Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Direktor Univ.- Prof. Dr. Marek Zygmunt) der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

PARP-Hemmung sensibilisiert humane endometriale Karzinomzellen für Chemotherapie-induzierte Apoptose

Inaugural - Dissertation zur

Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

> der Universitätsmedizin der Universität Greifswald 2022

> > vorgelegt von: Fiß, Friederike, geb. Jahn geb. am: 26.12.1987 in: Quedlinburg

Dekanat: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Marek Tadeusz Zygmunt

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Stubert

Ort, Raum: Greifswald, Universitätsmedizin Greifswald, Klinik und Poliklinik für Innere

Medizin C, Raum J.0.37

Tag der Disputation: 27.02.2023

INHALTSVERZEICHNIS

A	BBIL	DUN	GSVERZEICHNIS	v		
T	ABEL	LEN.	VERZEICHNIS	.vi		
A	BKÜI	RZUI	NGSVERZEICHNIS	vii		
1	Ein	Einleitung				
	1.1	Das	Endometriumkarzinom	9		
	1.1	.1	Ätiologie und Pathogenese	10		
	1.1	.2	Diagnostik des Endometriumkarzinoms	12		
	1.1	.3	Therapie des Endometriumkarzinoms	14		
	1.1	.4	Rezidive	15		
	1.2	Pac	litaxel und Carboplatin in der Therapie des Endometriumkarzinoms	17		
	1.2	.1	Paclitaxel	17		
	1.2	.2	Carboplatin	18		
	1.3	PA	RP als Target in der Therapie des Endometriumkarzinoms	20		
	1.4	Der	Effekt der PARP-Inhibitoren durch synthetische Letalität	20		
	1.5	Übe	erblick über Substanzen zur PARP-Hemmung	24		
	1.6	Hyp	poxie im Tumorgewebe	26		
	1.7	Zel	lkulturen und Zelllinien	27		
	1.8	Fra	gestellung	29		
2	Ma	terial	l	30		
	2.1	Ger	äte	30		
	2.2	Ver	brauchsmaterialien	30		
2.3 Chemikalien		emikalien	31			
	2.3	.1	Nährmedien/ Zellkultur	31		
	2.3	.2	Chemotherapeutika	32		
	2.3	.3	Antikörper und DNA-Bindestoffe	32		
	2.3.4		Molekularbiologische Reagenzien	.32		

	2.3.5		Sonstige Chemikalien	33
	2.3.	.6	Pufferzusammensetzungen	34
	2.3.7		Zellmaterial	35
	2.4	Soft	ware	36
3	Me	thode	n	37
	3.1	Zelll	kulturen	37
	3.1.	.1	Versorgung der Zellkulturen	37
	3.2	Vita	litätsassay Cell Titer Blue®	40
	3.3	Wes	tern Blot Analyse	40
	3.3.	.1	Herstellung von Zelllysat	40
	3.3.	.2	Proteinbestimmung mittels BCA™	41
	3.3.	.3	Gelelektrophorese	41
3.3.4		.4	Western Blot	42
	3.3.	.5	Immundetektion	43
	3.4	PAR	P Universal Colorimetric Assay / PARP Activity Assay	44
	3.5	Durc	chflusszytometrie nach Nicoletti	45
	3.6	Stati	stische Auswertung	47
4	Erg	ebnis	se	48
	4.1	Dosi	sfindung für die Chemotherapeutika	48
	4.2	Wes	tern Blot Analysen	52
	4.3	PAR	P-Aktivitätsassay	54
	4.4	Pacl	itaxel und PJ34 im Vitalitätsassay Cell Titer Blue®	56
	4.5	Pacl	itaxel und PJ34 in der Durchflusszytometrie nach Nicoletti	59
	4.6	Carb	ooplatin und PJ34 im Vitalitätsassay Cell Titer Blue®	61
	4.7	Carb	ooplatin und PJ34 in der Durchflusszytometrie nach Nicoletti	63
5	Dis	kussio	on	65
	5.1	PAR	P-Inhibitoren in der translationalen Forschung	65

5.2	5.2 Die Chemotherapie des Endometriumkarzinoms				
5.3	.3 Einordnung der Ergebnisse in das Forschungsumfeld	71			
5.4 Nekrose und Apoptose		74			
5.:	.5 Methodische Einschränkungen	75			
5.0	.6 Hypoxie	77			
5.′	.7 Ausblick				
6	Zusammenfassung				
7	Literaturverzeichnis				
Publ	Publikationen				

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms
Abbildung 2: Chemische Grundstruktur von Paclitaxel17
Abbildung 3: Wirkungsweise von Paclitaxel im Vergleich zu Vinblastin und Colchicin 17
Abbildung 4: Chemische Grundstruktur von Carboplatin18
Abbildung 5: Wesentliche Cisplatin - Resistenzmechanismen
Abbildung 6: Synergismus von PARP-Inhibition und BRCA 1 und 2-Defizienz durch
Mutation
Abbildung 7: PTEN als Teil des PI3-Kinase-Akt-Siglnalwegs
Abbildung 8: Funktionsweise von , synthetischer Letalität'
Abbildung 9: PARP-Inhibitor PJ3424
Abbildung 10: Tabellarische Übersicht verschiedener PARP-Inhibitoren25
Abbildung 11: PTEN-Status im Western Blot von den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-
1A, KLE, RL95-2
Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Western Blots
Abbildung 13: Pipettierschema des PARP Activity Assays
Abbildung 14: Graphische Darstellung nach Sortierung der Zellen und Zellfragmente 46
Abbildung 15: Dosistitration mit Paclitaxel
Abbildung 16: Dosistitration mit Carboplatin51
Abbildung 17: Western Blot Analyse zur Darstellung von PARP, PTEN, Akt und p-Akt. 53
Abbildung 18: PARP-Aktivität im PARP Universal Colorimetric Assay gegenübergestellt
zur Ausprägung der Banden in der Western Blot- Analyse55
Abbildung 19: Zellviabilität bei AN3-CA mittels Cell Titer Blue® unter PJ34 in
Kombination mit 100 nM PTX57
Abbildung 20: Zellviabilität mittels Cell Titer Blue® unter Kombination von Paclitaxel und
PJ34
Abbildung 21: FACS- Detektion bei Kombination von Paclitaxel und PJ3460
Abbildung 22: Zellviabilität bei KLE mittels Cell Titer Blue® unter PJ34 in Kombination
mit 100 μM Carboplatin61
Abbildung 23: Zellviabilität mittels Cell Titer Blue® unter Kombination von PJ34 und
Carboplatin
Abbildung 24: FACS-Detektion bei Kombination von Carboplatin und PJ34

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften der ausgewählten Zelllinien nach Stayaswaroop et al	28
Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährmedien	38
Tabelle 3: Übersicht über nachgewiesene Proteine im Western Blot	53
Tabelle 4: Durch das Sanger-Institute katalogisierte Mutationen	69
Tabelle 5: Im Western Blot detektierte Proteine in den 5 eingesetzten Zelllinien	69
Tabelle 6: Kombinationsversuche mit Chemotherapie + PARP- Inhibitor PJ34	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheit	Beschreibung
°C	Grad Celsius
μ	mycro (x10^-6)
Abb.	Abbildung
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen
	Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BSA	Bovines Serum Albumin
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Caspase	Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutation in Cancer (Katalog
	somatischer Krebsmutationen)
CTB	Cell Titer Blue®
Da	Dalton
ddH₂O	zweifach destilliertes Wasser
DDR	DNA-Damage-Response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (enzymatisches
	Immunadsorptionsverfahren)
EMA	European Medicines Agency (Europäische
	Arzneimittelbehörde)
ESMO	European Society for Medical Oncology (Europäische
. 1	Gesellschaft für klinische Onkologie)
et al.	" <i>et alu" m.</i> , " <i>et alue" f.</i> (Lat. und andere)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS EDS	<i>Fetal Call Serum</i> (Fetales Kalberserum)
	<i>Les Food and Drug Administration (compilization)</i>
FDA	D.S. Food and Drug Administration (amerikanische Dehörde für Lehene, und Arzneimittel)
FIGO	Eddaration Internationale de Cynécologie et d'Obstétuique
1100	(Internationale Versinigung für Gynecologie und
	Geburtshilfe)
q	Gramm
σ	Vielfaches der Erdbeschleunigung g (bei Zentrifugation)
GATA2	Gen, das das GATA binding protein 2 kodiert
h	Stunde
HIF	Hypoxia inducable factor
HNPCC	Hereditary Non- Polyposis Colorectal Cancer (hereditäres
	kolorektales Karzinom ohne Polyposis)
HRP	Horseraddish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSA-Enzyme	High Specific Activity Enzyme
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
1	Liter
М	Molar = mol/l
m	milli (x10^-3)

	٠	٠	•
	٠		
••	L		
v	L		
-	-	-	-

m	Meter
mAB	molecular antibody (molekularer Antikörper)
MEM	minimal essential medium (Minimal essentielles Medium)
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	nano (x10^-9)
NHEJ	Non-homologous-end-joining
n.s.	n.s. = nicht signifikant
p-Akt	Phospho-Akt
PARP	Poly ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (phosphatgepufferte
120	physiologische Kochsalzlösung)
PCO	Syndrom der polyzystischen Ovarien
PD-1	programmed cell death protein $l = Protein zum$
	programmierten Zelltod-1
PD-I 1	programmed death-ligand l = programmierter Zelltod -
	Ligand 1
ÞF	Phycoerythrin
DET	Positronenemissionstomographie
DI3 K	Phosphatidylinosital 4.5 Bisphosphat 3 Kinase
I IJ-K DTEN	Dheenhotese and Tensin Hemolog
Γ Ι ΕΙΝ DTV	Phosphatase and Tensin Homolog
	Pacification diffuserid
	kibonucieinsaure
RPS0KA2	ribosomale Protein-So-Kinase
RIK	Rezeptortyrosinkinase
S CDC	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHRP	Streptavidin-Horesradish peroxidase (Meerrettich-
	Peroxidase)
siRNA	Small interfering RNA = kleine eingreifende RNA
SUMO	small ubiquitin-related modifier = kleiner Ubiquitin-
	verwandter Modifikator
TNM	Klassifikation maligner Tumore (<u>tumor, lymph nodes</u> ,
	<u>m</u> etastasis)
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

1 Einleitung

Krebstherapie basiert neben operativen Verfahren auf der Zerstörung der Krebszelle mittels Chemo- und Strahlentherapie, indem die Instabilität des Genoms der Krebszelle genutzt wird. Seit Jahrzehnten macht sich die Medizin diese Methoden zum Angriff auf die Vermehrung und Merkmalsausprägung der entarteten Zellen zu Nutze.

Als neuer Ansatz wird vielfach zusätzlich in die genetischen Reparaturmechanismen der Zellen eingegriffen, um zum einen eine Gegensteuerung der Karzinomzellen auf die zytotoxische Therapie zu verhindern und zum anderen synergistische Effekte mehrerer vernetzter Wirkprinzipien zu nutzen. Dieser Effekt wird in der vorliegenden Arbeit anhand von PARP-Inhibition und zytotoxischer Chemotherapie an Endometriumkarzinomzellen erklärt und unterstrichen.

1.1 Das Endometriumkarzinom

Uterine Karzinome sind die häufigsten gynäkologischen Malignome, 95 % der dort entstehenden malignen Neubildungen betreffen das Endometrium (1). Das Endometriumkarzinom ist mit einer Inzidenz von 10.093 Neuerkrankungen pro Jahr das in Deutschland vierthäufigste Malignom der Frau (2). Die Sterblichkeit beträgt hierzulande, bei im Vergleich zu anderen Ländern fast höchster Inzidenz, 1,9 % aller krebsbedingten Todesfälle bei Frauen. Weltweit nimmt das Endometriumkarzinom mit 142.000 Neuerkrankungen pro Jahr die siebente Stelle ein.

Die Risikofaktoren (insbesondere für das Typ-I-Endometriumkarzinom, auf das später noch im Detail eingegangen wird) stellen sich wie folgt dar:

- Langzeiteinnahme von Östrogenpräparaten ohne Gestagen, insbesondere Hormontherapie mit einer kürzer als zwölf Tage/Monat andauernden Gestagen-Gabe
- ein metabolisches Syndrom mit Adipositas
- Diabetes Mellitus Typ II
- das Syndrom des Polyzystischen Ovars (PCO-Syndrom)
- eine lange Lebensphase mit Menstruationsblutungen
- Nulliparidität
- ein Mammakarzinom in der Eigenanamnese
- hohe Östradiol-Serumkonzentration, auch sezerniert durch andere Malignome
- Tamoxifen-Therapie

- hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) oder auch Lynch-Syndrom genannt als autosomal-dominant vererbtes Merkmal
- (3)

Die 5-Jahres-Überlebensrate für das Endometriumkarzinom wird zwischen 72 % in Europa und 84 % in den USA angegeben (2).

Das Endometriumkarzinom ist ein Karzinom der älteren Frau. In mehr als 90 % der Fälle sind die Betroffenen 50 Jahre und älter, das mediane Alter, in dem die Erkrankung diagnostiziert wird, beträgt 63 Jahre (4). Das Endometriumkarzinom tritt damit vornehmlich nach der Menopause (5 % prämenopausal) auf und wird am ehesten durch eine postmenopausale Blutung erkannt. Man wird im Hinblick auf eine demografische Veränderung mit einer steigenden Prävalenz in den kommenden Jahren und Jahrzehnten rechnen müssen, weshalb sich hier ein klares Bedürfnis für weiterführende Grundlagen- und translationale Forschung begründet (2).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Das Endometriumkarzinom als Neoplasie des epithelialen Anteils lässt sich histopathologisch in zwei Typen unterteilen:

- östrogenassoziiertes Typ-I-Karzinom
- nicht östrogenassoziiertes Typ-II-Karzinom
- (3)

Das östrogenassoziierte **Typ-I-Karzinom** macht ca. 80 % aller Endometriumkarzinome aus. Bei dieser Entität handelt es sich histopathologisch um ein endometrioides Adenokarzinom mit gegebenenfalls Anteilen von Drüsenepithel und es kann assoziiert sein mit Endometriumhyperplasie (4).

An der Entstehung dieser Art Endometriumkarzinom kann eine zu hohe Östrogen-Serum-Konzentration exogener Zufuhr oder endogener Produktion, die nicht ausreichend durch Gestagene antagonisiert ist, beteiligt sein. Dies kann wie bereits erwähnt durch anovulatorische Zyklen, zum Beispiel im Rahmen eines Polyzystischen-Ovar(PCO)-Syndrom, Adipositas (BMI > 30 kg/m²), Einnahme von Tamoxifen (als einen selektiven Östrogen-Rezeptormodulator zur Therapie eines vorangegangenen Mammakarzinoms) oder durch Nulliparidität begünstigt sein (5). Die hohe Serumkonzentration von Östrogen führt zunächst zu einer Endometriumhyperplasie (6). Von der Endometriumhyperplasie, die sich typisch darstellt, wird angenommen, dass sie sich zu einer Hyperplasie mit Atypien entwickelt, aus welcher wiederum sequenziell ein gut differenziertes Karzinom entstehen kann. Die WHO unterscheidet die typische Hyperplasie in eine einfache Hyperplasie (Karzinomrisiko < 1 %) und eine komplexe Hyperplasie (Karzinomrisiko circa 2 %) sowie die Hyperplasie mit Atypien ebenfalls in eine einfache (Karzinomrisiko circa 8 %) und eine komplexe (Karzinomrisiko circa 30 %) (6). Die Zellen dieses Tumortyps tragen häufige genetische Varianten, vor allem Mikrosateliteninstabilität und Mutationen in den Genen von PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), PIK3CA (*Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit alpha*), K-Ras (*Kirsten Rat Sarcoma Virus-* Onkogen) und β-Catenin (3). Das **Typ-II-Endometriumkarzinom** ist nicht östrogenassoziiert. Diese sind geringgradig differenziert und werden histologisch als seröse oder klarzellige Karzinome bezeichnet.

Patientinnen dieser Entität von Karzinomen sind eher älter, schlanker und zeigen nicht die typischen Risikofaktoren mit potentieller Östrogendominanz, da das Typ-II-Endometriumkarzinom regelhaft keine Östrogen- oder Progesteron-Rezeptoren exprimiert. Aus atrophischem Endometrium kann sich eine endometriale intraepitheliale Neoplasie (EIN) entwickeln, woraus das geringgradig differenzierte Endometriumkarzinom des Typ II entstehen kann (5). Als Risikofaktoren können lediglich das Alter und eine eventuell vorangegangene Bestrahlung des kleinen Beckens beispielsweise bei Zervixkarzinom, geltend gemacht werden (5). Das Typ-II-Endometriumkarzinom ist histopathologisch dem Ovarial- und Tubenkarzinom ähnlich und weist ähnlich häufig Mutationen in p53, sowie Chromosomeninstabilität auf.

Manche Karzinome lassen sich diesen beiden Typen histopathologisch nicht genau zuordnen, weshalb manche Autorinnen und Autoren eine Einteilung in vier Gruppen statt in die vorher beschriebenen zwei, vornehmen. Dabei werden immunhistochemische und genetische Merkmale berücksichtigt (4,7) . "POLE-ultramutierte" Endometriumkarzinome haben eine hohe Mutationsrate und sind mit einer guten Prognose assoziiert. In dieser Gruppe sind die Gene für PTEN, PIK3R1 (*Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Subunit 1*), PIK3CA und RAS häufig mutiert (7).

