57. PubMed PMID: 14664699.
93. Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 1988;331(6151):91–4. doi: 10.1038/331091a0. PubMed PMID: 3267207.
94. Eudy JD, Yao S, Weston MD, Ma-Edmonds M, Talmadge CB, Cheng JJ, et al. Isolation of a gene encoding a novel member of the nuclear receptor superfamily from the critical region of Usher syndrome type IIa at 1q41. *Genomics* 1998;50(3):382–4. doi: 10.1006/geno.1998.5345. PubMed PMID: 9676434.
95. Hong H, Yang L, Stallcup MR. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J Biol Chem* 1999;274(32):22618–26. PubMed PMID: 10428842.
96. Heard DJ, Norby PL, Holloway J, Vissing H. Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: Tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol Endocrinol* 2000;14(3):382–92. doi: 10.1210/mend.14.3.0431. PubMed PMID: 10707956.
97. Tremblay AM, Giguère V. The NR3B subgroup: An ovERRview. *Nucl Recept Signal* 2007;5:e009. doi: 10.1621/nrs.05009. PubMed PMID: 18174917.
98. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;97(2):161–3. PubMed PMID: 10219237.
99. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 1988;4(11):309–14. PubMed PMID: 2853466.
100. Huss JM, Garbacz WG, Xie W. Constitutive activities of estrogen-related receptors: Transcriptional regulation of metabolism by the ERR pathways in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(9):1912–27. doi: 10.1016/j.bbadi.2015.06.016. PubMed PMID: 26115970.
101. Giguère V. Transcriptional Control of Energy Homeostasis by the Estrogen-Related Receptors. *Endocr Rev* 2008;29(6):677–96. doi: 10.1210/er.2008-0017.
102. Tremblay AM, Wilson BJ, Yang X-J, Giguère V. Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol* 2008;22(3):570–84. doi: 10.1210/me.2007-0357. PubMed PMID: 18063693.

103. Sladek R, Bader JA, Giguère V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5400–9. PubMed PMID: 9271417.
104. Yang N, Shigeta H, Shi H, Teng CT. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem* 1996;271(10):5795–804. PubMed PMID: 8621448.
105. Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, et al. Estrogen-related receptor alpha 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol* 1997;11(3):342–52. doi: 10.1210/mend.11.3.9897. PubMed PMID: 9058380.
106. Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V. Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J* 1999;18(15):4270–9. doi: 10.1093/emboj/18.15.4270. PubMed PMID: 10428965.
107. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321–44. doi: 10.1210/edrv.20.3.0366. PubMed PMID: 10368774.
108. Huppunen J, Aarnisalo P. Dimerization modulates the activity of the orphan nuclear receptor ERRgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(4):964–70. PubMed PMID: 14751226.
109. Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, et al. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* 2007;5(5):345–56. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.007. PubMed PMID: 17488637.
110. Greschik H, Wurtz J-M, Sanglier S, Bourguet W, van Dorsselaer A, Moras D, et al. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 2002;9(2):303–13. PubMed PMID: 11864604.
111. Zuercher WJ, Gaillard S, Orband-Miller LA, Chao EYH, Shearer BG, Jones DG, et al. Identification and structure-activity relationship of phenolic acyl hydrazones as selective agonists for the estrogen-related orphan nuclear receptors ERRbeta and ERRgamma. *J Med Chem* 2005;48(9):3107–9. doi: 10.1021/jm050161j. PubMed PMID: 15857113.
112. Deblois G, Giguère V. Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(8):1032–40. doi: 10.1016/j.bbadi.2010.12.009. PubMed PMID: 21172432.
113. Hentschke M, Süsens U, Borgmeyer U. PGC-1 and PERC, coactivators of the estrogen receptor-related receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(5):872–9. PubMed PMID: 12470660.
114. Laganière J, Tremblay GB, Dufour CR, Giroux S, Rousseau F, Giguère V. A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha control of ERRalpha expression. *J Biol Chem* 2004;279(18):18504–10. doi: 10.1074/jbc.M313543200. PubMed PMID: 14978033.
115. Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem* 2003;278(11):9013–8. doi: 10.1074/jbc.M212923200. PubMed PMID: 12522104.
116. Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* 2002;277(43):40265–74. doi: 10.1074/jbc.M206324200. PubMed PMID: 12181319.
117. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, et al. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12378–83. doi: 10.1073/pnas.2135217100. PubMed PMID: 14530391.
118. Xie W, Hong H, Yang NN, Lin RJ, Simon CM, Stallcup MR, et al. Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptors 1 and 2. *Mol Endocrinol* 1999;13(12):2151–62. doi: 10.1210/mend.13.12.0381. PubMed PMID: 10598588.
119. Tremblay GB, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, et al. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev* 2001;15(7):833–8. doi: 10.1101/gad.873401. PubMed PMID: 11297507.
120. Coward P, Lee D, Hull MV, Lehmann JM. 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(15):8880–4. doi: 10.1073/pnas.151244398. PubMed PMID: 11447273.
