

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Validierung eines 3D Ovarialkarzinommodells für die
translationale Testung einer Kombinationstherapie aus
Chemotherapeutikum und Rezeptor-Tyrosinkinase
Inhibitoren

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Jan Dittrich
aus Worms

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk Bauerschlag
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Heinz Bodo Günther
Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 28.10.2025
gez. Prof. Dr. Dirk Bauerschlag
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Kurzfassung

Das Ovarialkarzinom besitzt unter den gynäkologischen Tumoren die höchste Letalität. Es ist eine der häufigsten Ursachen für krebisbedingte Todesfälle der Frau in Deutschland. Ursächlich hierfür ist, neben der späten Detektion, die bei mehr als der Hälfte der erkrankten Patientinnen auftretende Resistenz gegen platinhaltige Chemotherapeutika. Die Testung von Wirkstoffen, die insbesondere in der Rezidivsituation therapeutische Effekte erzielen können, ist daher von großem klinischen Interesse. Ebenso die Etablierung eines zuverlässigen und validen *in vivo* ähnlichem Testsystem für diese Therapeutika Testung.

Die Arbeitsgruppe „Translationale Gynäkologische Onkologie“ der Uniklinik Kiel konnte in vorausgegangenen Arbeiten zeigen, dass *A Disintegrin- and Metalloprotease 17* (ADAM17), ein im Ovarialkarzinom stark exprimiertes Enzym, durch Cisplatin vermehrt aktiviert wird. Zu den Substraten von ADAM17 gehören unter anderem Wachstumsfaktoren, die dann durch die gesteigerte proteolytische Aktivität vermehrt von der Zellmembran freigesetzt werden. Diese Wachstumsfaktoren binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen und führen über nachgeschaltete Signalwege zur gesteigerten Proliferation und einer Inhibition der Apoptose. Diese Effekte vermindern folglich den zytotoxischen Effekt des Cisplatins. Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz von ADAM17 und seiner nachgeschalteten Signalwege als Zielstruktur für neue Therapieansätze zu evaluieren, sowie ein Arbeitsschema für die routinemäßige translationale Testung verschiedener Therapeutika (-kombinationen) zu etablieren.

Inhaltlich besteht diese Arbeit aus zwei Teilen. Im ersten Teil wurde der Effekt der ADAM17 Inhibition in den Ovarialkarzinom Zelllinien A2780 und OVCAR8 in Zellkulturexperimenten analysiert. Anhand einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurde die Cisplatin-Konzentration ermittelt, bei der zusammen mit dem ADAM17 Inhibitor der beste kombinatorische Effekt beobachtet wurde. Um die Hypothese zu prüfen, ob bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen verstärkt unter Cisplatin aktiviert und durch die ADAM17 Inhibition vermindert phosphoryliert werden, wurde die Phosphorylierung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen mittels dem Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array nach der Kombinationstherapie untersucht. Im Folgenden wurden die Inhibition einer der so herausgearbeiteten Rezeptor-Tyrosinkinasen exemplarisch untersucht. Zeitgleich erfolgte im zweiten Teil dieser Arbeit die Translation des Versuchsaufbaus in ein 3D Zellkulturmodell. Vor der Überführung in die primäre Zellkultur wurde die Robustheit und die Reliabilität dieses Modells hinsichtlich der

Reliabilität der Durchmesser der Sphäroide überprüft, zudem wurde ein Mechanismus zur Qualitätssicherung eingeführt.

Der bereits zuvor beschriebene Effekt der ADAM17 Inhibition konnte für die Zelllinien A2780 und OVCAR8 bestätigt werden. In der 2D Zellkultur zeigte sich, dass die selektive ADAM17 Inhibition bereits in Abwesenheit von Cisplatin die Zellviabilität reduzierte und die Kombination von Cisplatin und dem ADAM17 Inhibitor die Cisplatin induzierte Caspase 3/7 Aktivität verstärkte. Cisplatin steigert zudem die Freisetzung der ADAM17 Substrate AREG und HB-EGF. Diese Cisplatin induzierte Freisetzung konnte durch die Applikation des ADAM17 Inhibitors blockiert werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung der nachfolgenden Phosphorylierungs Analyse zeigten einen großen Einfluss von ADAM17 auf die Aktivität der ErbB Rezeptor Familie (insbesondere ErbB2, ErbB3), sowie des FGF R4, IGF-I und des HGF-Rezeptors in beiden Zelllinien. In Anlehnung an den durch den ADAM17 Inhibitor ausgelösten Effekt, führte die Kombination aus Cisplatin und dem dualen EGFR/ErbB2 Inhibitor Lapatinib zu einer signifikant verstärkten Caspase 3/7 Aktivität in OVCAR8.

Die systematische Erhebung der Durchmesser in der 3D Zellkultur belegte die hohe Reproduzierbarkeit uniformer Sphäroide, insbesondere in der kompakt wachsenden Zelllinie OVCAR8. Zudem bestätigte sich die verstärkte Cisplatin induzierte Caspase 3/7 Aktivierung durch die Zugabe des ADAM17 Inhibitors. Die zytotoxische Wirkung der Kombinationstherapie konnte durch automatisierte Mikroskopie visualisiert und quantifiziert werden. Der größte kombinatorische Effekt zeigte sich erneut, sobald die Cisplatin Monotherapie Apoptose induzierte. Parallel zur 2D Kultur wurde die konstitutive und die induzierte Substratfreisetzung erfolgreich durch die ADAM17 Inhibierung blockiert.