Karzinome der Gruppe "MSI (Mikrosatteliten-Instabilität)-hypermutiert" zeigen Defekte im Mismatch-repair-System, auch hier kommen unter anderem gehäuft Mutationen bei PTEN und PIK3CA vor (7). Sogenannte "*copy-number low*" Tumore haben eine geringe Mutationsvielfalt, aber immerhin noch in 77% PTEN- und in 53% PIK3CA-Mutationen mit zudem einer hohen Progesteron-Rezeptor-Expression. Die letzte durch Musacchio et al. 2020 aufgeführte Gruppe wird "*copy-number high*" betitelt und repräsentiert hauptsächlich die serösen Endometriumkarzinome, die sich (siehe oben) sonst in der Gruppe der Typ-II-

Endometriumkarzinome wiederfanden. Diese weisen eine niedrige Mutations-Dichte auf und sind mit einer schlechten Prognose verbunden. Hier sind p35-Mutationen sehr häufig (92 %) und PTEN oder KRAS Mutationen sehr selten vorliegend (7).

1.1.2 Diagnostik des Endometriumkarzinoms

Das Endometriumkarzinom wird am ehesten durch eine postmenopausale Blutung auffällig. Auch bei peri- oder prämenopausalen überregelstarken, verlängerten oder anderweitig suspekten Blutungen sollte der Verdacht einer endometrialen Neoplasie gestellt und diagnostisch abgeklärt werden (5).

Dafür stehen zunächst die gynäkologische Untersuchung zum Aufspüren der Blutung und gegebenenfalls Betrachtung etwaiger Ausdehnung des Befundes sowie der vaginale Ultraschall zur Verfügung (5). Mit Hilfe des vaginalen Ultraschalls kann die Beschaffenheit des Myometriums und des Endometriums betrachtet werden. Ausschlaggebend für die Bedenklichkeit des Befundes ist vor allem die Dicke des Endometriums, die nicht dicker als 3 mm sein sollte. Auf einen suspekten Sonografie- Befund sollte eine Gebärmutterspiegelung (Hysteroskopie) mit einer endometrialen Biopsie mit anschließender histopathologischer Untersuchung erfolgen (3).

Ein Screening wird derzeit nur mit Einschränkungen empfohlen. Es sei lediglich in Hoch-Risiko- Gruppen (Adipositas, Diabetes Mellitus, bekannte endometriale Hyperplasie, HNPCC-Syndrom) angeraten. Frauen mit HNPCC-Syndrom kann eine präventive Hysterektomie und beidseitige Adnexektomie empfohlen werden (5).

TNM-Kategorie FIGO-Stadien		Definition			
тх		Primärtumor kann nicht beurteilt werden			
то		Kein Anhalt für Primärtumor			
ті	I ¹	Tumor begrenzt auf Corpus uteri			
Tla	IA ¹	Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums			
T1b	IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums			
Т2	II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus			
T3 und/oder N1	ш	Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben:			
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)			
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)			
N1	IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten ²			
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten			
	IIIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten			
Т4	IVA	Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut ³			
M1 IVB		Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominalen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten)			
 Die alleinige Beurteilun Eine positive Zytologie Das Vorhandensein Infiltration der Schleim 	 Die alleinige Beurteilung von endozervikalen Drüsen soll als Stadium I klassifiziert werden. Eine positive Zytologie soll gesondert diagnostiziert und ohne Änderung des Stadiums dokumentiert werden. Das Vorhandensein eines bullösen Ödems genügt nicht, um einen Tumor als T4 zu klassifizieren Infiltration der Schleimhaut von Blase oder Rektum bedarf des Nachweises durch Biopsie. 				

Abbildung 1: Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms nach FIGO und TNM (2010) (2)

Aus der Stadieneinteilung (s. Abbildung 1) ergeben sich weitere prätherapeutische Untersuchungen:

- Röntgenaufnahme des Thorax in 2 Ebenen
- Abdominalsonographie zum Ausschluss einer Harnstauung und einer (seltenen)
 Metastasierung in die parenchymatösen Oberbauchorgane
- Der Nutzen einer Computertomographie oder Kernspintomographie des Abdomens sowie einer Positronenemissionstomographie (PET) im Staging ist nicht bewiesen.
- Ist aufgrund von ausgeprägter Komorbidität eine primäre Strahlentherapie geplant, kann eine Kernspintomographie zur Therapieplanung hilfreich sein.
- Zystoskopie und Rektoskopie fakultativ zum Ausschluss eines Stadium IV A (5)

1.1.3 Therapie des Endometriumkarzinoms

Die Therapie des Endometriumkarzinoms verfolgt einen interdisziplinären Gedanken und sollte Aspekte der gynäkologische Onkologie, Strahlentherapie, Anästhesiologie und Pathologie sowie Inhalte der Psychoonkologie umfassen. Dabei ist die Therapie an den Allgemeinzustand der Patientin und das Stadium der Erkrankung (ermittelt aus Wachstumsstadium und histopathologischem *Grading*) anzupassen (5).

Auf die Therapie der Vorstufen werde ich an dieser Stelle nicht näher eingehen, vielmehr lege ich den Schwerpunkt auf die systemische Therapie des fortgeschrittenen Endometriumkarzinoms, da dieses den Angriffspunkt dieser Arbeit darstellt.

Die operative Therapie ist beim Endometriumkarzinom Erstlinien- Therapie und beinhaltet ein systematisches operatives Staging durch Hysterektomie, Adnexextirpation sowie das Entfernen der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Dieses operative Verfahren wird sowohl als kurativer Ansatz, sowie in nicht- kurativen Situationen eingesetzt, da hier die Entfernung möglichst großer Tumormassen mit einem Nutzen für die Patientinnen verbunden ist, bevor man sich adjuvanter Therapie bedient. Bei serösem oder klarzelligem Karzinom können zusätzlich eine Omentektomie und peritoneale Biopsien nötig sein (5).

Bezüglich einer möglichen Strahlentherapie fasst die aktuelle Leitlinie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) den Sachverhalt wie folgt zusammen:

- Eine primäre Strahlentherapie des Endometriumkarzinoms ist indiziert, wenn durch eine Komorbidität keine Operabilität gegeben ist.
- Bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko sollte eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt werden, um das lokoregionäre Rezidivrisiko zu senken.
- Die adjuvante Strahlentherapie hat keinen Effekt im Stadium I und II auf das Gesamtüberleben.
- Für fortgeschrittenere Stadien gibt es diesbezüglich keine ausreichenden Daten (5).

In der palliativen Situation, sowie in Stadium Ic G3, II G3 und III kann eine alleinige beziehungsweise adjuvante, systemische Chemotherapie notwendig sein, bei Progesteron-Rezeptor-positivem Endometriumkarzinom auch eine anti-östrogene Therapie mit Gestagenen oder Tamoxifen. Auch in der Progress-Situation wird chemotherapeutisch behandelt. Die Chemotherapie des Endometriumkarzinoms wird standardmäßig mittels Adriamycin, Doxorubicin, Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel und/oder Docetaxel durchgeführt. Am häufigsten wird weltweit eine Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin verwendet (8). Randall et al. konnten 2006 in einer Studie der Gynäkologischen Onkologie-Gruppe (*Gynecologic Oncology Group*, GOG) zeigen, dass die Kombinationstherapie mit Doxorubicin und Cisplatin einer Strahlentherapie bei endometrialem Karzinom im Stadium III und IV überlegen ist. Die Gruppe postuliert außerdem, dass diese Form der Therapie mit sehr vielen Nebenwirkungen verbunden ist, weswegen weitere Versuche, die Toxizität der systemischen Behandlung zu senken, anzustreben sind (8). Für die Kombination von Paclitaxel und Carboplatin konnten ebenso gute Ergebnisse mit milder Toxizität gezeigt werden (9). Häufigste der schwerwiegenden Nebenwirkungen war die Neutropenie bei 36 % der behandelten Patientinnen. Mehr als 6 Zyklen konnten bei 83 % der Patientinnen durchgeführt werden (9).

Ebenso ist eine Behandlung mit Chemotherapeutika bei Metastasierung angezeigt, wenn Strahlentherapie in Form von Afterload- oder Brachy-Therapie nicht mehr durchgeführt werden kann und eine operative Senkung der Tumorlast ebenso nicht in Frage kommt (2). Des Weiteren ist in allen Fällen an eine eventuell unter Therapie notwendig werdende Supportiv-Therapie mit Antiemetika, G-CSF, zur Stimulation der Granulopoese, und an die Therapie einer Anämie zu denken (2).

1.1.4 Rezidive

Metastasen und Rezidive werden vornehmlich systemisch mit zytotoxischer Chemotherapie oder endokriner Therapie behandelt. Die hormonelle Therapie ist dem Typ-I-Karzinom vorbehalten. Sie beinhaltet vor allem Progesteron-Analoga. Tamoxifen und Aromatasehemmer werden ebenso verwendet. In der metastasierten bzw. Rezidiv-Situation werden als Chemotherapeutika hauptsächlich Paclitaxel mit Carboplatin oder Cisplatin kombiniert, was eine Remissionsrate von > 60 % zeigen konnte und vermutlich eine Lebenszeitverlängerung bewirkt. Studien zeigen, dass eine Kombination aus Platin und Taxol wahrscheinlich genauso wirksam, aber weniger toxisch ist, als eine Tripel-Therapie mit Doxorubicin zusätzlich zu den anderen genannten (4).

Insbesondere in der Rezidiv-Situation entwickeln sich Resistenzen gegenüber den Chemotherapeutika, v.a. gegenüber Taxol. In dieser Situation wurde bereits an zusätzlichen molekular zielgerichteten Substanzen (*molecularly targeted agents*) geforscht und diese eingesetzt. Als eines der ersten ist dabei Temserolimus, ein mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Inhibitor zu nennen. Seine Funktionsweise beruht auf der Erkenntnis, dass der PI3/Akt/mTOR-Signalweg in Endometriumkarzinomzellen als Folge von Mutationen im

Tumorsuppressor-Gen PTEN zumeist hochreguliert ist. Studien haben gezeigt, dass sogar die Monotherapie mit diesen neuen Medikamenten in der palliativen Situation noch erhebliche Überlebensvorteile bei geringer Toxizität geben kann. Neben Temserolimus erzielte Ridaforolimus ein verlängertes Überleben um 16 Wochen bei 29 % der Patientinnen (4,10). Dieser Wirkansatz wird in dieser Arbeit an anderer Stelle im Abschnitt "Der Effekt der PARP-Inhibitoren durch synthetische Letalität" (S. 12) vertieft und eine Verknüpfung mit dem in dieser Arbeit behandelten Forschungsansatz dargestellt.

1.2 Paclitaxel und Carboplatin in der Therapie des Endometriumkarzinoms

1.2.1 Paclitaxel

Paclitaxel ist ein sehr wirksames Chemotherapeutikum, das derzeit Anwendung ebenso in der Therapie des Ovarial-, Mamma-, Prostata-, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, sowie Pankreaskarzinoms findet (11). Da es in vergangenen Studien zum Beispiel bei Akram et al. im Jahr 2005 (12) und Pectasides et al. (9)



Abbildung 2: Chemische Grundstruktur von Paclitaxel. (14)

sowie in der aktuellen Leitlinie der AWMF (2) insbesondere in der palliativen Situation des Endometriumkarzinoms begründete Anwendung findet, wurde es auch für diese Forschungsarbeit verwendet. Paclitaxel wurde zunächst aus der Rinde von Taxus brevifolia, der pazifischen Eibe, gewonnen und inzwischen semi- synthetisch mittels Pflanzenzellkultur aus dem natürlich in der europäischen Eibe (Taxus baccata) vorkommenden Baccatin III gewonnen (13). Paclitaxel wirkt zytostatisch, indem sich das tetrazyklische Diterpen an eine Bindungsstelle anheftet, die unabhängig von der Bindungsstelle, an welche Vinblastin (ein Vinca- Alkaloid) oder Colchicin, als klassische Spindelgifte andocken, ist (Jordan & Wilson, 2004). Dabei heftet sich das Molekül an die innere Seite des Mikrotubulus und verhindert



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 3: Wirkungsweise von Paclitaxel im Vergleich zu Vinblastin und Colchicin. Paclitaxel (c) bindet an die innere Oberfläche des Microtubulus und bewirkt so den Spindelarrest (14).

dadurch den Abbau der Mitosespindel (s. Abbildung 3), wodurch ein Stopp der Zellteilung in der G2/M-Phase bedingt ist (13).

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind vor allem

Knochenmarksdepression,

Überempfindlichkeitsreaktionen sowie periphere Polyneuropathie, die sich unter anderem durch die Kombination mit einem Platin, verstärken kann (12).

1.2.2 Carboplatin

Carboplatin ist ein Derivat des Cisplatins und ein zu den Alkylanzien zählendes Zytostatikum. Carboplatin wird beim fortgeschrittenen Endometriumkarzinom, Ovarialkarzinom, kleinzelligen Bronchialkarzinom, Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, Hodenkarzinom sowie beim Zervixkarzinom eingesetzt. Das ihm verwandte Cisplatin findet auch bei weiteren Entitäten Anwendung (15,16).



Abbildung 4: Chemische Grundstruktur von Carboplatin (14).

Als Alkylanz und Platinderivat ist Carboplatin

zytotoxisch wirksam, in dem es die DNA-Replikation und Transkription durch Quervernetzung von benachbarten Guanin-Abschnitten, sogenannte Cross-Links, der beiden DNA-Stränge unterbindet. Die verlinkte DNA wird erkannt und die Zelle der Apoptose zugeführt. Dieser Prozess ist nicht immer von den Zellteilungsmechanismen abhängig, da auch die Transkription blockiert wird. Da insbesondere Karzinomzellen mittels verschiedener Metalloproteinasen oder Transportproteine für Carboplatin resistent sind (s. Abbildung 5), ist eine Kreuzresistenz mit Cisplatin zu beachten (17). Unter anderem deshalb ist eine Kombination des Platins mit einem Taxol sinnvoll (18). Calvert et.al berichteten 1997 auch, dass sich Carboplatin und Paclitaxel in ihrer Toxizität für den Patienten positiv beeinflussen, diese also geringfügiger ist als in der Einzeldosierung sowie im Vergleich zu Cisplatin. Carboplatin ist dosislimitierend myelotoxisch, aber weniger nephrotoxisch als Cisplatin. Des Weiteren hat es neurotoxische und ototoxische Eigenschaften, wirkt sich negativ auf den Gastrointestinaltrakt aus und erzeugt Hypersensitivitätsreaktionen sowie weitere seltenere Nebenwirkungen (17).





PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inhibitoren werden seit ca. 1980 in der Grundlagenforschung und klinischer Forschung eingesetzt. Grund dafür ist die Funktion von PARP als Enzym, das bei der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) nach Entstehung von Lücken, Einzelstrangbrüchen oder Basenaustausch auf einem einzelnen DNA-Strang, die unter anderem durch die Wirkung eines Chemotherapeutikums entstehen können, eine entscheidende Rolle spielt. Zielstrukturen für die PARP-Hemmung sind die zu einer 17köpfigen Familie gehörigen und am besten untersuchten PARP-Enzyme 1 und 2. PARP-Enzyme katalysieren die Polymerisation im Sinne einer Poly-ADP-Ribosylierung von funktionellen ADP-Ribose-Gruppen an gezielte Proteine. Dabei nutzten sie NAD⁺ und setzen Nicotinamid frei, was man sich auch zur Detektion zu Nutzen machen kann (19). PARP1 erkennt und markiert durch Bindung an den Einzelstrang über ein Zink-Finger-Motiv die Fehlerstelle, führt dabei selbst eine Poly-ADP-Ribosylierung durch und aktiviert weitere Basenexzisions-Reparatur-Proteine auf diese Weise. Außerdem, werden die Histon-Proteine H1 und H2B ribosyliert, was eine hilfreiche Relaxation des entsprechenden DNA-Abschnittes bewirkt (19). Die Bindung an die Histone ist unter anderem für die Aktivitätsmessung von PARP nützlich (s. S. 37 Abschnitt "PARP Universal Colorimetric Assay /PARP Activity Assay").

PARP ist in Tumorzellen zumeist hochreguliert und trägt als wichtiger Bestandteil und Mittelpunkt der Reparatur von Einzelstrangbrüchen im *DNA-Damage-Response* (DDR) wesentlich zur Resistenz gegenüber Chemotherapie vor allem in der Rezidiv-Situation und bei Metastasierung bei (19).