121. Sanyal S, Matthews J, Bouton D, Kim H-J, Choi H-S, Treuter E, et al. Deoxyribonucleic acid response element-dependent regulation of transcription by orphan nuclear receptor estrogen receptor-related receptor gamma. *Mol Endocrinol* 2004;18(2):312–25. doi: 10.1210/me.2003-0165. PubMed PMID: 14645497.
122. Castet A, Herledan A, Bonnet S, Jalaguier S, Vanacker JM, Cavaillès V. Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol Endocrinol* 2006;20(5):1035–47. doi: 10.1210/me.2005-0227. PubMed PMID: 16439465.
123. Sanyal S, Kim J-Y, Kim H-J, Takeda J, Lee Y-K, Moore DD, et al. Differential regulation of the orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms. *J Biol Chem* 2002;277(3):1739–48. doi: 10.1074/jbc.M106140200. PubMed PMID: 11705994.
124. Greschik H, Flraig R, Renaud J-P, Moras D. Structural basis for the deactivation of the estrogen-related receptor gamma by diethylstilbestrol or 4-hydroxytamoxifen and determinants of selectivity. *J Biol Chem* 2004;279(32):33639–46. doi: 10.1074/jbc.M402195200. PubMed PMID: 15161930.
125. Chao EYH, Collins JL, Gaillard S, Miller AB, Wang L, Orband-Miller LA, et al. Structure-guided synthesis of tamoxifen analogs with improved selectivity for the orphan ERRgamma. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16(4):821–4. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.030. PubMed PMID: 16307879.

126. Wang L, Zuercher WJ, Consler TG, Lambert MH, Miller AB, Orband-Miller LA, et al. X-ray crystal structures of the estrogen-related receptor-gamma ligand binding domain in three functional states reveal the molecular basis of small molecule regulation. *J Biol Chem* 2006;281(49):37773–81. doi: 10.1074/jbc.M608410200. PubMed PMID: 16990259.
127. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 2006;167(2):95–105. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.08.012. PubMed PMID: 17049190.
128. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 2008;116(1):32–8. doi: 10.1289/ehp.10587. PubMed PMID: 18197296.
129. Audet-Walsh É, Giguère V. The multiple universes of estrogen-related receptor α and γ in metabolic control and related diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36(1):51. doi: 10.1038/aps.2014.121.
130. Ingle JN. Estrogen as therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(4):133–6. PubMed PMID: 12100736.
131. Peethambaram PP, Ingle JN, Suman VJ, Hartmann LC, Loprinzi CL. Randomized trial of diethylstilbestrol vs. tamoxifen in postmenopausal women with metastatic breast cancer. An updated analysis. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54(2):117–22. PubMed PMID: 10424402.
132. Lu D, Kiriyama Y, Lee KY, Giguère V. Transcriptional regulation of the estrogen-inducible pS2 breast cancer marker gene by the ERR family of orphan nuclear receptors. *Cancer Res* 2001;61(18):6755–61. PubMed PMID: 11559547.
133. Sun P, Wei L, Denkert C, Lichtenegger W, Sehouli J. The orphan nuclear receptors, estrogen receptor-related receptors: Their role as new biomarkers in gynecological cancer. *Anticancer Res* 2006;26(2C):1699–706. PubMed PMID: 16617564.
134. Vanacker JM, Delmarre C, Guo X, Laudet V. Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha. *Cell Growth Differ* 1998;9(12):1007–14. PubMed PMID: 9869301.
135. Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res* 1998;58(24):5695–700. PubMed PMID: 9865725.
136. Giguère V. To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2002;13(5):220–5. doi: 10.1016/S1043-2760(02)00592-1.
137. Ariaizi EA, Jordan VC. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Curr Top Med Chem* 2006;6(3):203–15. PubMed PMID: 16515477.
138. Sonoda J, Laganière J, Mehl IR, Barish GD, Chong L-W, Li X, et al. Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev* 2007;21(15):1909–20. doi: 10.1101/gad.1553007. PubMed PMID: 17671090.
139. Alaynick WA, Kondo RP, Xie W, He W, Dufour CR, Downes M, et al. ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab* 2007;6(1):13–24. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.007. PubMed PMID: 17618853.
140. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, et al. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6570–5. doi: 10.1073/pnas.0401401101. PubMed PMID: 15100410.
141. Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):9079–91. doi: 10.1128/MCB.24.20.9079-9091.2004. PubMed PMID: 15456881.
142. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005;1(6):361–70. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004. PubMed PMID: 16054085.
143. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(17):6472–7. doi: 10.1073/pnas.0308686101. PubMed PMID: 15087503.
144. Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 2009;71:177–203. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163119. PubMed PMID: 19575678.
145. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006;126(4):789–99. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.049. PubMed PMID: 16923397.
146. Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguère V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 1997;388(6644):778–82. doi: 10.1038/42022. PubMed PMID: 9285590.