Die Translation in die primäre Zellkultur zeigte eine höhere Resistenz gegenüber der Cisplatin Therapie im Vergleich zu den etablierten Zelllinien. In der Tumor- und Aszites Probe der Patientin UF-354 bestätigte sich zudem die gesteigerte Wirksamkeit der Cisplatin Behandlung durch die Kombinationstherapie mit GW280264X. Die Therapeutika Testung konnte zuverlässig in ein 3D Modell mit primärem Zellmaterial übertragen werden. Diese robuste zweistufige Read-Out Sequenz bietet eine zuverlässige Methode zur Testung neuer Therapieansätze in 3D Kulturen, wie beispielsweise die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch die Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten des Ovarialkarzinoms kann die Lebenserwartung der betroffenen Patientinnen langfristig verbessern werden. Die Ergebnisse sind vielversprechend und ermutigen zu weiteren Forschungen auf diesem Gebiet.

Abstract

Ovarian cancer has the highest lethality among gynecological tumors. It is therefore one of the most frequent causes of cancer-related deaths in women in Germany. In addition to late detection, this is due to resistance to platinum-containing chemotherapeutic agents, which occurs in more than 50 % of patients with the disease. The testing of agents that can achieve therapeutic effects, particularly in the relapse situation, is therefore of great clinical interest. Likewise, the establishment of a reliable and valid *in vivo* test system for these therapeutics testing.

The research group "Translational Gynecological Oncology" of Kiel University Hospital could show in previous work that A Disintegrin- and Metalloprotease 17 (ADAM17), an enzyme strongly expressed in ovarian cancer, is increasingly activated by cisplatin. Among the substrates of ADAM17 are growth factors, which are then increasingly released from the cell membrane due to the increased proteolytic activity. These growth factors bind to receptor tyrosine kinases and lead to enhanced proliferation and an inhibition of apoptosis via downstream signaling pathways. These effects consequently diminish the cytotoxic effect of cisplatin. The aim of this work was to evaluate the relevance of ADAM17 and its downstream signaling pathways as a target for novel therapeutic approaches, and to establish a working scheme for routine translational testing of different therapeutic agents (combinations).

This work consists of two parts. In the first part, the effect of ADAM17 inhibition in ovarian cancer cell lines A2780 and OVCAR8 was analyzed in cell culture experiments. A dose-response relationship was used to determine the cisplatin concentration at which the best combinatorial effect was obtained together with the ADAM17 inhibitor. To test the hypothesis whether certain receptor tyrosine kinases are highly activated under cisplatin and decreased phosphorylated by ADAM17 inhibition, phosphorylation status of various receptor tyrosine kinases was examined using a Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array after combination therapy. Subsequently, inhibition of one of the receptor tyrosine kinases thus identified was investigated as an example. Simultaneously, the translation of the experimental setup into a 3D cell culture model was performed in the second part of this work. Before translation into primary cell culture, the robustness and reliability of this model with respect to the reliability of the diameters of the spheroids was checked, and a quality control mechanism was also implemented to guarantee similar diameters.

The previously reported effect of ADAM17 inhibition was confirmed for the A2780 and OVCAR8 cell lines. In 2D cell culture, selective ADAM17 inhibition was shown to reduce cell viability already in the absence of cisplatin, and the combination of cisplatin and the ADAM17 inhibitor enhanced cisplatin-induced caspase 3/7 activity. Cisplatin also increased the release of the ADAM17 substrates AREG and HB-EGF. This cisplatin-induced release could be inhibited by application of the ADAM17 inhibitor. The results of quantification of subsequent phosphorylation analysis showed a major effect of ADAM17 on the activity of the ErbB receptor family (especially ErbB2, ErbB3), as well as FGF R4, IGF-I, and the HGF receptor in both cell lines. Following the effect triggered by the ADAM17 inhibitor, the combination of cisplatin and the dual EGFR/ErbB2 inhibitor lapatinib significantly enhanced caspase 3/7 activity in OVCAR8.

Systematic survey of diameters in 3D cell culture demonstrated the high reproducibility of uniform spheroids, particularly in the compact growing cell line OVCAR8. Moreover, the enhanced cisplatin-induced caspase 3/7 activation was confirmed by the addition of ADAM17 inhibitor. The cytotoxic effect of the combination therapy could be visualized and quantified by automated microscopy. The strongest combinatorial effect was again seen once cisplatin monotherapy induced apoptosis. In parallel with 2D culture, constitutive and induced substrate shedding was successfully inhibited by ADAM17 inhibition.

Translation into primary cell culture showed higher resistance to cisplatin therapy compared to established cell lines. In the tumor and ascites sample of patient UF-354, the increased efficacy due to the combination therapy was also confirmed. Therapeutics testing could be reliably transferred to a 3D model with primary cell material. This robust two-stage read-out sequence provides a reliable method for testing new therapeutic approaches in 3D cultures, such as the inhibition of receptor tyrosine kinases. By improving the treatment options for ovarian cancer, the life expectancy of affected patients can be improved in the long term. The results are promising and encourage further research in this field.