1.4 Der Effekt der PARP-Inhibitoren durch synthetische Letalität

Um die Wirkungsweise von effektiver PARP-Inhibition erklären zu können, muss man auf weitere Gene, die zur Tumorentstehung beitragen und letztlich auch zu neuen Ansätzen der Tumortherapie führen, eingehen – nämlich BRCA 1 und BRCA 2 (Engl.: *breast cancer gene* 1 und 2) sowie PTEN (Engl.: *phosphatase and tensin homolog*). Sowohl BRCA 1 und 2 als auch PTEN fungieren als Tumorsuppressorgene, BRCA 1 und 2 über p53 und PTEN über den PI3K-AKT/PKB-Signalweg (20). Das Zusammenspiel aus Gendefekten und Hemmung von Targets wie PARP und ähnlichen wurde 1940 das erste Mal von Theodosius Dobzhansky als *synthetic lethality* (engl. = künstliche/ synthetische Letalität, ich verwende

im Folgenden den Begriff synthetische Letalität) bezeichnet und ist seither ein vielversprechendes Konzept zur individuellen Krebstherapie (19).

In Anbetracht der Wirkungsweise von PARP liegt die Überlegung nahe, dass man sich dessen Hemmung bei der Chemotherapie zu Nutze machen kann. Man sah schon vor vielen Jahren in vitro eine Verbesserung der Zytotoxizität mit dem methylierenden Agens Dimethylsulfat. Sich später anschließende klinische Studien zur Behandlung des malignen Melanoms zeigten einen positiven Effekt in der Kombination mit Temozolomid. Dies begründet sich vor allem daraus, dass methylierende Agenzien Einzelstrangbrüche verursachen, die mit Hilfe von PARP als BER-Enzym repariert werden können, womit die Zelle einen Resistenzmechanismus besitzt, der Angriffspunkt für spezielle Tumortherapie sein kann. Interessant wird es dann, wenn die Tumorzellen, wie schon erwähnt, eine

Mutation eines Tumorsuppressorgens aufweisen. Bekannt wurden BRCA 1 und 2 durch das Auftreten familiären Brustkrebses. Weiterhin findet man diese Mutation bei Patienten mit Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom (19).

Bei Endometriumkarzinomzellen liegt zu 80 % ein Funktionsverlust von PTEN durch eine Mutation auf dem Chromosom 10q23 mit resultierender Dysfunktion des PI3K-Akt-Signalweges vor. Es ist damit die häufigste Mutation beim Endometriumkarzinom. Die Dysfunktion von PTEN kann durch verschiedene Mechanismen geschehen, hauptsächlich spielt dabei die Mutation eine Rolle, weiterhin aber ebenso Methylierung des PTEN-Promotors oder entsprechender Micro-RNA's



Abbildung 6: Synergismus von PARP-Inhibition und BRCA 1 und 2- Defizienz durch Mutation. (22)

sowie das Vorliegen eines Pseudo-Proteins von PTEN (PTEN P1) (21).

Ein Defekt von BRCA 1 und 2 bewirkt einen Funktionsverlust der homologen Rekombination und damit der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Dies konnte u.a. durch Farmer et al. an embryonalen Stammzellen gezeigt werden (22). Dadurch, dass wiederum ein Einzelstrangbruch bei gehemmtem PARP-Enzym nicht repariert werden kann und eine Ansammlung dieser Lücken möglicherweise auf eine Replikationsgabel trifft, kann dies in einen Doppelstrangbruch münden. Bei BRCA 1- und 2- mutierten Zellen funktioniert die Reparatur des Defekts durch homologen Rekombination nicht, sondern nur eingeschränkt mittels *Non-homologous-end-joining* (NHEJ). Dieser eigentlich onkogene Effekt dient bei der Therapie von BRCA-mutierten Karzinomen als Angriffspunkt (22).

Der Mechanismus des ungehemmten Wachstums beim Funktionsverlust von PTEN erklärt sich so: Die durch Wachstumsfaktoren, oder Hormone aktivierte Rezeptortyrosinkinase (RTK) aktiviert Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Dies führt zu einem gesteigerten Vorkommen von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), welches Substrat von PTEN ist und das als Regulator dieser Signalkaskade das PIP₃-Aufkommen durch Dephosphorylierung zu Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) reduziert. Entfällt diese Regulierung, werden die in der Abbildung 7 blau unterlegten Funktionen verstärkt bzw. vermindert. Auf Apoptose hat der PI3-Kinase-Weg eine hemmende Wirkung (23).



Abbildung 7: PTEN als Teil des PI3-Kinase-Akt-Siglnalwegs. Es wird deutlich, dass PTEN eine Rolle bei der Zuführung einer Zelle zum Teilungsstopp bzw. zur Apoptose spielt (22).

Das resultiert in einem ungehemmten Wachstum der Zelle. Dass ein Funktionsverlust von PTEN und der Einsatz von PARP-Inhibitoren synergistisch wirken, beruht auf dem Verlust der Funktion der homologen Rekombination (HR) bei Doppelstrangbrüchen ähnlich der Wirkung einer Mutation von BRCA. Wie Dedes et.al 2010 an endometrialen Karzinomzellen zeigen konnten, bilden sich durch PTEN-Knockout bzw. in Zellen mit nachgewiesenem PTEN-Verlust im Bestrahlungsexperiment (zur Induktion von DNA-Schäden, respektive Doppelstrangbrüchen) keine *RAD51-Foci* aus. RAD51 ist auf ähnliche Weise wie BRCA 1 und 2 an der homologen Rekombination von Doppelstrangbrüchen beteiligt, in dem es nach homologen Bereichen in der anzuheftenden DNA sucht und bei der DNA-Anlagerung hilft. BRCA 2 hilft unter anderem dabei, RAD51 an seinem Ort zu halten und an die DNA zu binden (21).



Abbildung 8: Funktionsweise von *"synthetischer Letalität*". Funktionieren beide Proteine, ist das Überleben der Zelle gesichert. Funktioniert eins der beiden Targets, sind die DNA-Reparatur-Mechanismen auch gewährleistet und die Zelle überlebt. Ist beispielsweise ein Target aufgrund von Mutation nicht funktionsfähig und eines wird medikamentös gehemmt, überlebt die Zelle nicht, wir sprechen von *"synthetic lethality*". Durch sich sekundär entwickelnde Resistenzmechanismen auf einer der beiden Seiten kann die Zelle wieder überleben. Dann zeigt sich eine PARP-Inhibitor-Resistenz (25).

Der BRCA-Status ist für das Endometriumkarzinom nicht so relevant, wie die Funktionstüchtigkeit von PTEN, doch zeigt sich an beiden Beispielen recht gut, wie das Konzept der synthetischen Letalität funktioniert (24,25).

Zu betonen sei aber dennoch, dass nicht allein durch das Einsetzen eines gezielten Agens bezogen auf einen Gendefekt der Tumorzellen eine Tumortherapie erfolgreich sein kann, sondern dass der Effekt der synthetischen Letalität immer auch auf einem zweiten synergistisch wirkenden Agens beruht, welches zum Beispiel den Zelltod chemotherapeutisch induziert. Es gibt bei diesem Ansatz quasi keine Option für Monotherapie (26).

Im Rahmen dieses Konzeptes, das durch die Erkenntnis anhand von BRCA 1 und 2 in der gynäkologischen Forschung und darüber hinaus Anwendung fand, nennt man nun ähnlich funktionierende Forschungsansätze mit *synthetic lethality*-Partnern wie PTEN und PARP auch "*BRCA-ness*" oder "*BRCA-like*" (BRCA-ähnlich). Ein Karzinom mit einem Merkmal, das einen solchen Therapieansatz ermöglicht, trägt den Charakterzug der "*BRCA-ness*" (27).

1.5 Überblick über Substanzen zur PARP-Hemmung

PARP-Inhibitoren sind nun bereits seit einigen Jahren für diverse Tumorentitäten mit entsprechenden Mutationsmustern zugelassen bzw. befinden sich zum Teil noch in klinischen Studien. Im Dezember 2014 wurde erstmalig Olaparib LynparzaTM) auf europäischer (Handelsname: Ebene durch die European Medicines Agency (EMA - Europäische Arzneimittelagentur) zur Therapie von erwachsenen Patientinnen mit Platinsensitivem Rezidiv eines Ovarial-, Tubenoder Peritonealkarzinoms zugelassen. Es ist in Kapsel-



Abbildung 9: PARP-Inhibitor PJ34. (28)

form anzuwenden; es werden zwei Mal täglich 400 mg des Wirkstoffes eingenommen.

In einer Phase II-Studie an Patientinnen mit Platin-sensitivem, high-grade serösem Ovarialkarzinom war das progressionsfreie Überleben in der Therapie-Gruppe auf 11,2 Monate, im Vergleich zur Placebo-Gruppe (4,3 Monate) signifikant länger. Als häufige Nebenwirkungen wurden Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit und Anämie angegeben (28).

Es folgten vielversprechende Phase III-Studien mit Niraparib als Erhaltungstherapie beim Ovarialkarzinom. Hier zeigten sich sowohl in der Gruppe der Keimbahn-BRCA-mutierten Karzinome als auch in der somatisch BRCA-mutierten Karzinome ein deutlich längeres progressionsfreies Überleben; in zweiteren etwas weniger (27).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den PARP-Inhibitoren bereits sehr gute Effekte in der gynäkologischen Krebstherapie gezeigt wurden, dies vor allem beim Ovarial- und Mammakarzinom. Beim Endometriumkarzinom wurden retrospektiv keine klinischen Erfolge erzielt.

Für die hier vorgelegte Arbeit wurde ein Substrat der Firma Calbiochem: PARP-Inhibitor VIII *PJ34*, verwendet, s. Abbildung 9 (29).

PARP inhibitor	Approving organization	Year of approval	Indication	Mutational requirement	Relevant studies
Olaparib	FDA and EMA	2014	Advanced ovarian carcinoma	Germline BRCA1/2 Mutation	NCT0107662 (Kaufman et al., 2015)
	FDA and EMA	2017	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Independent of BRCA1/2 Mutational Status	SOLO-2 (Pujade-Lauraine et al., 2017) and Study 19 (Friedlander et al., 2018)
	FDA EMA	2018 2019	HER-2 negative breast cancer	BRCA1/2 Mutated	OlympiAD (Robson et al., 2017)
	FDA EMA	2018 2019	First-line treatment of advanced ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Germline BRCA1/2 Mutation Complete or partial chemotherapy response.	SOLO-1 (Moore et al., 2018)
	FDA	2019	Metastatic pancreatic cancer	BRCA1/2 Mutated	POLO (Golan et al., 2019)
	FDA	2020	First-line treatment of advanced ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma in combination with Bevacizumab	HRD-Positive Complete or partial chemotherapy response.	PAOLA-1 (Ray-Coquard et al., 2019)
	FDA	2020	Metastatic castration-resistant prostate cancer	HRD-positive	PROfound (de Bono et al., 2020)
Rucaparib	FDA EMA	2016 2018	Advanced ovarian carcinomas, following multiple chemotherapy treatments	BRCA1/2 Mutated	ARIEL2 and Study 10 (Oza et al., 2017)
	FDA EMA	2018 2019	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Independent of BRCA1/2 Mutational Status	ARIEL3 (Coleman et al., 2017)
	FDA	2020	Metastatic castration-resistant prostate cancer	BRCA1/2 Mutated	TRITON2 (Abida et al., 2019)
Niraparib	FDA and EMA	2017	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	Complete or partial chemotherapy response.	ENGOT-OV16/NOVA Study (Mirza et al., 2016)
	FDA	2019	Reoccurring ovarian, fallopian and primary peritoneal carcinoma	HRD-positive Independent of chemotherapy response	QUADRA Study (Moore et al., 2019)
	FDA and EMA	2020	Advanced ovarian carcinomas and primary peritoneal carcinoma	Independent of biomarker status Complete or partial chemotherapy response.	PRIMA Study (Gonzalez-Martin et al., 2019)
Talazoparib	FDA and EMA	2018	Advanced or metastatic HER2-negative breast cancer	Germline BRCA1/2 Mutated	EMBRACA Study (Ettl et al., 2018)

Abbildung 10: Tabellarische Übersicht verschiedener PARP-Inhibitoren. Es sind die Zulassungsdaten durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration* = amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel) und EMA (*European Society for Medical Oncology* = Europäische Gesellschaft für klinische Onkologie), die entsprechenden Therapie-Indikationen mit Mutationen und die der Zulassung zugrunde liegenden Studien aufgeführt (30).

1.6 Hypoxie im Tumorgewebe

Im physiologischen Gewebe des Menschen herrscht ein Sauerstoffpartialdruck von 2,5 % bis 9 %. Im kranken, entzündeten und infizierten Gewebe sowie bei soliden, malignen Tumoren herrschen sehr viel niedrigere Partialdrücke von teils weniger als 1 %. Die Ursachen können in Verminderung und Stopp der Blutversorgung, vermehrtem Metabolismus durch in das Gewebe eingedrungene Bakterien und eine große Zahl in das Gewebe migrierter Entzündungszellen sein (31).

Bei soliden Tumoren geht man davon aus, dass die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, langsamer ist, als die Größenzunahme des Tumors, sodass einige Teile des Tumors weniger gut oxygeniert sind (32). Außerdem gibt es im Tumor ebenso vielfältige entzündliche Prozesse, nekrotische Bereiche und Anteile mit sehr schnellem Wachstum, sodass eine Hypoxie hier multifaktoriellen Ursprungs sein kann (31).

Unter hypoxischen Bedingungen sezernieren die Zellen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), was die Angiogenese steigert. Hohe Konzentrationen an VEGF verursachen aber auch fehlerhafte Angiogenese mit zum Teil blinden Enden der Gefäße, sodass es weiterhin zu hypoxischen Arealen kommt (32). Es wurde gezeigt, dass mit steigendem Ausmaß hypoxischer Anteile im Tumor die klinische Prognose schlechter ist, Metastasierung ausgeprägter stattfindet, die Invasivität des Tumorwachstums zunimmt, sowie Angiogenese und Immunsuppression begünstigt werden. Außerdem wird ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, der Resistenzen gegenüber Chemotherapien und Bestrahlung fördern kann. Diese umfangreichen Prozesse werden vor allem über Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) und die unter diesen Bedingungen hochregulierten Transkriptionsfaktoren *Hypoxia Inducible Factors* (HIFs) vermittelt (31). Bei erneuter Reoxygenierung sind die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, der u.a. zur Hochregulierung von diesen HIFs und anderen Faktoren führt, die die Resistenz des Tumors gegenüber solchen "feindlichen Bedingungen" wie Chemotherapie stärken (32).

Der Wechsel von Hypoxie und Normoxie im soliden Tumor kann sehr schnell von statten gehen - dann spricht man von akuter Hypoxie - oder lang anhalten - chronische Hypoxie. Akute Hypoxie hält nur wenige Minuten oder Stunden an und wird gefolgt von einer Reoxygenierung. Meist beruhen diese kurzen Zustände auf inadäquater Blutversorgung. Die chronische Hypoxie dagegen ist bedingt durch die durch schnelles Wachstum größer werdende Entfernung des Gewebes zum Blutgefäß und die dadurch längere Diffusionsstrecke. Sie kann mehrere Tage andauern und wird von Reoxygenierung oder Zelltod gefolgt (33). Eine Reoxygenierung geht mit der Freisetzung freier Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species* = ROS) einher, die wiederum zu Schäden an Lipiden, Proteinen, und der DNA beitragen und so Ursache von Mutationen, Apoptose und Nekrose sein können. Bereits p53mutierte Tumorzellen können sich durch die Resistenz gegen Apoptose diesen Mechanismen entziehen und die ROS bewirken dann in der Folge vermehrte genomische Instabilität mit Neumutationen (33).

Diese Prozesse lassen sich in vitro natürlich nur aufwändig nachstellen. Für die vorliegende Abhandlung wurden die Versuche dupliziert und sowohl unter Normoxie- als unter Hypoxie-Bedingungen durchgeführt.

1.7 Zellkulturen und Zelllinien

Das Arbeiten mit Zellkulturen ist eine sehr wichtige Basis der Grundlagenforschung. Es bietet effektiv und zunächst recht simpel eine Grundlage zur Behandlung, Beobachtung und Verarbeitung von Zellen im Rahmen der Grundlagenforschung.

Es wurden für die der Dissertation zugrunde liegenden Forschungsarbeiten 5 verschiedene und unterschiedlich differenzierte Zelllinien des Endometriumkarzinoms verwendet. In Tabelle 2 sind die im Folgenden verwendeten Zelllinien aufgelistet und verschiedene für diese Forschungsarbeit relevante Eigenschaften dargestellt, wie diese durch die Arbeitsgruppe um Stayaswaroop et al. in seiner Abhandlung zu humanen endometrialen Karzinomzelllinien 2002 charakterisiert wurden. Abbildung 11 zeigt zusätzlich den durch die Arbeitsgruppe um Yang et al. 2011 bereits ermittelten PTEN-Status mittels Western Blot (34).

p,_	(czeptor, i i i i i i i i i i i i i i i i i i i						
Zalllinia	Verdopplungs-	Tumor-	Wachstum im	Xenograft-	Rezeptor-		
Zemme	zeit	pathologie	Mausmodell	Pathologie	status		
AN3CA	(nicht genau erfasst)	Primäre endometriale Karzinomzellen	+	Gering differenziert	unbekannt		
ECC-1	75h	G2, Adenokarzinom	+	Gut differenziert	ER-pos. PR-pos.		
HEC-1A	31h	G2, Adenokarzinom	+	Gut differenziert	ER- unfunktional		
KLE	114h	G3, Adenokarzinom	+	Gering differenziert	ER-defekt		
RL95-2	22-34h	G2, adenosquamöses Karzinom	Nicht untersucht		ER-pos.		