147. Deblouis G, Giguère V. Oestrogen-related receptors in breast cancer: Control of cellular metabolism and beyond. *Nat Rev Cancer* 2013;13(1):27–36. doi: 10.1038/nrc3396. PubMed PMID: 23192231.
148. Deblouis G, St-Pierre J, Giguère V. The PGC-1/ERR signaling axis in cancer. *Oncogene* 2013;32(30):3483–90. doi: 10.1038/onc.2012.529. PubMed PMID: 23208510.
149. Bianco S, Saillant J, Vanacker J-M. ERRs and cancers: Effects on metabolism and on proliferation and migration capacities. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;130(3–5):180–5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.014. PubMed PMID: 21414406.
150. Kim J-H, Choi Y-K, Byun J-K, Kim M-K, Kang YN, Kim SH, et al. Estrogen-related receptor γ is upregulated in liver cancer and its inhibition suppresses liver cancer cell proliferation via induction of p21 and p27. *Exp Mol Med* 2016;48:e213. doi: 10.1038/emm.2015.115. PubMed PMID: 26940882.
151. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, et al. Increased expression of estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2007;120(11):2325–30. doi: 10.1002/ijc.22363. PubMed PMID: 17294452.

152. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ijichi N, Ikeda K, Kumagai J, et al. Differential expression of estrogen-related receptors beta and gamma (ERRbeta and ERRgamma) and their clinical significance in human prostate cancer. *Cancer Sci* 2010;101(3):646–51. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01451.x. PubMed PMID: 20128821.
153. Yu S, Wang X, Ng C-F, Chen S, Chan FL. ERRgamma suppresses cell proliferation and tumor growth of androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells and its implication as a therapeutic target for prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67(10):4904–14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3855. PubMed PMID: 17510420.
154. Gao M, Sun P, Wang J, Zhao D, Wei L. Expression of estrogen receptor-related receptor isoforms and clinical significance in endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(2):827–33. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00527.x. PubMed PMID: 16681769.
155. Fujimoto J, Sato E. Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;116(1-2):71–5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.04.012. PubMed PMID: 19416752.
156. Kang M-H, Choi H, Oshima M, Cheong J-H, Kim S, Lee JH, et al. Estrogen-related receptor gamma functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):1920. doi: 10.1038/s41467-018-04244-2. PubMed PMID: 29765046.
157. Ariaizi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(22):6510–8. PubMed PMID: 12438245.
158. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, et al. Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res* 2004;64(13):4670–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0250. PubMed PMID: 15231680.
159. Sun P, Sehouli J, Denkert C, Mustea A, Könsgen D, Koch I, et al. Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells. *J Mol Med* 2005;83(6):457–67. doi: 10.1007/s00109-005-0639-3.
160. Audet-Walsh É, Yee T, McGuirk S, Vernier M, Ouellet C, St-Pierre J, et al. Androgen-Dependent Repression of ERR γ Reprograms Metabolism in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2017;77(2):378–89. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1204. PubMed PMID: 27821488.
161. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116(3):561–70. doi: 10.1172/JCI27987. PubMed PMID: 16511588.
162. Syed V, Ulinski G, Mok SC, Yiu GK, Ho SM. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61(18):6768–76. PubMed PMID: 11559549.
163. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21(3):427–33. doi: 10.1093/carcin/21.3.427.
164. Ariaizi EA, Ariaizi JL, Cordera F, Jordan VC. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Curr Top Med Chem* 2006;6(3):181–202. PubMed PMID: 16515478.
165. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11(5):325–37. doi: 10.1038/nrc3038. PubMed PMID: 21508971.
166. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11(2):85–95. doi: 10.1038/nrc2981. PubMed PMID: 21258394.
167. Cai Q, Lin T, Kamarajugadda S, Lu J. Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors. *Oncogene* 2013;32(16):2079–86. doi: 10.1038/onc.2012.221. PubMed PMID: 22665055.
168. Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS. The Drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metab* 2011;13(2):139–48. doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.005. PubMed PMID: 21284981.
169. Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, Tremblay AM, Eichner LJ, Arlow DH, et al. The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR α /PGC-1 α bioenergetic functions. *Genes Dev* 2010;24(6):537–42. doi: 10.1101/gad.1871610. PubMed PMID: 20194433.
170. Eichner LJ, Perry M-C, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, et al. miR-378(*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell Metab* 2010;12(4):352–61. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.002. PubMed PMID: 20889127.
171. Mungenast F, Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:192. doi: 10.3389/fendo.2014.00192. PubMed PMID: 25429284.
172. Old RW, Primrose SB. Principles of gene manipulation: An introduction to genetic engineering. 2nd ed. Studies in microbiology, Vol 2. Berkeley, Calif.: Univ. of California Press; 1981. 214 p.
173. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806–11. doi: 10.1038/35888. PubMed PMID: 9486653.
174. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999;99(2):123–32. PubMed PMID: 10535731.
175. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990;2(4):279–89. doi: 10.1105/tpc.2.4.279. PubMed PMID: 12354959.
176. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409(6818):363–6. doi: 10.1038/35053110. PubMed PMID: 11201747.
177. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25–33. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80620-0. PubMed PMID: 10778853.

178. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15(2):188–200. PubMed PMID: 11157775.
179. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 2000;404(6775):293–6. doi: 10.1038/35005107. PubMed PMID: 10749213.
180. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115(2):209–16. PubMed PMID: 14567918.
181. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115(2):199–208. PubMed PMID: 14567917.
182. Graw J. Genetik. 5th ed. Springer-Lehrbuch. Berlin u.a.: Springer; 2010. XXVIII, 852 S.
183. Caplen NJ, Fleenor J, Fire A, Morgan RA. dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: A tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 2000;252(1-2):95–105. PubMed PMID: 10903441.
184. Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 1992;12(11):5238–48. PubMed PMID: 1357546.
185. Clemens MJ, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: Structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17(9):503–24. doi: 10.1089/jir.1997.17.503. PubMed PMID: 9335428.
186. Clemens MJ. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(7):945–9. PubMed PMID: 9375375.
187. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494–8. doi: 10.1038/35078107. PubMed PMID: 11373684.
188. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7413–7. PubMed PMID: 2823261.
189. SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;59:223–39. doi: 10.1002/jcp.1030590302. PubMed PMID: 13911999.
190. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263(5148):802–5. doi: 10.1126/science.8303295. PubMed PMID: 8303295.
191. QIAGEN. RNeasy Micro Handbook;2014.
192. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease: Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18(24):5294–9. doi: 10.1021/bi00591a005.
193. Arnemann J. DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 719.
194. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970;226(5252):1209–11. PubMed PMID: 4316300.
195. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970;226(5252):1211–3. PubMed PMID: 4316301.
196. Agilent Technologies. AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit: Instruction Manual 2016.
197. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263–73. PubMed PMID: 3472723.
198. Jansohn M, Rothhámel S, editors. Gentechnische Methoden. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.
199. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Lab. Pr.
200. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494(1-2):23–7. PubMed PMID: 11072065.
201. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008;44(5):619–26. doi: 10.2144/000112776. PubMed PMID: 18474036.
202. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(4):413–7. PubMed PMID: 1368485.
203. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997;22(1):130-1, 134-8. PubMed PMID: 8994660.
204. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
205. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 1998;24(6):954–8, 960, 962. PubMed PMID: 9631186.
206. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245(2):154–60. doi: 10.1006/abio.1996.9916. PubMed PMID: 9056205.
207. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000;267(17):5421–6. PubMed PMID: 10951200.
208. Fields RD, Lancaster MV. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 1993;11(4):48–50. PubMed PMID: 7763491.
209. Promega Corporation. CellTiter-Blue Cell Viability Assay Technical Bulletin TB317: Instruction for Use of Products 2016.
210. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. *Cell* 2000;100(1):57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

211. Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995;11(2):211–9. PubMed PMID: 7624138.
212. D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8132–41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0886. PubMed PMID: 15623586.
213. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9(3):153–66. doi: 10.1038/nrc2602. PubMed PMID: 19238148.
214. Zhou Q. Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Ovarian Cancer. *Cancer investigation* 2017;35(6):367–76. doi: 10.1080/07357907.2017.1283508. PubMed PMID: 28406716.
215. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol* 2012;226(2):352–64. doi: 10.1002/path.3022. PubMed PMID: 21990031.
216. Ivy SP, Kunos CA, Arnaldez FI, Kohn EC. Defining and targeting wild-type BRCA high-grade serous ovarian cancer: DNA repair and cell cycle checkpoints. *Expert opinion on investigational drugs* 2019;28(9):771–85. doi: 10.1080/13543784.2019.1657403. PubMed PMID: 31449760.
217. Musgrove EA, Caldon CE, Barracough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11(8):558–72. doi: 10.1038/nrc3090. PubMed PMID: 21734724.
218. Dhar KK, Branigan K, Parkes J, Howells RE, Hand P, Musgrove C, et al. Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. *Br J Cancer* 1999;81(7):1174–81. doi: 10.1038/sj.bjc.6690826. PubMed PMID: 10584879; PubMed Central PMCID: PMC2374327.
219. Dai J, Wei R-J, Li R, Feng J-B, Yu Y-L, Liu P-S. A study of CCND1 with epithelial ovarian cancer cell proliferation and apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(20):4230–5. PubMed PMID: 27831653.
220. Masciullo V, Scambia G, Marone M, Giannitelli C, Ferrandina G, Bellacosa A, et al. Altered expression of cyclin D1 and CDK4 genes in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 1997;74(4):390–5. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970822)74:4<390::aid-ijc5>3.0.co;2-q. PubMed PMID: 9291427.
221. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5168–77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0751. PubMed PMID: 15297421.
222. Barbieri F, Lorenzi P, Ragni N, Schettini G, Bruzzo C, Pedullà F, et al. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. *Oncology* 2004;66(4):310–5. doi: 10.1159/000078332. PubMed PMID: 15218299.