Tabelle 1: Eigenschaften der ausgewählten Zelllinien nach Stayaswaroop et al.; ER = Estrogen-Rezeptor, PR = Progesteron- Rezeptor, pos. = positiv (33)



Abbildung 11: PTEN-Status im Western Blot von den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2 u.a. durch Yang et al. (33)

1.8 Fragestellung

Durch die Ausführungen über das Endometriumkarzinom, dessen Therapie mit den geläufigsten Chemotherapeutika sowie über die neuen Ansätze in der Grundlagenforschung und im klinischen Einsatz, wird deutlich, dass das Konzept der gezielten Tumortherapie und das Konzept der synthetischen Letalität für die Therapie des metastasierten, fortgeschrittenen Endometriumkarzinoms, aber auch vieler anderer Karzinome von Bedeutung ist. PARP ist ein vielversprechendes Target, um die Chemotherapie im Sinne der synthetischen Letalität zu optimieren. Mit humanen Endometriumkarzinomzellen gab es zu Weilen noch wenige Daten, sodass im Folgenden dargestellt wird, wie sich dem Thema schrittweise genähert wurde.

Es wurde davon ausgegangen, dass der PARP-Inhibitor durch das Herabsetzen der Funktion von PARP, welches vor allem als Koordinator der Reparatur von Einzelstrangbrüchen der DNA dient, die Wirkungsweise des Chemotherapeutikums unterstützt. Dies geschieht, indem den durch die Chemotherapie entstandenen DNA-Schäden, die zu Apoptose oder Nekrose der Zelle führen, nicht entgegen gewirkt werden kann. Die Zelle soll weniger *resistent* gegenüber der Chemotherapie sein.

Diesen Wirkmechanismus wird vor allem in der palliativen Situation interessant, da ja bereits gezeigt wurde, dass verschiedene Karzinome nach Chemotherapie und Strahlentherapie gewisse Resistenzmechanismen - zum Beispiel durch die Hochregulierung von PARP - entwickeln (27).

Der Hypothese, dass PARP-Inhibitoren humane endometriale Karzinomzellen für Chemotherapie-induzierte Apoptose sensibilisieren, wurde nun mit Zellkulturversuchen und verschiedenen Analyse-Methoden nachgegangen. Alle Versuche wurden ebenso unter hypoxischen Wachstumsbedingungen durchgeführt und dabei folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche nicht oder nur gering toxische Dosis Chemotherapie kann für die Versuche in Kombination mit PARP-Inhibitor verwendet werden?
- Exprimieren die Karzinomzellen PARP? Ist PARP als Enzym in den Zellen aktiv?
- Kann man durch den PARP-Inhibitor einzeln und in Kombination mit verschiedenen Chemotherapie-Dosierungen das Zellwachstum vermindern?
- Ist die Verminderung des Zellwachstums von Apoptose oder Nekrose begleitet?

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analog Vortex Mixer	VWR
Analysewaage MC1 Analytic AC 210P	Sartorius
Autoklav MLS 375V	Sanyo
BD FACSCanto™	BD
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN® 3	Biorad
Fluostar Optima	BMG Labtech
Inkubator CO ₂ MCO-18 AIC	Sanyo
Inkubator O ₂ /CO ₂ MCO-18 M	Sanyo
Invers-Mikroskop Nikon TMS	Nikon Japan
Kühlschrank -80 °C VIP™ Series- 86 °C	Sanyo
Magnetrührer MSH basic	Yello line
Mehrkanalpipetten 100 µl, 300 µl	Eppendorf
Multipipette®plus	Eppendorf
Odyssey Infrared Imager	LI-COR
Pipetten Research 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl,	Eppendorf
5000 μl	
Pinetus $(\mathbb{R}) \Delta$ cou	Hirschmann
Tipetus@Aceu	Laborgeräte
Plattformschüttler, taumelnd, Polymax 1040	Heidolph Instruments
SDS-Page-Aparatur	Biorad
Spannungsgeber Power Pac 3000	Biorad
SRT 6D Roller Mixer	Stuart
Thermomixer 5437	Eppendorf
Vortex Mixer 72020	neoLab
Wasserbad	GFL
Western - Blot - Aparatur	Biorad
Zentrifuge (Tischzentrifuge)	Roth
Zentrifuge (Vakuum) Concentrator plus	Eppendorf
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich Zentrifugen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Hersteller
12 Well Cell Culture Plate sterile, with lid	665180	Greiner bio-one
48 Well Cell Culture Plate sterile, with lid	677980	Greiner bio-one
50 ml Polypropylene Conical Tube	352070	BD
96 Well Suspension Culture Plate sterile, U-	650180	Greiner bio-one
bottom, with lid		
Chromatographiepapier Whatman 3MM	3030-861	Whatman®
CHR 20x20 cm		
CRYO.S [™] ,PP, with screw cap, sterile	121261	Greiner bio-one
Deckgläser Menzel Gläser	631-0900	VWR

Eppendorf Combitips plus 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 ml	0030 069 226	Eppendorf
epT.I.P.S. Standard 50-1000µl	0030 000.919	Eppendorf
Filter Tip PP Natural 100 -1000µl with PE	07-692-7300	Nerbe Plus
Filter		
Flow Cytometry Tubes	551579	Sarstedt
GELoader Tips	0030 001.222	Eppendorf
Mini-PROTEAN TGX Gels, 10 gels/ ox,	456-1044	Biorad
12 %, 10-well, 50 μl, 8.6 x 6.7 x 0.1 cm		
(W x L x Thickness)		
Neubauer Zählkammer improved	640010	Marienfeld
Nunclon TM Delta Surface 6 well	140675	Nunc
Nunclon [™] Delta Surface 96 well	167008	Nunc
Pipettenspitze 200 µl, gelb	70766002	Sarstedt
Protran Nitrocellulose Transfermembran		Whatman®
Reagiergefäß 1,5 ml	72690001	Sarstedt
Röhre 15 ml, PP	62554502	Sarstedt
Safe Seal Reagiergefäß 2 ml, PP	72695500	Sarstedt
Safe Seal Tips Premium 10 µl, steril	780012	Biozym
Safe Seal Tips Premium 100 µl, steril	780102	Biozym
Serologische Pipetten 10 ml	861254001	Sarstedt
Serologische Pipetten 1 ml	861251001	Sarstedt
Serologische Pipetten 25 ml	861685001	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml	861253001	Sarstedt
Spitzen DNAse-, RNAse frei 10 µl, farblos	720011	Biozym
Zellkulturflaschen 75 cm ²	83.1813002	Sarstedt

2.3 Chemikalien

2.3.1 Nährmedien/ Zellkultur

Medium	Bestellnummer	Hersteller
DMEM-F12	11039-054	GIBCO
DMSO	D587.9	Sigma
FBS	A15-043	PAA
Fetal Bovine Serum FCS	S0115	Biochrom AG
Gentamicin 80 mg/2 ml SFá 5 Amp.	100325	Ratiopharm
Halt Protease Inhibitor Cocktail 5 ml	78429	Pierce/ Thermo
Han I fotoase minortor Coektair 9 mi		Scientific
Insulin Actrapid Penfill, 100 I.E./ml, 1 ml		Novo Nordisk
enthält 3,5 mg, 5 x 3 ml		Pharma GmbH
Mc Coy's 5A (10 x 500 ml)	26600-080	Invitrogen/ GIBCO
MEM mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l	FG0325	Biochrom
NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin, 500 ml		
M Dor Descent 250ml	78501	Pierce/ Thermo
M-rei Keagent 250nn		Scientific
PBS-Ca ²⁺ -Mg ²⁺ 500 ml	L1825	Bichrom
RPMI 1640 500 ml	FG1215	Biochrom
Trypsin-EDTA (500ml)	25200-072	Invitrogen/ GIBCO

Trypsin-EDTA 100ml	25200-056	Invitrogen/ GIBCO
Trypanblau 0,4 % 100ml	T8154	Sigma

2.3.2 Chemotherapeutika

Chemotherapeutikum	Hersteller
Carbomedac [®] 10 mg/ml Carboplatin	medac
NeoTaxan 6 mg/ml Paclitaxel	EBEWE Pharma

2.3.3 Antikörper und DNA-Bindestoffe

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAB 100 µl	# 4691	Cell Signaling
goat anti mouse 488	A11001	Invitrogen/ Molecular Probes
goat anti rabbit 488	A11008	Invitrogen / Molecular Probes
IRDye 680 goat anti mouse IgG 0,5 mg	926-32220	LI-COR
IRDye 680 goat anti rabbit IgG 0,5 mg	926-32221	LI-COR
IRDye 800 CW goat anti rabbit IgG 0,5 mg	926-32211	LI-COR
IRDye 800 CW goat anti-mouse IgG 0,5 mg	926-32210	LI-COR
NF - κB p65 (C22B4)	4764	Cell Signaling
PARP-1 (p116/p85) Rabbit Monoclonal Antibody	1078-1	Epitomics
Phospho-Akt (Ser473) 193H12 Rabbit mAB 100µl	4058S	Cell Signaling
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAB 100μl	30338	Cell Signaling/NEB
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP ^{тм} Rabbit mAb	4370S	Cell Signaling
PTEN (D4.3) XP TM Rabbit mAb	9188	Cell Signaling
β-Actin monoclonal Antibody mouse IgG	JM-3598-100	MBL

2.3.4 Molekularbiologische Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer	Hersteller
20X Reducing Agent (2 M DTT)	R1011	Fermentas Life Sciences
4X Dual Color™ Protein Loading Buffer	R1011	Fermentas Life Sciences
BCA ™ Protein Assay Kit	23225	Pierce
Cell Titer Blue (bei -20 °C aliquotiert in 2 ml)	G808B (G8082)	Promega
PARP Inhibitor VIII PJ34	528150	Calbiochem®
PARP Universal Colorimetric Assay Kit	4672-096-K	R&D Systems

928-40000

Protein Molecular Weight Marker

Odyssey Infrared Imaging System LI-COR Biosciences

2.3.5 Sonstige Chemikalien

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
10 % ready Gel Tris HCL (10 well, 50 µl)	161-1155	Bio Rad
5 % TBE Gel	161-1109	Bio Rad
Accutase	L11-007	PAA
Aceton 2,51	CP40.2	Roth
Albumine Bovine Serum	A7030-10G	Sigma
Ammoniumchlorid 500g	K298.1	Roth
Ammoniumperoxodisulfat APS	9592.3	Roth
Blocking Buffer (500 ml)	927-40000	LI-COR
BSA proteasefrei 50 g	T844.2	Roth
EDTA 500 g	8040.3	Roth
Ethanol 96 % p.a.	9065.3	Roth
FACS Flow 201	342003	BD Biosciences
FACS Shutdown 51	334224	BD Biosciences
FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec
Glycin 2,5 l	3908.2	Roth
Kaliumhydrogencarbonat 500 g	P748.1	Roth
Kaliumhydrogencarbonat 500 g	P748.1	Roth
Kollagenase CLS 4 (IV) 1g	C4-22	Biochrom AG
Konservierer für Wasserbäder	9025.1	Roth
Kupfersulfat	61240	Fluka
Methanol, 2,5 l	603245	Merck / Apotheke
Michpulver 500 g	T145.2	Roth
Natriumacid p.a.	K305.1	Roth
PBS Dulbecco Instant 9,55 g/l	L182-50	Biochrom AG
Propidiumiodid	P4170	Sigma
Schwefelsäure H ₂ O ₂ 1 Molar 2 Normal	17025	Fluka
SDS	4360.2	Roth
Tris 1 kg	AE15.2	Roth
Trypanblau 0,4 % 100 ml	T8154	Sigma
Tween 20 (500 ml)	P1379	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 %	8070.2	Roth

2.3.6 Pufferzusammensetzungen

Puffer	Zusammensetzung
10 x Lämmli-Puffer	37,75 g Tris 180 g Glycin
	12,5 g SDS in 1 l ddH ₂ O
10 x Transferpuffer (wet blot buffer)	400 mM Glycin 250 mM Tris Base in 11 ddH ₂ O
1 x Lämmli-Puffer	10 x Lämmli-Puffer mit ddH2O einstellen
1 x Transferpuffer	100 ml 10 x Transferpuffer 700 ml ddH ₂ O 200 ml Methanol
BSA- Puffer	5 % BSA 0,1 % Tween 20 in PBS (5 ml aliquotiert bei -30 °C)
FACS- Puffer	2% FCS in PBS
hypotoner Lysepuffer	0,1% Natriumcitrat 0,1% Trition-X-100 200 ml ddH ₂ O (15 ml aliquotiert bei 4°C)
Lysepuffer für Lysate	M-Per-Reagent 2,5 % EDTA 2,5 % Protease-Inhibitor
Milchpuffer	5 % Milchpulver in PBS (45 ml aliquotiert bei -30 °C)
Milchpuffer (+ Tween 20)	5 % Milchpulver in PBS (+ 0,1 % Tween 20) (10 ml aliquoteirt bei -30 °C)
Propidiumiodid-Stock-Lösung	2 mg/ml in PBS (1,5 ml aliquotiert bei 4 °C)
Waschpuffer	0,1 % Tween 20 in PBS

2.3.7 Zellmaterial

Zelllinie	Histologie/Ursprung	Bestellnummer	Hersteller
	ENDOMETRIUMKARZIN	NOM	
AN3-CA	Endometriumkarzinom	ATCC®-HTB-111	ATCC
ECC-1	Endometriumkarzinom	ATCC®-CRL- 2923	ATCC
HEC-1A	Adenokarzinom des Uterus	ATCC®-HTB-112	ATCC
KLE	Adenokarzinom des Uterus	ATCC®-CRL- 1622	ATCC
RL95-2	Endometriumkarzinom	ATCC®-CRL- 1671	ATCC
HeLa	Epitheliales Adenokarzinom des Zervix (Zellen sind infiziert mit Papovaviren)	ATCC [®] -CCL-2™	ATCC
ZELL-LYSATE	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
Akt Control Cell Extracts	Positivkontrolle Calyculin- behandelte Jurkat-Zellen	9273	Cell Signaling
	Negativkontrolle Ly- behandelte Jurkat-Zellen		
NFκB-Control Cell Extracts	Positivkontrolle TNFa- behandelte HeLa-Zellen	9243	Cell Signaling
	Negativkontrolle unbehandelte HeLa-Zellen		
Caspase-3 Control Cell Extracts	Positivkontrolle Cytochrome-C-behandelte Jurkat-Zellen	9663	
	Negativkontrolle unbehandelte Jurkat-Zellen		Cell Signaling
2.4 Software

Software-Programm	Verwendungszweck	Hersteller	
Odyssey Infrared Imager	Datenerhebung, graphische	LI-COR®, Lincoln,	
Sujssey minuted mager	Darstellung Western Blot	Nebraska/ USA	
BD FACS Diva TM	Datenerhebung	BD Biosciences, Franklin	
Software v6.1.3	Durchflusszytometrie	Lakes, New Jersey/ USA	
GraphPad Prism 5 01	Statistische Auswertung	Graph Pad Software Inc.,	
Oraphi ad Frishi 5.01	und graphische Gestaltung	California/ USA	
Mendeley Reference	Literaturverwaltung und	Mendeley Ltd., Elsevier	
Manager	Literaturzeichnis	Inc., London/UK	
		Microsoft Deutschland	
Microsoft Excel 2013	Datenverarbeitung	GmbH,	
	-	München/Deutschland	
		Microsoft Deutschland	
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung	GmbH,	
	C	München/Deutschland	
	Datenerhebung CTB®,		
	PARP Universal	BMG Labtech GmbH,	
OPTIMA Software v.2.10	Colorimetric Assay, BCA-	Ortenburg, Deutschland	
	Assav	0,	

3 Methoden

3.1 Zellkulturen

Die Experimente dieser Forschungsarbeit wurden mit 5 verschiedenen humanen, endometrialen Karzinomzelllinien durchgeführt: AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE und RL95-2. Diese sind unterschiedlich differenziert (s. Tabelle 2) und unterscheiden sich in ihrem Metastasierungsmuster.

Die Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. HEC-1A und RL95-2 sind moderat differenzierte Adenokarzinomzellen epithelialen Ursprungs und sie entsprechen am ehesten dem Endometriumkarzinom Typ I. HEC-1A ist dabei 1968 von H. Kuramato aus einem Endometriumkarzinom Stadium IA entnommen worden (36). Ebenso ECC-1, aus gut differenziertem Adenokarzinom. Hier ergibt sich jedoch die Besonderheit, dass es im Verlauf der Kultivierung zu Verunreinigungen mit der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 gekommen sein kann und ECC-1 sehr große Ähnlichkeit mit der Zelllinie Ishikawa aufweist. AN3-CA und KLE wurden ursprünglich aus peritonealen und Lymphknoten-Metastasen kultiviert und sind beide schlecht differenziert, entsprechen am ehesten dem Endometriumkarzinom Typ II. Alle fünf sind von Kaukasierinnen zwischen 55 und 71 Jahren entnommen (s. Tabelle 1) (37,38).