223. Hashimoto T, Yanaihara N, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takakura S, et al. Cyclin D1 predicts the prognosis of advanced serous ovarian cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2011;2(2):213–9. doi: 10.3892/etm.2011.194. PubMed PMID: 22977490; PubMed Central PMCID: PMC3440647.
224. Keenan SM, Lents NH, Baldassare JJ. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J Biol Chem* 2004;279(7):5387–96. doi: 10.1074/jbc.M310383200. PubMed PMID: 14645251.
225. Chen Z, Duan R-S, Zhu Y, Folkesson R, Albanese C, Winblad B, et al. Increased cyclin E expression may obviate the role of cyclin D1 during brain development in cyclin D1 knockout mice. *Journal of neurochemistry* 2005;92(5):1281–4. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02934.x. PubMed PMID: 15715677.
226. Bowe DB, Kenney NJ, Adereth Y, Maroulakou IG. Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E. *Oncogene* 2002;21(2):291–8. doi: 10.1038/sj.onc.1205025. PubMed PMID: 11803472.
227. Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2009;69(16):6565–72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0913. PubMed PMID: 19638577.
228. Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(5):617–33. doi: 10.1586/14737159.3.5.617. PubMed PMID: 14510182.
229. Horiuchi D, Huskey NE, Kusdra L, Wohlbold L, Merrick KA, Zhang C, et al. Chemical-genetic analysis of cyclin dependent kinase 2 function reveals an important role in cellular transformation by multiple oncogenic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(17):E1019–27. doi: 10.1073/pnas.1111317109. PubMed PMID: 22474407; PubMed Central PMCID: PMC3340028.
230. Tadesse S, Caldon EC, Tilley W, Wang S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. *J Med Chem* 2019;62(9):4233–51. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01469. PubMed PMID: 30543440.
231. Duan P-J, Zhao J-H, Xie L-L. Cul4B promotes the progression of ovarian cancer by upregulating the expression of CDK2 and CyclinD1. *J Ovarian Res* 2020;13(1):76. doi: 10.1186/s13048-020-00677-w. PubMed PMID: 32622365; PubMed Central PMCID: PMC7335446.
232. He Y, Wei L, Zhang S, Liu H, Fang F, Li Y. LncRNA PLAC2 Positively Regulates CDK2 to Promote Ovarian Carcinoma Cell Proliferation. *Cancer management and research* 2020;12:5713–20. doi: 10.2147/CMAR.S242781. PubMed PMID: 32765074; PubMed Central PMCID: PMC7367733.
233. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004;432(7015):298–306. doi: 10.1038/nature03094. PubMed PMID: 15549091.
234. Bianco S, Lanvin O, Tribollet V, Macari C, North S, Vanacker J-M. Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation. *J Biol Chem* 2009;284(35):23286–92. doi: 10.1074/jbc.M109.028191. PubMed PMID: 19546226.
235. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2002;59(8):1317–26. doi: 10.1007/s00018-002-8510-y. PubMed PMID: 12363035.

236. Blegen H, Einhorn N, Sjovall K, Roschke A, Ghadimi BM, McShane LM, et al. Prognostic significance of cell cycle proteins and genomic instability in borderline, early and advanced stage ovarian carcinomas. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2000;10(6):477–87. doi: 10.1046/j.1525-1438.2000.00077.x.
237. Davidson B, Risberg B, Berner A, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB, et al. Expression of Cell Cycle Proteins in Ovarian Carcinoma Cells in Serous Effusions—Biological and Prognostic Implications. *Gynecol Oncol* 2001;83(2):249–56. doi: 10.1006/gyno.2001.6388.
238. Guo F, Zhang K, Li M, Cui L, Liu G, Yan Y, et al. miR-508-3p suppresses the development of ovarian carcinoma by targeting CCNA2 and MMP7. *Int J Oncol* 2020;57(1):264–76. doi: 10.3892/ijo.2020.5055. PubMed PMID: 32377701; PubMed Central PMCID: PMC7252466.
239. Chen W, Lee J, Cho SY, Fine HA. Proteasome-mediated destruction of the cyclin a/cyclin-dependent kinase 2 complex suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2004;64(11):3949–57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3906. PubMed PMID: 15173007.
240. Gopinathan L, Tan SLW, Padmakumar VC, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Loss of Cdk2 and cyclin A2 impairs cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res* 2014;74(14):3870–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3440. PubMed PMID: 24802190; PubMed Central PMCID: PMC4102624.
241. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31(1):13–20. doi: 10.1002/ijc.2910310104. PubMed PMID: 6339421.
242. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710–5. PubMed PMID: 6206131.
243. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123(3):513–22. doi: 10.1083/jcb.123.3.513. PubMed PMID: 8227122; PubMed Central PMCID: PMC2200129.
244. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311–22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311:AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PubMed PMID: 10653597.