3.1.1 Versorgung der Zellkulturen

Auftauen

Es erfolgte zunächst die Entnahme der kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank (-196 °C) mit sofortigem Auftauen des Kryo-Röhrchens durch Schwenken im auf 37 °C temperierten Wasserbad für 2 min. Nach alkoholischer Desinfektion des Röhrchens wurde der Inhalt in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und diese Suspension anschließend für 10 min bei 130 g zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde nach Entfernen des Überstands vorsichtig in frischem Medium re-suspendiert und mit der Pipette in eine Zellkulturflasche ausgesät.

Kultivierung

Die Zellen wurden in 75-cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Die unterschiedlichen Kulturmedien, jeweils 10 ml, wurden mit FCS und Gentamycin versetzt. Der insulinabhängige Zelltyp RL95-2 wurde zusätzlich mit Insulin (Actrapid) versorgt (s. Tabelle 2).

Bei den ECC-1-Zellen wurde im Abstand von 3 Tagen das Kulturmedium gewechselt. Bei allen anderen nach 7 Tagen.

Zelllinie	Medium	Zusatz 1	Zusatz 2	Insulin
AN3-CA	MEM mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin			
ECC-1	RPMI 1640			
HEC-1A	Mc Coy's 5A	10 % FCS	Gentamycin 80 mg / 2 ml	
KLE	DMEMF12			
RL95-2	DMEMF12			Insulin (Actrapid Penfill, 100 I.E./ml) 0,005 mg/ml

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährmedien

Subkultivierung

Alle Zellen wurden nach ca. 6 Tagen, wenn der Flaschenboden konfluent bedeckt war, subkultiviert. Nach Spülung mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe von 2 ml Trypsin-EDTA für 10 min bei 37 °C inkubiert und dadurch abgelöst. Anschließend wurde mittels einer Trypsin-Stopp-Lösung (PBS und 2,5 % FCS) resuspendiert und die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (130 g für 10 min) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml resuspendiert und für die Zählung in der Neubauer-Zählkammer 1:100 verdünnt und anschließend mit Hilfe von Trypanblau gezählt. Danach wurde die gewünschte Menge in frischem Medium (2 Millionen pro Kulturflasche) wieder ausgesät und weiterhin im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 % CO₂ kultiviert.

Einfrieren

Das Einfrieren erfolgte in normalem Zellkulturmedium mit 5 % DMSO, für ECC-1 mit 10 % DMSO in Einfrierröhrchen zu je 1 ml. 2 Mio. Zellen wurden jeweils pro Kryo-Röhrchen und pro Bedarf eingefroren. Bevor die Kryo-Röhrchen in den Stickstofftank (-196 °C) einsortiert wurden, wurden sie 24 h bei -80 °C gelagert.

Zellaussaat

Die ersten Schritte fanden wie bei der Subkultivierung Anwendung. Für alle Experimente wurde anschließend eine bestimmte Menge Zellen, nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bei Färbung mit Trypanblau, in frischem Kulturmedium re-suspendiert. Das Kulturmedium enthielt in diesem Fall 1 % FCS, außer bei den ECC-1-Zellen (10 % FCS) und entsprechend Insulin bei den Zellen vom Typ RL95-2. Anschließend konnten die Suspensionen mit Hilfe einer Multipipette in Zellkulturplatten verschiedener Größen ausgesät werden. Soweit im Folgenden nicht anders aufgeführt, wurden für die Proliferationsversuche und FACS-Protokolle bei AN3-CA und HEC-1A jeweils 40.000 Zellen pro Milliliter ausgesät, bei KLE und ECC-1 jeweils 25.000/ ml und bei RL95-2 50.000/ ml. Für die Herstellung der Lysate zur Verwendung im Western Blot und für den PARP-Aktivitätsassay verwendeten wir bei AN3-CA 0,1 Millionen Zellen pro Milliliter (Mio./ ml), bei ECC-1 0,08 Mio./ ml, bei HEC-1A und KLE 0,15 Mio./ ml und bei RL95-2 0,5 Mio./ ml.

In die unterschiedlichen Zellkulturplatten wurden entsprechend der Größe der Wells (Vertiefungen) jeweils eine bestimmte Menge Zell-Suspension ausgesät. In 6-Well-Platten 2000 μ l, in 12-Well-Platten 1000 μ l, in 24-Well-Platten 500 μ l, in 48-Well-Platten 250 μ l und in 96-Well-Platten 100 μ l pro Well.

Alle Versuche haben wir dabei sowohl unter normoxischen Inkubationsbedingungen (5 % CO_2 , 21 % Raumluft-Sauerstoff und 37 °C) als auch unter hypoxischen Bedingungen (5 % CO_2 , 1 % O_2 und 37 °C) inkubiert. Für den Zeitraum des Versuchs wurden die Zellen parallel in den Inkubatoren belassen.

3.2 Vitalitätsassay Cell Titer Blue®

Für diesen Vitalitätsassay wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und in 96-Well-Zelltkulturplatten ausgesät. Pro Versuchsbedingung wurden 6 Wells behandelt. Für die Zelllinien AN3-CA, HEC-1A und KLE wurden pro Well 4.000 Zellen ausgesät, für ECC-1 2.500 und RL95-2 5.000 Zellen. Nach 24 h Anwachsphase in den normoxischen Bedingungen wurde eine der beiden Versuchsreihen in hypoxische Bedingungen überführt. Der darauf folgende Tag, nach 48 h Anwachsphase, wurde Tag 0 gesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Stimulantien behandelt, zunächst mit Paclitaxel und Carboplatin in titrierter Dosierung und anschließend die Kombinationen bzw. Einzel-Behandlung mit dem PARP-Inhibitor (s. S. 43 ff.). Die Grundkonzentration der Kulturmedien, wie in Tabelle 2 beschrieben, blieb gleich. Sechs Wells mit bloßem Inkubationsmedium ohne Zellen wurden pro Platte als blank-Wert mitgeführt.

An Tag 0 fand jeweils die erste Messung statt. Bis Tag 6 wurde jeden Tag eine Cell Titer Blue-Messung vorgenommen. An Tag 3 wurde noch einmal das Medium inklusive frischer Stimulantien gewechselt.

Durchführung der Messung:

Eine Stunde vor der Messung wurden zu jedem Well 20 µl Cell Titer Blue®- Reagenz (in einem Verhältnis 1:5) hinzugefügt. Dieses Reagenz enthält Resazurin, einen blauen Redoxfarbstoff, der durch lebende, metabolisch aktive Zellen zum pink-farbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird (39). Das Fluoreszenzsignal, dessen Stärke direkt proportional zur Zellviabilität ist, wurde nach einer Stunde Reaktionszeit im Brutschrank bei 37 °C im Fluorometer mit Fluostar OPTIMA (544 nm Emission/590 nm Extinktion) gemessen.

3.3 Western Blot Analyse

3.3.1 Herstellung von Zelllysat

Für die Herstellung von Proteinlysat wurden 0,2 Mio AN3-CA- Zellen, 0,16 Mio ECC-1-Zellen, 0,3 Mio HEC-1A- und KLE-Zellen und 1 Mio RL95-2-Zellen pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Abgewartet wurde jeweils bis der Plattenboden zu ca. 70 % bedeckt war. Wenn dies länger als drei Tage gedauert hat, wurde nach drei Tagen das Medium gewechselt.

Zum Ernten der Lysate wurden zunächst die Überstände in ein 50 ml-Röhrchen überführt, das restliche Medium mit PBS abgewaschen, welches ebenfalls in ein 50 ml-Röhrchen überführt wurde, um anschließend für 15 min bei 37 °C mit 400 µl Accutase pro Well inkubiert zu werden. Anschließend wurden die gelösten Zellen mit PBS abgespült und in ein drittes 50 ml-Röhrchen überführt. Alle Gefäße wurden nun bei 2500 g für 10 min in 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die drei Pellets wurden mittels Lysepuffer zusammengeführt. Nachdem die Proben nochmals gründlich vermischt wurden, verblieben sie weitere 10 min auf Eis, woraufhin sie bei 14.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die nun verbleibenden Überstände wurden abgenommen und in - 80 °C eingefroren und innerhalb der darauf folgenden vier Monate für Analysen verwendet. Das übrige Pellet, der Zelldebris, wurde verworfen.

3.3.2 Proteinbestimmung mittels BCA™

Die Proteinlysate wurden langsam auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurde das gewünschte Verdünnungsverhältnis in zweifach destilliertem Wasser hergestellt, zumeist 1:6. Die Standardreihe dieses Assays wurde vorbereitet, indem in 7 Reagiergefäßen 65 μ l zweifach destilliertes Wasser vorgelegt wurde. 65 μ l des mit dem Assay gelieferten Albumin-Standards wurden zum ersten Reagiergefäß zugegeben (1000 μ g/ml Proteinkonzentration) und eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. 65 μ l wurden der ersten Verdünnung entnommen und weiter im nächsten Gefäß resuspendiert (500 μ g/ml Proteinkonzentration) bis die kleinste Verdünnung von 15,6 μ g/ml erreicht wurde. Auf eine 96-Well-Platte wurden pro Well 25 μ l Probe, Standard oder Blank (ddH₂O) in Doppelbestimmung pipettiert.

Das Bestimmungsreagenz, BCA-Reagenz besteht aus 2 Teilen (A und B) und wird im Verhältnis 1 (Teil B): 51 (Teil A) direkt vor der Bestimmung hergestellt. 200 µl dieser Lösung werden pro Well auf die Platte gegeben und diese nach 1-minütigem Mischen auf dem Schüttler für 30 Minuten lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (ca. 5 min) wurde im Fluorometer die Absorption bei 550 nm im Fluostar OPTIMA gemessen.

3.3.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektophorese wurden die Lysate so hergestellt, wie es oben beschrieben wurde. Die Proben wurden zunächst auf Eis langsam aufgetaut, bevor sie mit einem Ladepuffer-Master-Mix (15 µl) vermischt wurden. Der Ladepuffer-Master-Mix setzt sich aus 2,5 µl 20x-Reducing Agent und 12,5 µl 4x-Dual Color™ Ladepuffer zusammen. Falls die gewünschte Proteinmenge in weniger als 35 µl gelöst war, wurde die Gesamtmenge der Probe mit dem Ladepuffer mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Probe mit dem Ladepuffer wurde anschließend für 5 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gelagert.

Für den Längenstandard wurde 1µl LI-COR® Odyssey®- Standard mit 49 µl des Lämmli-Puffers gemischt.

Für die Gelelektrophorese wurden die Mini- PROTEAN TGX Gele von Biorad, die mit 10 Taschen á 50 µl Volumen ausgestattet sind, verwendet. Am Unterrand des Gels wurde die Folie abgezogen und zusammen mit einem anderen Gel oder einem Platzhalter in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die unterschiedlichen Kompartimente der Kammer wurden nun mit Lämmli-Puffer gefüllt, sodass das Gel sowohl am oberen als auch am unteren Rand ausreichend mit dem Puffer Kontakt hat. Der Kamm als Platzhalter in den Taschen wurde dann vorsichtig herausgezogen, um die Taschen anschließend mit den aufbereiteten 50 µl- Proben oder dem Standard zu füllen. Bei Taschen, die weder mit einer Probe noch mit dem Standard gefüllt worden sind, wurde die sich darin eventuell befindliche Luft mittels 50 µl Lämmli- Puffer verdrängt. Pipettiert wurde mit speziell zur Gelbeladung hergestellten GELoader® Tips der Firma Eppendorf. Im Anschluss an die Beladung wird eine Spannung von 95 Volt angelegt. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis die farbige Front die Unterkante des Gels erreichte.

3.3.4 Western Blot

Der Western Blot schloss sich an die Durchführung der Gelelektrophorese an. Es wurde ein Western Blot nach dem sogenannten Tank Transfer Verfahren, auch "wet blot" genannt, durchgeführt.

Zunächst wurden drei Whatman-Filterpapiere und die Transferschwämme in 1x-Transferpuffer angefeuchtet. Gleichzeitig wurde die PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran aktiviert, in dem sie 15 s in 100 % Methanol getaucht wurde, 2 min in zweifach destilliertem Wasser gelagert und mindestens 5 Minuten in 1x-Transferpuffer inkubiert wurde. Anschließend wurde der Blot wie folgt in einer mit 1x-Transferpuffer gefüllten Wanne zusammengebaut, wobei stets darauf geachtet wurde, dass alle Gegenstände und die Handschuhe stets feucht gehalten wurden:

- Transferkassette öffnen, mit der durchsichtigen Seite nach unten
- einen Transferschwamm und ein Filterpapier (auf die Größe der Transferkassette zugeschnitten) auf die Unterseite legen
- darauf die aktivierte Membran platzieren, zur Markierung wurde zumeist die untere rechte Ecke etwas abgeschnitten

- bevor das Gel auf die Membran gelegt wurde, wurden noch die Geltaschen (Sammelgel) abgetrennt und das Gel vorsichtig aus der Halterung gelöst
- das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt
- darüber wurden 2 Filterpapiere und ein Transferschwamm gelegt



Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Western Blots

Die Transferkassette wurde geschlossen und in den Transfertank gestellt. Dazu wurde ein Kühlelement eingesetzt, der Transfertank mit 1x-Transferpuffer aufgefüllt und ein Magnetrührer hinzugegeben. Die Apparatur wurde auf dem Magnetrührer platziert und an den Spannungsgeber angeschlossen. Bei konstant 100 Volt für 1h wurde der Blot durchgeführt.

3.3.5 Immundetektion

Nach der Durchführung des Blots in der Western Blot-Apparatur wurde die Blot-Kassette auseinandergebaut und die Membran entnommen. Manchmal wurde an dieser Stelle die Membran vorsichtig mit einer Schere durchtrennt um verschiedene Antikörper in der Immundetektion einsetzen zu können. War dies nicht der Fall, wurde die Membran nun vorsichtig in ein 50 ml-Röhrchen überführt, ansonsten die einzelnen Teile in verschiedene 50 ml-Röhrchen. Die Membran wurde nun über eine Stunde mit 10 ml Milchpuffer auf dem Rollenmischer geblockt, um die freien Bindestellen auf der Membran für die folgenden Antikörper zu blockieren. Im Anschluss wurde die Membran gewaschen (gewaschen wurde immer mit 10 ml Waschpuffer vier Mal für je 5 min auf dem Rollenmischer). Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper behandelt. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in 5 ml BSA-Puffer gelöst. Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer statt. Anschließend wurden die Reste des nicht gebundenen Antikörpers wieder heruntergewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (*Goat Anti Rabbit* und *Goat Anti Mouse*) in einem Verhältnis von 1:10.000 in 5 ml Milchpuffer mit 0,1 % Tween 20. Die Inkubation über eine Stunde auf dem Rollenmischer erfolgte lichtgeschützt. Anschließend wurde wieder vier Mal mit Waschpuffer gewaschen, bevor noch einmal mit 10 ml PBS für 10 Minuten inkubiert wurde. Die Membran wurde nun vorsichtig aus dem 50 ml-Röhrchen entnommen und auf Filterpapier getrocknet, bevor sie mit dem LI-COR® Odyssey® System detektiert und ausgewertet wurde. Der Scanner misst die Fluoreszenz-Signale auf der Membran in einer Wellenlänge von 700 nm (rot) und 800 nm (grün).

3.4 PARP Universal Colorimetric Assay / PARP Activity Assay

Für diesen Enzym-Aktivitätsassay wurden ebenso Zell-Lysate verwendet, die der obigen Beschreibung folgend, hergestellt wurden.

Auf eine mit Histonen vorbeschichtete Platte werden pro Well 2,5 µl 1x-PARP Cocktail, welcher biotinyliertes NAD enthielt, 2,5 µl aktivierte DNA und 20 µl 1x-PARP-Buffer gegeben. Dazu wurden 25 µl unserer Probe gegeben, in der die Aktivität der Poly-ADP Ribose-Polymerase (PARP) gemessen werden sollte. Die Proben wurden so aufgetragen, dass die Konzentrationen an Protein (ermittelt mit vorangehendem BCA-Assay) gleich waren, eventuell mussten dafür Proben in PBS leicht verdünnt werden.

Das mit NAD⁺ aktivierte PARP setzte nun ADP an die Histone der DNA, dafür war eine Inkubationszeit von einer Stunde vorgesehen. Anschließend wurde die Probe mit PBS vier Mal heruntergewaschen und die Detektion begann mittels Streptavidin-HRP (*Horseradish peroxidase* = Meerrettich-Peroxidase= SHRP). SHRP bindet an das Biotin am eingebauten NAD, was innerhalb von 20 Minuten stattfand. Danach wurden die Wells wieder mit PBS gewaschen. Auf diesen Schritt folgte die Inkubation mit TACS *Sapphire*, lichtgeschützt für 10 Minuten, das wiederum die SHRP markiert. Es entwickelten sich unterschiedlich intensive Blaufärbungen in den Wells, da TACS-*Sapphire* von SHRP umgesetzt wird. Die Reaktion wurde mit 50 µl 1-molarer Schwefelsäure abgestoppt, woraufhin das Blau des TACS-*Sapphires* Gelb erschien. Direkt danach wurde im Fluostar Optima die Absorption bei 450 nm gemessen.

Mitgeführt wurde eine Standardreihe, deren Positivkontrolle von mit dem Assay geliefertem PARP-HSA (*high specific activity*)-Enzym generiert wird (10 U/µl). Dieses wurde in 1x-

PARP-Puffer verdünnt, zunächst durch eine 1:10 Zwischenverdünnung in 9 μ l des Puffers. Hiervon wurden 0,8 μ l entnommen und in 79,2 μ l resuspendiert, um eine Konzentration von 0,256 Units pro 25 μ l zu erzielen. 20 μ l wurden nun entnommen und in den vier darauf folgenden Reagiergefäßen mit vorgelegten 60 μ l nacheinander resuspendiert, bis zu einer Endkonzentration von nur noch 0,001 Units pro 25 μ l (geometrische Verdünnungsreihe, 25 μ l der Standardlösungen wurden jeweils in die Wells pipettiert).

	1	2	1	4	3	6	7	8	5	10	11	12
A	Blank	Blank	AN3-CA Probe 2 no treatment	AN3-CA Probe 2 no treatment	ECC-1 Probe 2 no treatment	ECC-1 Probe 2 no treatment	HEC-1A Probe 2 no treatment	HEC-1A Probe 2 no treatment	KLE Probe 2 no treatment	KLE Probe 2 no treatment	RL95-2 Probe 2 no treatment	RL95-2 Probe 2 no treatment
	0.001 U	0.001 U	AN3-CA Probe 2 + PJ34	AN3-CA Probe 2 + PJ34	ECC-1 Probe 2 + PJ34	ECC-1 Probe2+ PJ34	HEC-1A Probe 2 + PJ34	HEC-1A Probe 2 + PJ34	KLE Probe 2 + PJ34	KLE Probe 2 + PJ34	RL95-2 Probe 2 + PJ34	RL95-2 Probe 2 + PJ34
c	0.004 U	0.004 U	AN3-CA Probe 3 no treatment	AN3-CA Probe 3 no treatment	ECC-1 Probe 3 no treatment	ECC-1 Probe 3 no treatment	HEC-1A Probe 3 no treatment	HEC-1A Probe 3 no treatment	KLE Probe 3 no treatment	KLE Probe 3 no treatment	RL95-2 Probe 3 no treatment	RL95-2 Probe 3 no treatment
D	0.016 U	0.016 U	AN3-CA Probe 3 + PJ34	AN3-CA Probe 3 + PJ34	ECC-1 Probe 3 + PJ34	ECC-1 Probe 3 + PJ34	HEC-1A Probe 3 + PJ34	HEC-1A Probe 3 + PJ34	KLE Probe 3 + PJ34	KLE Probe 3 + PJ34	RL95-2 Probe 3 + PJ34	RL95-2 Probe 3 + PJ34
¢	0.064 U	0.064 U	AN3-CA Probe 4 no treatment	AN3-CA Probe 4 no treatment	ECC-1 Probe 4 no treatment	ECC-1 Probe 4 no treatment	HEC-1A Probe 4 no treatment	HEC-1A Probe 4 no treatment	KLE Probe 4 no treatment	KLE Probe 4 no treatment	RL95-2 Probe 4 no treatment	
E	0.265 U	0.265 U	AN3-CA Probe 4 + PJ34	AN3-CA Probe 4 + PJ34	ECC-1 Probe 4 + PJ34	ECC-1 Probe 4 + PJ34	HEC-1A Probe 4 + PJ34	HEC-1A Probe 4 + PJ34	KLE Probe 4 + PJ34	KLE Probe 4 + PJ34	RL95-2 Probe 4 no treatment	
a	AN3-CA Probe 1 no treatment	AN3-CA Probe 1 no treatment	ECC-1 Probe 1 no treatment	ECC-1 Probe 1 no treatment	HEC-1A Probe 1 no treatment	HEC-1A Probe 1 no treatment	KLE Probe 1 no treatment	KLE Probe 1 no treatment	RL95-2 Probe 1 no treatment	RL95-2 Probe 1 no treatment	RL95-2 Probe 4 + PJ34	
×	AN3-CA Probe 1 + PJ34	AN3-CA Probe 1 + PJ34	ECC-1 Probe 1 + PJ34	ECC-1 Probe 1 + PJ34	HEC-1A Probe 1 + PJ34	HEC-1A Probe 1 + PJ34	KLE Probe 1 + PJ34	KLE Probe 1 + PJ34	RL95-2 Probe 1 + PJ34	RL95-2 Probe 1 + PJ34	RL95-2 Probe 4 + PJ34	0.34 cm ² . 13-340 u

Abbildung 13: Pipettierschema des PARP *Activity Assays.* Pro Bedingung (no treatment- unbehandelte Probe und die Probe, in die vor der Inkubation des Assays noch 10 µM PJ34 pipettiert wurden), wurden vier unabhängige Proben der Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE und RL95-2 eingesetzt, die jeweils doppelt bestimmt wurden.

3.5 Durchflusszytometrie nach Nicoletti

Für dieses Experiment wurden jeweils 11.500 AN3-CA-Zellen und 7.400 ECC-1-Zellen in 48-Well-Platten und 45.000 HEC-1A-Zellen, 28.000 KLE-Zellen und 60.000 RL95-2-Zellen in 12-Well-Platten zu jeweils 4 Wells pro Zelllinie ausgesät. Diese Methode wurde parallel und in den gleichen Rhythmen wie der Cell Titer Blue (s.o.) durchgeführt. Eine Messung im Durchflusszytometer wurde an Tag 1 (24 h) und 5 (120 h) vorgenommen.

Durchführung der Zählung

Zunächst wurde das überständige Medium abgenommen, dann mit PBS der Zellrasen gewaschen und mit Trypsin- EDTA 10 min im Inkubator, dessen Reaktion mit FACS-Puffer abgestoppt wurde, abgelöst. Alle Überstände, Medium, Spülflüssigkeiten sowie Trypsin wurden in das zum Well zugehörige FACS-Röhrchen überführt. Die gefüllten Röhrchen wurden für 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Die Re-Suspension fand in hypotonem Lysepuffer und Propidiumiodid statt. Propidiumiodid ist ein DNA-Interkalator und färbt damit die Kerne und Kernreste von Zellen. Innerhalb der nächsten 15 min wurde die Messung am Durchflusszytometer vorgenommen. Durch das gestreute Licht des Lasers im FACS wurde die Fluoreszenz, die das Propidiumiodid emittiert, im PE-Kanal bei 488 nm gemessen, woraufhin nach Größe (proportional zur Emission des Propidiumiodids) der Partikel mit dem FACSCanto[™] und der FACSDiva[™]- Software sortiert und gezählt wurde.

Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass DNA im Verlauf des Zellzyklus unterschiedlich groß ist und während der Apoptose von Endonucleasen gespalten wird. Dabei entstehen DNA-Fragmente, die hypoploid, d.h. kleiner als der normale Chromosomensatz (diploid, 2n) sind. Während eine intakte Zelle im Zellzyklus die Phasen G1/G0, S und M durchläuft und dabei einen minimal diploiden Kern hat, ordnet man die hypolploiden Kernbestandteile, die bei der Apoptose entstehen, der sogenannten "sub- G1- Phase" zu. Maligne Zellen können darüber hinaus auch tetraploid sein (40,41). Trotz dessen, dass mit dieser Methode der gesamte Zellzyklus analysiert werden kann, wurde sich bei der Darstellung und Auswertung der Ergebnisse auf die für die Zelltod-Analyse relevante sub-G1-Phase beschränkt.



Abbildung 14: Graphische Darstellung nach Sortierung der Zellen und Zellfragmente. Gezeigt wird beispielhaft die Anzahl der in unterschiedlich starker Intensität fluoreszierenden Zellfragmente. Die Fläche unter der Kurve repräsentiert den prozentualen Anteil an Zellfragmenten, nachdem mittels FACSDiva^{TM-}Software die unterschiedlichen Zell-Zyklus-Phasen definiert wurden (verschiedene Grau-Schattierungen). 2n = Diploid, 4n = tertaploid, rfu = relative fluorescence units, relative Fluoreszenz- Einheiten (40).

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit nachfolgendem *multiple Comparison Test* nach Bonferroni, wofür die Software "Graph Pad Prism Version 5.01" verwendet wurde.

Die Ergebnisse werden, als Mittelwert + Standardfehler (*mean* + SEM) dargestellt und als signifikant gewertet, wenn $p \le 0.05$ (*).

Die Versuche wurden unterschiedlich häufig durchgeführt. Der Vitalitätsassay wurde 3 Mal mit jeweils 6-Replikaten wiederholt (n = 18) und die Apoptose-Detektion (FACS) ebenso drei Mal mit 4-Replikaten (n = 12). Beim PARP-Aktivitätsassay wurden 4 Proben getestet, n = 4. Aufgrund der teils sehr niedrigen Stichprobenanzahl wurde teils auf eine statistische Auswertung verzichtet, in diesen Fällen lässt sich aus den angegebenen Daten lediglich ein Trend ableiten.

4 Ergebnisse

Zunächst wurden die fünf Zelllinien mit den zwei verschiedenen Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel titriert behandelt und inkubiert, um eine Dosis zu finden, die sinnvoll mit dem PARP-Inhibitor PJ34 kombiniert werden konnte. Die Wirkung der Chemotherapeutika wurde mittels des Vitalitätsassays Cell Titer Blue[®] getestet. Parallel dazu wurde das Enzym PARP und dessen Aktivität mittels Western Blot und einem speziellen PARP-Aktivitäts- Assay (PARP Universal Colorimetric Assay) bestimmt. Um herauszufinden, ob es sich bei der verminderten Vitalität der Karzinomzellen, die mittels Vitalitätsassay detektiert wurden, auch um Apoptose handelt, wurde die Apoptose-Rate mittels FACS und der Methode nach Nicoletti untersucht. Wie sich dies in der Zusammenschau darstellt, wird im Folgenden gezeigt.

4.1 Dosisfindung für die Chemotherapeutika

Zunächst wurde zur Wirkungskontrolle sowie zur Ermittlung einer sogenannten "subtoxischen Dosis" eine Dosistitration der Chemotherapeutika durchgeführt. Hierfür bedienten wir uns bereits in anderen Zellkultur-Arbeiten verwendeten Dosierungen. Die Endometriumkarzinom-Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE und RL95-2 wurden nach einer 48-stündigen Anwachsphase über 7 Tage mit Paclitaxel (s. Abbildung 15) oder Carboplatin (s. Abbildung 16) behandelt.

Paclitaxel wurde in den Konzentrationen 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM verwendet. Bei allen Zelllinien außer RL95-2 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen 0,1 nM PTX und no treatment, während es bei 1 nM PTX jeweils zu einem Wachstumsabfall kam. Wir wählten dann die letzthöchste Dosis, die keinen signifikanten Effekt erzielte, als "subtoxische" Dosis aus. Bei der Zelllinie RL95-2 zeigte sich jedoch bereits bei dieser Dosis eine signifikant verminderte Vitalität. Zur Vergleichbarkeit der auf diesen Versuch folgenden Versuche und Ergebnisse wurden die 0,1 nM PTX dennoch ausgewählt. Die Gegenprobe zeigte einen signifikanten Unterschied bei allen Zelllinien zwischen der Behandlung mit 0,1 nM, PTX und 100 nM, welche als toxische Kontroll-Dosis bestimmt wurde.

Für die Titration mit Carboplatin wurden die Konzentrationen 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M ausgewählt (42). Auch hier kristallisierte sich eine Dosis heraus, die in der überwiegenden Anzahl der Zelllinien die letzthöchste Dosis ohne signifikante Wachstumsminderung verglichen mit no treatment war. Diese Dosis entsprach 1 μ M Carboplatin und wurde im Folgenden als "subtoxische Dosis angewendet. Auch hier

gab es eine Zelllinie, bei der diese Dosis bereits einen signifikant wachstumshemmenden Effekt hatte (KLE), dies wurde bei Carboplatin ebenso zwecks Vergleichbarkeit und Vereinheitlichung akzeptiert. Die Gegenprobe mit 1 μ M (subtoxische Dosis) und 100 μ M (toxische Dosis) Carboplatin ergab in allen fünf Zelllinien einen signifikanten Unterschied. Es unterschied sich die Wirksamkeit der Konzentrationen der Chemotherapeutika auf die verschiedenen Zelllinien, zudem unterschieden sich die Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten. Ein Zusammenhang war nicht erkennbar.

Die Experimente wurden jeweils drei Mal (n = 18) mit drei unterschiedlichen Wachstums-Passagen der Zelllinien unter den Normoxie-Bedingungen durchgeführt.



Abbildung 15: Dosistitration mit Paclitaxel. AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2 unter normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt 120 h nach der Stimulation (0h- Zeitpunkt) mit 0,0001 nM, 0,001 nM, 0.01 nM, 0.1 nM, 1nM, 10 nM, 100 nM Paclitaxel. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM). Mit $P \le 0,05$ (One-Way ANOVA mit nachfolgendem multiple Comparison Test nach Bonferroni) zeigt sich ein signifikanter Unterschiede zwischen 0,1 nM und 100 nM PTX. n = 18. 0,1 nM wurde als subtoxische Dosis ausgewählt. Die Zelllinie RL95-2 war mit 0,1 nM PTX bereits signifikant im Wachstum vermindert.



Abbildung 16: Dosistitration mit Carboplatin. AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2 unter normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt 120h nach der Stimulation (0h- Zeitpunkt) mit 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M Carboplatin. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM). Mit p \leq 0,05 (One-Way ANOVA mit nachfolgendem multiple Comparison Test nach Bonferroni) zeigen sich für alle Zelllinien signifikante Unterschiede zwischen 1 μ M und 100 μ M Carboplatin. n = 18. 1 μ M wurde als subtoxische Dosis ausgewählt. Die Zelllinien HEC-1A und KLE waren mit 1 μ M Carboplatin bereits signifikant im Wachstum vermindert.

4.2 Western Blot Analysen

Um zu zeigen, dass die Polymerase PARP und das Enzym PTEN in den zur Untersuchung verwendeten Zelllinien vorhanden ist beziehungsweise nicht, wurden Western-Blot-Analysen vorgenommen (s. Abbildung 17). Hierfür wurden die unbehandelten Zellen, welche für 96 Stunden (4 Tage) unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingungen inkubiert waren, verwendet.

Abbildung 17 zeigt, dass in allen 5 Zelllinien PARP mittels Gel-Elektrophorese und Western Blot nachgewiesen werden konnte. Es zeigten sich dabei unterschiedliche Ausprägungen. Das Enzym PTEN konnte nur in HEC-1A und KLE gezeigt werden. In allen 5 Zelllinien konnte Akt nachgewiesen werden; p-Akt dagegen nur in den Zelllinien vom Typ AN3-CA, ECC-1 und RL95-2, also in jenen Zelllinien, in denen keine Bande im Bereich von PTEN erschien.

Die Versuche in Hypoxie und Normoxie zeigten sehr ähnliche Ergebnisse. Allein bei der Detektion von PTEN zeigten sich Unterschiede. In Normoxie kultivierte Zellen exprimieren das Enzym, man sieht eine schmale Bande bei AN3-CA, ECC-1 und RL95-2 und eine deutliche Bande bei HEC-1A und KLE, während in Hypoxie nur HEC-1A und KLE kräftige Banden zeigten, die anderen Zelllinien gar nichts.

Aktin zeigte hier als Kontroll- und Vergleichsprotein die Beladungen des Gels mit Lysaten, die in diesem Fall gleichmäßig waren.

Eine Übersicht über die untersuchten Proteine im Western Blot zeigt Tabelle 3.



Normoxie

Hypoxie

Abbildung 17: Western Blot Analyse zur Darstellung von PARP, PTEN, Akt und p-Akt.

A) AN3-CA; E) ECC-1; H) HEC-1A; K) KLE; R) RL95-2; Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot und Scan mit Odyssey Licor©, dargestellt in schwarz-weiß. PARP zeigt sich in allen Zelllinien bei 116 kDa, am deutlichsten bei AN3-CA und RL95-2. PTEN wird in Hypoxie von HEC-1A und KLE exprimiert, in Normoxie auch schwächer bei den anderen Zelllinien. Akt zeigt sich in allen Gruppen, p-Akt bei AN3-CA, ECC-1 und RL95-2. Die Kontrolle mittels β-Aktin zeigt eine gleichmäßige Beladung.

	AN3-CA	ECC-1	HEC-1A	KLE	RL95-2
PARP	+	+	+	+	+
PTEN			+	+	
Akt	+	+	+	+	+
p-Akt	+	+			+

Tabelle 3: Übersicht über nachgewiesene Proteine im Western Blot.

4.3 PARP-Aktivitätsassay

Mit Hilfe des PARP *Universal Colorimetric Assays* wurde die Aktivität des Enzyms Poly-ADP- Ribose-Polymerase analysiert, um zu zeigen, dass das Enzym auch in der Zelle aktiv und nicht nur vorhanden ist. Der Assay wurde mit lysiertem Zellmaterial der Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE und RL95-2 durchgeführt, diese waren 96 h unter Normoxie-Bedingungen, ohne weitere Behandlung (no treatment) inkubiert.