245. Qiu D, Cai W, Zhang Z, Li H, Zhou D. High Ki-67 expression is significantly associated with poor prognosis of ovarian cancer patients: evidence from a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2019;299(5):1415–27. doi: 10.1007/s00404-019-05082-3. PubMed PMID: 30761416.
246. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005;73(4):1907–16. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005. PubMed PMID: 15784530; PubMed Central PMCID: PMC1087413.
247. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239–57. doi: 10.1038/bjc.1972.33. PubMed PMID: 4561027; PubMed Central PMCID: PMC2008650.
248. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology* 2001;9(3):113–4. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01936-3.
249. Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y, et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomed Pharmacother* 2020;121:109595. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109595. PubMed PMID: 31710896.
250. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30(1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87. PubMed PMID: 21943236; PubMed Central PMCID: PMC3197541.
251. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006;6(4):308–17. doi: 10.1038/nri1809. PubMed PMID: 16557262.
252. Green DR, Lambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015;7(12). doi: 10.1101/csdperspect.a006080. PubMed PMID: 2626938; PubMed Central PMCID: PMC4665079.
253. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(3):239–52. doi: 10.1101/gad.13.3.239. PubMed PMID: 9990849.
254. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(2):99–109. doi: 10.1038/nrmicro2070. PubMed PMID: 19148178; PubMed Central PMCID: PMC2910423.
255. Xia X, Wang X, Cheng Z, Qin W, Lei L, Jiang J, et al. The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death Dis* 2019;10(9):650. doi: 10.1038/s41419-019-1883-8. PubMed PMID: 31501419; PubMed Central PMCID: PMC6733901.
256. Delbridge ARD, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2016;16(2):99–109. doi: 10.1038/nrc.2015.17. PubMed PMID: 26822577.
257. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):47–59. doi: 10.1038/nrm2308. PubMed PMID: 18097445.
258. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradarani B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2129–44. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129. PubMed PMID: 25824729.
259. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20(3):175–93. doi: 10.1038/s41580-018-0089-8. PubMed PMID: 30655609; PubMed Central PMCID: PMC7325303.
260. Yuan J, Lan H, Jiang X, Zeng D, Xiao S. Bcl-2 family: Novel insight into individualized therapy for ovarian cancer (Review). *Int J Mol Med* 2020;46(4):1255–65. doi: 10.3892/ijmm.2020.4689. PubMed PMID: 32945348; PubMed Central PMCID: PMC7447322.

261. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388(6639):300–4. doi: 10.1038/40901. PubMed PMID: 9230442.
262. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999;18(19):5242–51. doi: 10.1093/emboj/18.19.5242. PubMed PMID: 10508158; PubMed Central PMCID: PMC1171595.
263. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1796–803. PubMed PMID: 10815900.
264. Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis* 2017;22(12):1487–509. doi: 10.1007/s10495-017-1429-4. PubMed PMID: 29067538.
265. Tu H, Costa M. XIAP's Profile in Human Cancer. *Biomolecules* 2020;10(11). doi: 10.3390/biom10111493. PubMed PMID: 33138314; PubMed Central PMCID: PMC7692959.
266. Li X, Chen W, Zeng W, Wan C, Duan S, Jiang S. microRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XIAP. *Br J Cancer* 2017;116(1):66–76. doi: 10.1038/bjc.2016.379. PubMed PMID: 27875524; PubMed Central PMCID: PMC5220146.
267. Pang Y, Mao H, Shen L, Zhao Z, Liu R, Liu P. MiR-519d represses ovarian cancer cell proliferation and enhances cisplatin-mediated cytotoxicity in vitro by targeting XIAP. *Oncotargets and therapy* 2014;7:587–97. doi: 10.2147/OTT.S60289. PubMed PMID: 24790458; PubMed Central PMCID: PMC4003267.
268. Sun L, Zhai R, Zhang L, Zhao S. MicroRNA-149 suppresses the proliferation and increases the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting X-linked inhibitor of apoptosis. *Oncol Lett* 2018;15(5):7328–34. doi: 10.3892/ol.2018.8240. PubMed PMID: 29731888; PubMed Central PMCID: PMC5920966.
269. Shaw TJ, Lacasse EC, Durkin JP, Vanderhyden BC. Downregulation of XIAP expression in ovarian cancer cells induces cell death in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2008;122(6):1430–4. doi: 10.1002/ijc.23278. PubMed PMID: 18027851.
270. Li J, Feng Q, Kim JM, Schneiderman D, Liston P, Li M, et al. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 2001;142(1):370–80. doi: 10.1210/endo.142.1.7897. PubMed PMID: 11145600.
271. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397(6718):441–6. doi: 10.1038/17135. PubMed PMID: 9989411.
272. Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends in Cell Biology* 2006;16(5):264–72. doi: 10.1016/j.tcb.2006.03.008.
273. Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling Activities of AIF in Cell Death versus Survival. *Cell* 2002;111(2):147–50. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01046-2.
274. Zhang Y, Yang Y, Liu R, Meng Y, Tian G, Cao Q. Downregulation of microRNA-425-5p suppresses cervical cancer tumorigenesis by targeting AIFM1. *Experimental and therapeutic medicine* 2019;17(5):4032–8. doi: 10.3892/etm.2019.7408. PubMed PMID: 30988784; PubMed Central PMCID: PMC6447898.
275. Rao S, Mondragón L, Pranjic B, Hanada T, Stoll G, Köcher T, et al. AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. *Cell Res* 2019;29(7):579–91. doi: 10.1038/s41422-019-0181-4. PubMed PMID: 31133695; PubMed Central PMCID: PMC6796841.
276. Zhang W-H, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, et al. Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(26):16012–7. doi: 10.1073/pnas.2534856100. PubMed PMID: 14663141; PubMed Central PMCID: PMC307684.
277. Sollberger G, Strittmatter GE, Grossi S, Garstkiewicz M, Keller U auf dem, French LE, et al. Caspase-1 activity is required for UVB-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2015;135(5):1395–404. doi: 10.1038/jid.2014.551. PubMed PMID: 25562666.
278. Xi H, Zhang Y, Xu Y, Yang WY, Jiang X, Sha X, et al. Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyrop-Apoptosis in Endothelial Cells. *Circulation research* 2016;118(10):1525–39. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308501. PubMed PMID: 27006445; PubMed Central PMCID: PMC4867131.
279. Sun Y, Guo Y. Expression of Caspase-1 in breast cancer tissues and its effects on cell proliferation, apoptosis and invasion. *Oncol Lett* 2018;15(5):6431–5. doi: 10.3892/ol.2018.8176. PubMed PMID: 29725399; PubMed Central PMCID: PMC5920210.
280. Feng Q, Li P, Salamanca C, Huntsman D, Leung PCK, Auersperg N. Caspase-1alpha is down-regulated in human ovarian cancer cells and the overexpression of caspase-1alpha induces apoptosis. *Cancer Res* 2005;65(19):8591–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0239. PubMed PMID: 16204022.
281. Jiang Z, Yao L, Ma H, Xu P, Li Z, Guo M, et al. miRNA-214 Inhibits Cellular Proliferation and Migration in Glioma Cells Targeting Caspase 1 Involved in Pyroptosis. *Oncology research* 2017;25(6):1009–19. doi: 10.3727/096504016X14813859905646. PubMed PMID: 28244850.
282. Li J, Yang C, Li Y, Chen A, Li L, You Z. LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer by inducing inflammasome formation. *Biosci Rep* 2018;38(2). doi: 10.1042/BSR20171150. PubMed PMID: 29229673; PubMed Central PMCID: PMC5857912.
283. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6):442–54. doi: 10.1038/nrc822. PubMed PMID: 12189386.
284. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420–8. doi: 10.1172/JCI39104. PubMed PMID: 19487818; PubMed Central PMCID: PMC2689101.
285. Lamouille S, Xu J, Deryck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96. doi: 10.1038/nrm3758. PubMed PMID: 24556840; PubMed Central PMCID: PMC4240281.

286. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(2):131–42. doi: 10.1038/nrm1835. PubMed PMID: 16493418.
287. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 6):727–35. doi: 10.1242/jcs.000455. PubMed PMID: 18322269.
288. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871–90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PubMed PMID: 19945376.
289. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20(2):69–84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4. PubMed PMID: 30459476.
290. Hosseini K, Taubenberger A, Werner C, Fischer-Friedrich E. EMT-Induced Cell-Mechanical Changes Enhance Mitotic Rounding Strength. *Adv Sci (Weinh)* 2020;7(19):2001276. doi: 10.1002/advs.202001276. PubMed PMID: 33042748; PubMed Central PMCID: PMC7539203.
291. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* 2011;9(12):1608–20. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0568. PubMed PMID: 21840933.
292. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews. Clinical oncology* 2017;14(10):611–29. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44. PubMed PMID: 28397828; PubMed Central PMCID: PMC5720366.
293. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990;59:237–52. doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.001321. PubMed PMID: 2197976.
294. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems* 2008;4(8):835–50. doi: 10.1039/b719215k. PubMed PMID: 18633485.
295. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1994;1198(1):11–26. doi: 10.1016/0304-419X(94)90003-5.
296. Cao Z-Q, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed Pharmacother* 2019;118:109320. doi: 10.1016/j.bioph.2019.109320. PubMed PMID: 31545265.
297. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 2018;18(1):939. doi: 10.1186/s12885-018-4845-0. PubMed PMID: 30285678; PubMed Central PMCID: PMC6167798.
298. Rosso M, Majem B, Devis L, Lapyckyj L, Besso MJ, Llauradó M, et al. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. *PLoS ONE* 2017;12(9):e0184439. doi: 10.1371/journal.pone.0184439. PubMed PMID: 28934230; PubMed Central PMCID: PMC5608212.
299. Klymenko Y, Kim O, Stack MS. Complex Determinants of Epithelial: Mesenchymal Phenotypic Plasticity in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(8). doi: 10.3390/cancers9080104. PubMed PMID: 28792442; PubMed Central PMCID: PMC5575607.