Man kann bei begrenzter Methodensicherheit erkennen, dass sich die Aktivität in den fünf Zelllinien unterschied, die Aktivität in den Zellreihen KLE und RL95-2 konnte sicher dargestellt werden und anhand dessen die Wirksamkeit des durch mich verwendeten PARP-Inhibitors PJ34 gezeigt werden. Bei AN3-CA, ECC-1 und HEC-1A konnte eine PARP-Aktivität mit dem Assay nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind nicht kongruent zu den Beobachtungen im Western Blot, während dort auch "inaktives" PARP detektiert wurde, s. Abbildung 18.





Abbildung 18: PARP-Aktivität im PARP Universal Colorimetric Assay gegenübergestellt zur Ausprägung der Banden in der Western Blot-Analyse. Die Proben sind für die 96 h Anwachsphase unbehandelt geblieben (Normoxie: 5 % CO₂, 37 °C). Im oberen Teil Darstellung eines Western Blots aller 5 Zelllinien mit den Banden bei 116 kDa (PARP) und 44 kDa (β -Aktin) als Kontrolle. Im unteren Teil Messung der Enzymaktivität derselben Proben mittels PARP-Aktivitätsassay. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), n = 4. Lysate von AN3-CA, ECC-1 und HEC-1A mit nicht detektierbarer PARP-Aktivität, KLE und RL95-2 mit PARP-Aktivität und gehemmter Aktivität durch PJ34.

4.4 Paclitaxel und PJ34 im Vitalitätsassay Cell Titer Blue®

Durch die Versuche in diesem Experimentaufbau ließ sich das Wachstum der Zellen beobachten. Um zunächst darzustellen, dass PJ34 keine abschwächende Wirkung auf Paclitaxel hat, wird dies beispielhaft an den Ergebnissen von AN3-CA in Abbildung 19 dargestellt.

In Abbildung 20 sind neben der Kombinationsbehandlungen mit der subtoxischen Dosis des Chemotherapeutikums Paclitaxel (0,1 nM) auch die Wachstumsraten der unbehandelten Zellen, sowie mit den Wirkstoffkonzentrationen Paclitaxel und PARP-Inhibitor PJ34 einzeln dargestellt. Im puren Medium ist ein stetiges Wachstum der Zellen zu verzeichnen, bei den beiden Zelllinien AN3-CA und ECC-1 ist zum Ende des Experiments (120 h) ein Populationsabfall zu erkennen. Bei den kombinierten Behandlungen mit Paclitaxel und PJ34 konnten unterschiedliche Auswirkungen gezeigt werden. Die Wachstumskurve unter der subtoxischen Dosis Paclitaxel (0,1 nM) hat einen stetigen Anstieg, vergleichbar mit der unbehandelten Situation, während PJ34 in einer Dosis von 10 µM das Wachstum der Zellpopulation bereits bremst. Es ist ein deutlich geringerer Anstieg der Wachstumskurven bei AN3-CA und ECC-1 zu sehen. Die Kombination der subtoxischen Dosis Paclitaxel und des PARP-Inhibitors bewirkt vor allem in den Zellen AN3-CA und HEC-1A eine deutlich stärkere Wachstumshemmung sowohl im Vergleich zu PJ34 allein als auch im Vergleich zur subtoxischen Paclitaxel-Dosis.

Zu sehen sind in Abbildung 20 die Wachstumskurven unter normalen Luftsauerstoff-Bedingungen. In Hypoxie wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, nicht dargestellt.



Abbildung 19: Zellviabilität bei AN3-CA mittels Cell Titer Blue® unter PJ34 in Kombination mit 100 nM PTX. Kombinations- und Einzelbehandlung von 100 nM Paclitaxel und 10 μ M PJ34 am Beispiel der Zelllinie AN3-CA unter normoxischen Bedingungen im Zeitverlauf 144 h, Stimulationszeitpunkt 0 h (Tag 0), Wechsel der Medien incl. der Stimulantien nach 72 h (Tag 3). Relative Zellzahl normiert auf 1 (Zeitpunkt "0 h" nach 24 h Anwachsphase). Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), n = 18. Unter der Behandlung mit 100 nM PTX und 100 nM PTX + PJ34 zeigt sich kein Unterschied im Verhalten der Wachstumskurven.



Abbildung 20: Zellviabilität mittels Cell Titer Blue® unter Kombination von Paclitaxel und PJ34. Kombinations- und Einzelbehandlung mit 0,1 nM Paclitaxel und 10 μ M PJ34 in den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2 unter normoxischen Bedingungen im Zeitverlauf 144 h, Stimulationszeitpunkt 0h (Tag 0), Wechsel der Medien incl. der Stimulantien nach 72 h (Tag 3). Relative Zellzahl normiert auf 1 (Zeitpunkt "0 h" nach 24 h Anwachsphase). Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), n = 18. HEC-1A und AN3-CA mit sichtbar flacherem Anstieg der Wachstumskurven unter 0,1 nM PTX + PJ34.

4.5 Paclitaxel und PJ34 in der Durchflusszytometrie nach Nicoletti

Da der Vitalitätsassay nichts über den Zustand der Zellen im Well aussagt, sondern nur die Menge noch lebender Zellen zum Endpunkt ermittelt, wurde die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie und der oben beschriebenen Methode nach Nicoletti gemessen. Letztlich sollte untersucht werden, ob es sich beim Zugrunde gehen der Zellen um Apoptose handelt.

Man kann unter Normoxie-Bedingungen erkennen, dass es einen unterschiedlich großen Anstieg an der Zahl apoptotischer Kerne durch die kombinierte Behandlung mit den beiden Substanzen (Paclitaxel und PJ34) bei den fünf Zelllinien gibt (s. Abbildung 21). Bei den Zellen vom Typ AN3-CA kann man bereits bei der Monotherapie mit PJ34 oder 0,1 nM PTX einen Anstieg der Apoptoserate beobachten. Der Effekt beider Substanzen in der Kombination ist noch einmal deutlich größer als die jeweilige Wirkung der Monotherapie. Ähnlich verhält es sich bei den ECC-1-Zellen. Hier zeichnet sich der Effekt der Kombinationstherapie noch einmal deutlicher ab, weil PJ34 in der Monotherapie keinen signifikanten Unterschied zur Nicht-Behandlung bewirkt.

Eine ähnliche Situation wie bei AN3-CA sehen wir bei HEC-1A, die Monotherapie hat eine signifikante Wirkung, die Kombinations-Behandlung noch einmal stärker. Bei KLE und RL95-2 sahen wir unter der Kombinationstherapie keine eindeutigen Veränderungen verglichen mit Nicht-Behandlung, subtoxischer Monotherapie mit Paclitaxel oder PJ34-Behandlung. Zur Einordnung der Größe der Apoptose-Rate wird rechts die toxische Paclitaxel-Dosis dargestellt. Dieser Effekt ist gegenüber den anderen Effekten zumeist signifikant, was der Übersichtlichkeit halber in den Abbildungen nicht extra hervorgehoben wird.

Die Hypoxie-Experimente zeigten sehr ähnliche Ergebnisse, weswegen sie hier nicht gesondert dargestellt werden. Die Versuche wurden immer parallel zu den jeweiligen Vitalitätsassays mit denselben Wachstumspassagen durchgeführt und zum Zeitpunkt 24 h (nicht gezeigt) und 120 h (s. Abbildung 21) wurde die Apoptoserate gemessen, n = 12.



Abbildung 21: FACS-Detektion bei Kombination von Paclitaxel und PJ34. Kombinations- und Einzelbehandlung mit 0,1 nM Paclitaxel und 10 μ M PJ34, sowie ohne Behandlung (no treatment) in den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2, in normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt 120 h. Die Rate apoptotischer Kerne, zugehörig der sub-G1-Phase, ist prozentual dargestellt. Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), * = signifikant mit P \leq 0,05 (One-Way ANOVA mit nachfolgendem multiple Comparison Test nach Bonferroni), n.s. = nicht signifikant, n = 12. Bei AN3-CA und HEC-1A signifikanter Anstieg der apoptotischen Kerne durch Kombination von 0,1 nM PTX + PJ34 vs. 0,1 nM PTX und vs. PJ34, außerdem bereits unter PJ34 vs. no treatment. ECC-1 mit ebenso signifikant mehr apoptotischen Kernen bei Kombinations-Behandlung mit 0,1 nM PTX + PJ34 vs. 0,1 nM PTX, nicht signifikanter Unterschied von 0,1 nM PTX + PJ34 vs. PJ34 allein. KLE und RL95-2 ohne signifikante Anstiege der Apoptose-Rate unter der Behandlung mit PJ34 und/oder 0,1 nM PTX.

4.6 Carboplatin und PJ34 im Vitalitätsassay Cell Titer Blue®

Analog zu den Versuchen mit Paclitaxel ließ sich hier das Wachstum der Zellpopulation unter der Kombination des Chemotherapeutikums Carboplatin mit PJ34 beobachten.

Um auch hier zunächst dazustellen, dass die toxische Wirkung des Carboplatins nicht durch die Ko-Behandlung mit PJ34 beeinflusst wird, ist dies in Abbildung 22 anhand der Zelllinie KLE exemplarisch für alle getesteten Zelllinien gegenübergestellt.

Die Population unter subtoxischer Dosis Carboplatin verhielt sich ähnlich der unbehandelten Population in einem stetigen Wachstum der Gesamtpopulation einer Zelllinie in einem Well. Auch hier zeigt sich bei AN3-CA nach 96h eine Verminderung des Wachstums (s. Abbildung 23). Es ist bei den Zellen vom Typ ECC-1 in der Kombination von 1 μ M Carboplatin zusammen mit 10 μ M PJ34 ein deutlich geringerer Anstieg der Wachstumskurve im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung zu sehen. Am Ende des Experiments befinden sich nur halb so viele Zellen im Well, wie in den einzeln mit PJ34 oder Carboplatin behandelten Wells. Die anderen Zelllinien zeigen nur marginale Differenzen bzw. unter den Therapeutika keine Unterschiede zur unbehandelten Situation. Diese Beobachtungen wurden sowohl in Normoxie-Bedingungen (s. Abbildung 23), als auch in Hypoxie-Bedingungen (nicht gezeigt) vorgenommen. Bei ECC-1 und AN3-CA zeigte sich zudem in der Einzelbehandlung mit PJ34 ein bereits deutlich vermindertes Wachstum.



Abbildung 22: Zellviabilität bei KLE mittels Cell Titer Blue® unter PJ34 in Kombination mit 100 μ M Carboplatin. Kombinations- und Einzelbehandlung mit 100 μ M Carboplatin und 10 μ M PJ34 am Beispiel der Zelllinie KLE unter normoxischen Bedingungen im Zeitverlauf 144 h, Stimulationszeitpunkt 0h (Tag 0), Wechsel der Medien incl. der Stimulantien nach 72h (Tag 3). Relative Zellzahl normiert auf 1 (Zeitpunkt "0 h" nach 24 h Anwachsphase). Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), n = 18.



Abbildung 23: Zellviabilität mittels Cell Titer Blue® unter Kombination von PJ34 und Carboplatin. Kombinations- und Einzelbehandlung mit 1 μ M Carboplatin und 10 μ M PJ34 in den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2 unter normoxischen Bedingungen im Zeitverlauf 144 h, Stimulationszeitpunkt 0 h (Tag 0), Wechsel der Medien incl. der Stimulantien nach 72 h (Tag 3). Relative Zellzahl normiert auf 1 (Zeitpunkt "0 h" nach 24 h Anwachsphase). Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM), n = 18. ECC-1 mit sichtbarer Wachstumshemmung unter 1 μ M Carboplatin + PJ34.

4.7 Carboplatin und PJ34 in der Durchflusszytometrie nach Nicoletti

Auch hier schloss sich die Untersuchung auf die Menge apoptotischer Kerne in der Durchflusszytometrie mittels Zell-Zyklus-Analyse an. Bei den Zellen vom Typ AN3-CA zeigte sich bereits in der Monotherapie mit PJ34 ein großer Anstieg der Apoptose-Rate, welcher keinen signifikanten Unterschied zu dem sogar etwas kleineren Anstieg unter der Kombinationsbehandlung ergab. Die Einzelbehandlung mit 1 µM Carboplatin hatte keinen signifikanten Effekt.

Bei ECC-1 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der prozentualen Anzahl der apoptotischen Kerne durch die Kombinationsbehandlung 1 μ M Carboplatin mit 10 μ M PJ34 verglichen mit der Einzelbehandlung 1 μ M Carboplatin. Es ist hier durch PJ34 allein kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen, was den Effekt der Kombinationsbehandlung unterstreicht (s. Abbildung 24).

Bei den HEC-1A-Zellen zeigt sich eine signifikante Steigerung der Anzahl apoptotischer Fragmente unter der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit der subtoxischen Carboplatin-Dosis. Gegenüber der Einzelbehandlung mit PJ34 ergab sich kein eindeutiger Effekt in der statistischen Auswertung. Bei KLE und RL95-2 sahen wir unter der Kombinationstherapie keine eindeutigen Veränderungen verglichen mit Nicht-Behandlung, subtoxischer Monotherapie mit Carboplatin oder PJ34-Behandlung.

Zum Vergleich des Ausmaßes der Apoptose ist jeweils rechts in Abbildung 24 die toxische Carboplatin-Dosis gezeigt. Dieser Effekt ist gegenüber den anderen Effekten zumeist signifikant, was der Übersichtlichkeit halber in den Abbildungen nicht extra hervorgehoben wird. Die Ergebnisse zeigen sich in der Form sowohl in den unter Normoxie durchgeführten Experimenten als auch unter Hypoxie (nicht gezeigt).

Die Versuche wurden, wie bei den Paclitaxel-Versuchen auch, immer parallel zu den jeweiligen Vitalitätsassays mit denselben Wachstumspassagen der fünf Zelllinien durchgeführt. Zum Zeipunkt 24 h (nicht gezeigt) und 120 h (s. Abbildung 24) wurde die Apoptoserate gemessen.



Abbildung 24: FACS-Detektion bei Kombination von Carboplatin und PJ34. Kombinations- und Einzelbehandlung mit 1 μ M Carboplatin und 10 μ M PJ34, sowie ohne Behandlung (no treatment) in den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE, RL95-2, in normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt 120 h. Die Rate apoptotischer Kerne, zugehörig der sub-G1-Phase, ist prozentual dargestellt. Darstellung der Mittelwerte + Standardfehler (mean + SEM). n.s = nicht signifikant, * = signifikant mit P \leq 0,05 (One-Way ANOVA mit nachfolgendem multiple Comparison Test nach Bonferroni), n = 12. Es zeigen sich signifikante Unterschiede bei AN3-CA für no treatment vs. PJ34 und 1 μ M Carboplatin vs. 1 μ M Carboplatin + PJ34. ECC-1 mit signifikant prozentual mehr apoptotischen Kernen unter 1 μ M Carboplatin vs. 1 μ M Carboplatin + PJ34 und PJ34 vs. 1 μ M Carboplatin + PJ34, die Einzelsubstanzen bewirken gegenüber no treatment keinen signifikanten Effekt. HEC-1A mit signifikantem Unterschied bei 1 μ M Carboplatin vs. 1 μ M Carboplatin + PJ34. KLE und RL95-2 ohne signifikante Anstiege der Apoptose-Rate unter der Behandlung mit PJ34 und/oder 1 μ M Carboplatin.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob PARP-Inhibition einen synergistischen Effekt mit der Toxizität der Chemotherapeutika auf Endometriumkarzinomzellen hat. Eine solche Synergie konnte in den durchgeführten Experimenten teilweise nachgewiesen werden. Es zeigt sich in einigen Versuchen ein deutlicher Effekt der Kombinationsbehandlung PARP-Inhibitor und Chemotherapie. Die Kombination zeigt in einigen Zelllinien eine Wachstumshemmung mit ansteigender Apoptoserate gegenüber der alleinigen Therapie mit dem Vergleichs-Chemotherapeutikum. Dies liefert wichtige Erkenntnisse für die Begründung von individueller Tumortherapie basierend auf den individuellen molekularen Überlebensmechanismen von Karzinomen.

5.1 PARP-Inhibitoren in der translationalen Forschung

Seit der Erkenntnis über verschiedene Mutationen, welche Defekte in den Reparaturmechanismen von Karzinomzellen bewirken, hat sich die Tumortherapie stark verändert. Als eines dieser Beispiele ist die Erkenntnis über die BRCA-Mutationen beim Mammakarzinom und anderen gynäkologischen Karzinomen zu nennen (43). Seit ca. 10 Jahren sind die Poly-ADP-Polymerase 1 und deren Abkömmlinge wichtige Ansatzpunkte der Grundlagenforschung und in Folge dessen auch der klinischen Forschung geworden. Bereits 2005 haben Bryant et al. zeigen können, dass BRCA-defekte Zellen für die Therapie mit PARP-Inhibitoren sensibler sind (44).