300. Loret N, Denys H, Tummers P, Berx G. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel)* 2019;11(6). doi: 10.3390/cancers11060838. PubMed PMID: 31213009; PubMed Central PMCID: PMC6628067.
301. Tiraby C, Hazen BC, Gantner ML, Kralli A. Estrogen-related receptor gamma promotes mesenchymal-to-epithelial transition and suppresses breast tumor growth. *Cancer Res* 2011;71(7):2518–28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1315. PubMed PMID: 21339306.
302. Kvedar JC, Manabe M, Phillips SB, Ross BS, Baden HP. Characterization of sciillin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. *Differentiation* 1992;49(3):195–204. doi: 10.1111/j.1432-0436.1992.tb00667.x. PubMed PMID: 1377656.
303. Chou C-K, Fan C-C, Lin P-S, Liao P-Y, Tung J-C, Hsieh C-H, et al. Sciillin mediates mesenchymal-to-epithelial transition in colorectal cancer hepatic metastasis. *Oncotarget* 2016;7(18):25742–54. doi: 10.18632/oncotarget.8264. PubMed PMID: 27013588; PubMed Central PMCID: PMC5041940.
304. Nagy A, Banyai D, Semjen D, Beothe T, Kovacs G. Sciillin is a marker for papillary renal cell tumours. *Virchows Archiv* 2015;467(6). doi: 10.1007/s00428-015-1856-y. PubMed PMID: 26475151.
305. Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1999;1455(2-3):301–13. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00055-1.
306. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(3):339–53. doi: 10.1023/a:1011379725811. PubMed PMID: 11547902.
307. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010;29(20):2893–904. doi: 10.1038/onc.2010.87. PubMed PMID: 20348949; PubMed Central PMCID: PMC2879972.
308. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 2014;20(6):332–42. doi: 10.1016/j.molmed.2014.02.007. PubMed PMID: 24667139; PubMed Central PMCID: PMC5500204.
309. Deng J, Wang L, Chen H, Li L, Ma Y, Ni J, et al. The role of tumour-associated MUC1 in epithelial ovarian cancer metastasis and progression. *Cancer metastasis reviews* 2013;32(3-4):535–51. doi: 10.1007/s10555-013-9423-y. PubMed PMID: 23609751.
310. Ponnusamy MP, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, Vaz AP, Chugh S, Batra SK. Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition. *Curr Cancer Drug Targets* 2013;13(9):945–56. doi: 10.2174/156800961136660100. PubMed PMID: 24168188; PubMed Central PMCID: PMC3924542.
311. Rajabi H, Kufe D. MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017;1868(1):117–22. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.03.003. PubMed PMID: 28302417; PubMed Central PMCID: PMC5548633.

312. Roy LD, Sahraei M, Subramani DB, Besmer D, Nath S, Tinder TL, et al. MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 2011;30(12):1449–59. doi: 10.1038/onc.2010.526. PubMed PMID: 21102519; PubMed Central PMCID: PMC3063863.
313. Lam SS, Mak AS, Yam JW, Cheung AN, Ngan HY, Wong AS. Targeting estrogen-related receptor alpha inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell properties of ovarian cancer cells. *Mol Ther* 2014;22(4):743–51. doi: 10.1038/mt.2014.1. PubMed PMID: 24419103; PubMed Central PMCID: PMC3982489.
314. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18(2):128–34. doi: 10.1038/nrc.2017.118. PubMed PMID: 29326430.
315. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014;16(6):488–94. doi: 10.1038/ncb2976. PubMed PMID: 24875735.
316. Lu W, Kang Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental cell* 2019;49(3):361–74. doi: 10.1016/j.devcel.2019.04.010. PubMed PMID: 31063755; PubMed Central PMCID: PMC6506183.
317. Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E, et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front. Oncol.* 2015;5:155. doi: 10.3389/fonc.2015.00155. PubMed PMID: 26258068; PubMed Central PMCID: PMC4507461.

D A N K S A G U N G

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung und Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Zuerst danke ich Prof. Dr. med. Olaf Ortmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema zu bearbeiten und meine Experimente an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der durch seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente, bei der Auswertung der Daten und bei der schriftlichen Ausarbeitung den erfolgreichen Abschluss meiner Dissertationsarbeit ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Bettina Federhofer für die fachkundige Einarbeitung in die labortechnischen Methoden, die kollegiale Zusammenarbeit im Labor und ihre wertvolle Unterstützung und Hilfbereitschaft bedanken, die wesentlich zum Gelingen meiner Experimente beigetragen haben. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Vanessa Wagmüller, die mich auch über die gemeinsame Zeit im Labor hinaus stets zum Weitemachen motiviert hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich während der Zeit meiner Dissertation unterstützt, ermutigt und begleitet haben.

E I D E S S T A T T L I C H E E R K L Ä R U N G

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Erlangen, 14.02.2021