Bereits 2007 führte die britisch-niederländische Arbeitsgruppe um Yap et al. eine erste erfolgreiche klinische Phase-I-Studie mit dem PARP-Inhibitor KU-0059436 durch. Bei niedriger Toxizität fand sich in den Leukozyten der behandelten Patienten eine sehr potente PARP-Hemmung. Außerdem wurde in Monotherapie bereits eine Anti-Tumor-Aktivität gesehen (45). Im Anschluss daran wurde weiter intensiv mit den PARP-Inhibitoren geforscht und vor allem die Hypothese der synthetischen Letalität ausgebaut. Dabei standen die Mutationen von BRCA 1 und 2, welche vor allem die Entstehung eines Mamma-, Ovarial-, Tuben-, Prostata-, oder Pankreaskarzinoms, aber durchaus auch einer akuten myeloischen Leukämie oder eines soliden Tumors in der Kindheit auf dem Boden einer Fanconi-Anämie (bei Homozygotie) begünstigen kann, im Mittelpunkt (46).

Im Einleitungsteil, zusammengestellt durch O'Connor et al., wurde bereits gezeigt, dass PARP-Inhibitoren seit dem in der klinischen Forschung sehr präsent sind (26).

Für die vorliegende Arbeit wurde der PARP-Inhibitor PJ34 verwendet, welcher bereits einen potenten Inhibitor für in-vitro-Versuche auch bei anderen Forschungsarbeiten darstellte (47,48).

Die Konzentration von 10 μ M zeigte in den Versuchen bei den meisten Zelllinien bereits einen wachstumshemmenden und die Apoptoserate steigernden Effekt. Speziell bei der Zelllinie AN3-CA war die Apoptoserate deutlich erhöht. Dies kann daran liegen, dass die Karzinomzellen in ihrem Mutationsmuster, das häufig Defekte bestimmter Tumorsuppressorgene aufweist und damit eine schnellere Proliferation zulässt, aber auch Defekte von DNA-Reparaturmechanismen mit sich bringt, sensibler auf die Hemmung von PARP, als wichtiges Element der Reparatur von DNA-Defekten, v.a. bei Einzelstrangbrüchen reagieren. Die Arbeitsgruppe um Kishi et al. verwendete in ihrer Arbeit mit myeloischen Stammzellen aufgrund dieses Effekts niedrigere Dosen von 1 - 5 μ M PJ34 (47). Außerdem zeigte diese Gruppe, dass PARP-Inhibition die Osteogenese hemmt und vermuteten, dass die Nebenwirkungen bei dem aktuell sehr breiten Einsatz der Substanzen unter Umständen unterschätzt werden würden (47).

Zum Zeitpunkt unserer Versuche lehnte ich mich an die beispielsweise in der Arbeit um Chevanne et al. (48) verwendeten 10 μ M PJ34 an. Auch diese Autoren wiesen auf den toxischen Effekt von PARP-Inhibitoren hin, deuteten dabei aber auch eine Reversibilität der Schäden, die sie in den Mitose-Abläufen der von ihnen untersuchten Melanomzellen beobachteten, an (48). Diese Reversibilität konnte mittels des hier dargelegten Experiment-aufbaus nicht gezeigt werden.

Die Nebenwirkungen der PARP-Inhibitoren sollten demzufolge nicht außer Acht gelassen werden. Es zeigen sich aber in den ersten klinischen Studien vor allem Übelkeit, Erschöpfung, Erbrechen, Geschmacksbeeinträchtigung und Appetitlosigkeit neben gelegentlicher Knochenmarksdepression mit Anämie und Thrombozytopenie (49–51).

5.2 Die Chemotherapie des Endometriumkarzinoms

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, sind sowohl in der adjuvanten Therapie als auch in der palliativen Chemotherapie Carboplatin in Kombination mit Paclitaxel die Therapie der ersten Wahl, neben Operation und Radiatio (2). Dabei wird Carboplatin gegenüber Cisplatin aufgrund geringerer Nephrotoxizität bevorzugt. Es muss allerdings höher dosiert werden. Trotz dessen, dass die Gruppe um Hyde und Benbrook et al. sowie um Germain et al. (42,52) bereits detailreiche Angaben zu Dosierungen von Carboplatin und Paclitaxel im Zellkulturversuch machten, war es wichtig, eigene Dosisfindungsversuche der Forschungsarbeit voranzustellen.

Auf der Basis dieser Versuche, dargestellt in Abbildung 15 und 16, ergab sich die Grundlage für die darauf folgenden Versuche in der Kombinationstherapie mit dem PARP-Inhibitor. Hierfür wurden schließlich für Carboplatin 1 μ M und 100 μ M als subtoxische und toxische Dosis und für Paclitaxel 0,1 nM und 100 nM festgelegt. Selbstverständlich wirken diese Dosierungen nicht auf alle der verwendeten Zelllinien gleich, stellen aber einen guten Kompromiss dar, da sich nur bei jeweils einer der Zelllinien bereits unter diesen Dosierungen eine signifikant verminderte Vitalität zeigte: RL95-2 wurde durch 0,1 nM PTX im Verlauf von 120 h bereits signifikant im Wachstum gehemmt, KLE beim parallelen Versuch mit Carboplatin ebenso bei der subtoxischen Dosis mit 1 μ M. Als toxische Dosie wurde bei beiden Versuchsprotokollen jeweils eine sehr viel höher konzentrierte Dosierung verwendet als die niedrigste, die bereits einen signifikant toxischen Effekt hatte. Zum einen ist dies in Anlehnung an bereits erprobte Dosierungen erfolgt (42,52,53), zum anderen sollte die Dosierung bei allen fünf Zelllinien sicher toxisch sein. Außerdem konnten auf diese Weise die Auswirkungen der Interventionen in den Zellkulturversuchen besser miteinander verglichen werden.

Synthetische Letalität

In dieser Arbeit kann die Hypothese der synthetischen Letalität durch die hier dargestellten Ergebnisse unterstützt werden. Es konnte zwar nicht an allen Zelllinien ein Effekt der Kombinationstherapie gezeigt werden, jedoch zeigen sich deutliche Hinweise in diese Richtung und es können Rückschlüsse auf die genomischen Voraussetzungen vorgenommen werden bzw. darauf zurückgeführt werden, was in den Vorversuchen detektiert worden ist. Hier wird auf Abbildung 17 und Tabelle 3, in der gezeigt wurde, in welchen der hier verwendeten Zelllinien PARP und PTEN exprimiert wurden, Bezug genommen. Diese werden mit den von der Firma ATCC, deren Zelllinien für diese Arbeit verwendet wurden, gelieferten Informationen über die häufigsten Mutationen der verwendeten Zelllinien KLE, AN3-CA und RL95-2 in einer neuen Übersicht dargestellt (Tabelle 4 - 6). Die Informationen basieren auf dem sogenannten "COSMIC – *Catalogue Of Somatic Mutation in Cancer*", den Angaben des ATCC-Uterine Cancer Cell Panel beziehungsweise auf den Angaben des

Wellcome Trust Sanger Instituts, die sich auf den Katalog somatischer Krebsmutationen berufen (38,54).

In Tabelle 4 sind nun ausgewählte durch das Sanger-Institut veröffentlichte Informationen bezüglich detektierter Mutationen der 5 ausgewählten Zelllinien zu sehen. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase-Catalytic-Subunit-Alpha (PIK3CA) ist eines der Gene, die an der Transkription von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase (PIK3) beteiligt sind und über ihre Signalkaskade mit PTEN, Akt und mTOR agieren (55). KRAS, welches das Protein K-ras kodiert, ist sehr häufig vor allem beim kolorektalen Karzinom mutiert, es beeinflusst dieselbe Signalkaskade ebenso antiapoptotisch und wird deswegen hier mit aufgeführt (56). TP53, kodierend für das Tumorsuppressor-Protein p53 wirkt in vielen Signalstrecken der unkontrollierten Zellteilung entgegen und leitet nötigenfalls Apoptose ein (57).

In Tabelle 5 sind die im Western Blot detektierten Proteine in den fünf verschiedenen Zelllinien in Anlehnung an die aufgezeigten Informationen in Tabelle 4 dargestellt. Man kann sehen, dass die Zelllinien, die eine Mutation im Genom für PTEN und phospho-Akt aufweisen, kein im Western Blot detektierbares Protein exprimieren.

Tabelle 6 zeigt in Anlehnung an Tabelle 4 und 5, dass jene Zellen, die eine Mutation in PTEN aufweisen, auch eine höhere Sensitivität für die Kombinationstherapie einer niedrig dosierten Chemotherapie plus den PARP-Inhibitor aufzeigen. Insbesondere die Zelllinien ECC-1 und AN3-CA sind hier hervorzuheben.

Gen für:	AN3-CA	ECC-1	HEC-1A	KLE	RL95-2
PTEN	m	m	-	-	m
BRCA	-	-	-	-	m (BRCA2)
PIK3CA (PIK3- Signalkaskade)	m (PIK3RI)	-	т	-	-
KRAS (RAS- Signalkaskade)	-	-	т	-	-
TP53 (p53)	т	-	-	т	т

Tabelle 4: Durch das Sanger-Institut katalogisierte Mutationen (nur ausgewählte). (38,54). m = Defekt/Mutation; - = keine Mutation.

Tabelle 5: Im Western Blot detektierte Proteine in den 5 eingesetzten Zelllinien.; -= kein Nachweis; + = positiver Nachweis im Western Blot, Vgl. Abbildung 17.

Protein:	AN3-CA	ECC-1	HEC-1A	KLE	RL95-2
PTEN	-	-	+	+	-
p-Akt	+	+	-	-	+
PARP	+	+	+	+	+

Tabelle 6: Kombinationsversuche mit Chemotherapie + PARP-Inhibitor PJ34. - = kein Effekt, + = positiver Effekt für (...) wird dargestellt, ob in den Zelllinien in den 2 Versuchsaufbauten mittels CTB und FACS-Analyse ein deutlicher Effekt für die subtoxische Dosis Chemotherapeutikum in Kombination mit dem PARP-Inhibitor gezeigt werden konnte.

Versuche:	AN3-CA	ECC-1	HEC-1A	KLE	RL95-2
Paclitaxel + PJ34	+ (CTB u. FACS)	+ (FACS)	+ (CTB u. FACS)	-	-
Carboplatin + PJ34	-	+ (CTB)	-	-	+ (FACS)

Die tabellarische Synopse dieser Ergebnisse und der bestehenden Forschungsergebnisse zeigen, dass die Zelllinien ganz unterschiedliche Defekte zumeist auf Ebene derselben Signalkaskade - der PI3K-Akt-mTOR- Kaskade, die antiapoptotisch wirkt - aufweisen (55). KRAS, ein weiteres bekanntes Tumorsuppressor-Gen greift über Umwege ebenso in diese Signal-Kaskade ein (56). Auch der Tumorsuppressor p53 ist häufig defekt. Dies bedeutet eine Hemmung der Selbstregulation der Zelle bei unter anderem Defekten am Genom und verhindert Apoptose. So kann sich eine geschädigte Zelle ungehindert vermehren bis es zur malignen Entartung kommt (57).

Der BRCA-Status und weitere Charakteristika, die typisch für Karzinomzellen, bzw. Endometriumkarzinomzellen sind, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Es ist im Western Blot (s. Abbildung 17) und in der Tabelle 4 zu erkennen, dass in den Zelllinien, die kein funktionierendes PTEN haben, p-Akt (phosphoryliertes, d.h. aktiviertes Akt-Protein) hoch reguliert ist. Dies ist dem Signalweg entsprechend logisch, da PTEN für die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 verantwortlich ist und damit PIP3 als aktivierendes Agens von Akt herunter reguliert. Es ist außerdem noch an die weitere Funktion von PTEN zu erinnern, die die Ausbildung von RAD51-Foci begünstigt, welche der Reparatur von Doppelstrangbrüchen dienen. Ist diese Funktion nicht gegeben, ist die Zelle sensibler für PARP-Inhibitoren (21).

Dieser Zusammenhang konnte letztlich auch mit der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden. Vor allem bei der Zelllinie AN3-CA zeigten sich diesbezüglich deutliche Effekte. Die Zelllinie zeigte im Western Blot kein PTEN, was den genetischen Defekt bestätigte. Phospho-Akt (p-Akt) ist hochreguliert. Da dies antiapoptotisch wirkt, ist ein schnelles Wachstum für die Zellen möglich. Dafür werden hingegen Verluste in DNA-Reparaturmechanismen "hingenommen", die auf dem Mangel an Reparaturproteinen beruhen.

In der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und PJ34 zeigten sich eine deutliche Verminderung des Zellwachstums im Vitalitätsassay und eine Zunahme apoptotischer Kerne in der Durchflusszytometrie. Paclitaxel verhindert den Abbau der Mitosespindel bei der Zellteilung. Man geht davon aus, dass dies zu entsprechenden DNA-Schäden wie Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen führt. Können diese nun weniger gut repariert werden, weil z.B. PTEN als Moderator zum Aufbau eines RAD51-Fokus (Reparatur von Doppelstrangbrüchen) fehlt und ist noch dazu die Funktion von PARP für die Steuerung der Einzelstrangbruch-Reparatur inhibiert, kann die Zelle der Einleitung der Apoptose nichts entgegen bringen. In Anlehnung an Abbildung 8 (s. Seite 23) wären somit zwei Targets beeinträchtigt: PTEN und PARP. Das Konzept der synthetischen Letalität scheint für dieses Beispiel zutreffend zu sein (21,25). Einschränkend muss gesagt werden, dass die Rate an apoptotischen Kernen, gemessen in der Durchflusszytometrie mit dem Protokoll nach Nicoletti, bereits unter dem PARP-Inhibitor allein stark angestiegen war. Wenn auch in den Wachstumskurven keine signifikante Hemmung durch die subtoxische Dosis bestand, so gab es doch bei den Zelllinien AN3-CA und ECC-1 bereits mit der subtoxischen Paclitaxel-Dosierung einen sichtbaren Anstieg der Apoptoserate.

Für die Zelllinie HEC-1A zeigt sich im Experiment ebenso ein deutlicher Effekt in der Kombinationsbehandlung mit Paclitaxel und PJ34. Die Zelllinie weist aber höchstwahrscheinlich funktionierendes PTEN auf, da dieses mittels Western Blot detektiert werden konnte (s. Abbildung 17). Auch hier muss diskutiert werden, ob die Toxizität von Paclitaxel und PARP-Inhibitor allein bereits ausreichte, um das Wachstum der Zelle effektiv zu beeinflussen und Apoptose zu induzieren. Oder der Effekt ist nicht abhängig von der Dysfunktion oder Abwesenheit von PTEN. Dies würde die Hypothese der synthetischen Lethalität teilweise in Frage stellen, in dem es bestätigt, dass PTEN nicht mutiert sein muss, damit eine Tumorzelle für die Kombinationstherapie eines PARP-Inhibitors mit einer niedrig dosierten Chemotherapie sensitiv ist. Dies kann natürlich daran liegen, dass auch andere Mutationen in den Zellen vorliegen könnten, die die Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren und Chemotherapie im Sinne der synthetischen Letalität steigern.

Im Kombinationsversuch mit PJ34 und Carboplatin zeigen sich nur indifferente Effekte, die nicht eindeutig die aufgestellte Hypothese untermauern. Zu sehen ist einzig bei den ECC-1 Zellen eine Verminderung des Zellwachstums im Vitalitätsassay und bei den Zellen vom Typ RL95-2 ein Anstieg in der Apoptoserate. Es liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der anderen toxischen Eigenschaften von Carboplatin im Vergleich zu Paclitaxel die Zellen in der Ko-Therapie mit dem PARP-Inhibitor nicht sensitiver für Apoptose sind. Es kann aber auch sein, dass es zu unbekannten Wechselwirkungen zwischen dem hier verwendeten PARP-Inhibitor PJ34 und dem Chemotherapeutikum gekommen ist. Auf weitere zu diskutierende Grenzen der hier dokumentierten Versuche werde ich an späterer Stelle im Abschnitt "methodische Einschränkungen" ab S. 67 zu sprechen kommen.

5.3 Einordnung der Ergebnisse in das Forschungsumfeld

Die wohl wichtigsten und bekanntesten Arbeitsgruppen, die sich mit zielgerichteten Targets zur Verbesserung der Therapie gynäkologischer Karzinome beschäftigen, sind die um Dr. Chris Lord und Prof. Alan Ashworth. In ihrem Review von 2015 "Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons learned from the Developement of PARP Inhibitors" bezeichnen sie Defekte von Zelllinien, die zur Dysfunktion der Homologen Rekombination führen, als sogenannte BRCAness (25). Im Kontext der synthetischen Letalität sind Tumore mit diesen Eigenschaften sehr sensibel gegenüber DNA-zerstörenden Chemotherapeutika wie Platinen und Taxol. Der Frage, ob PTEN-Mutation oder anderweitige Dysfunktionen von PTEN, wie sie sehr häufig beim Endometriumkarzinom vorkommen (21), in direktem Zusammenhang mit verstärkter Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren zusammen stehen, sind die Arbeitsgruppen um Dedes et al. sowie Miyasaka et al. nachgegangen. Während Dedes et al. die Hypothese bestätigten, konnte die japanische Arbeitsgruppe Miyasaka et al. an 16
endometrialen Karzinomzelllinien, von denen 12 eine PTEN-Mutation bzw. einen PTEN-Verlust hatten und 4 Wild-Typ-PTEN exprimierten, keinen eindeutigen Zusammenhang darstellen. Sie halten PTEN nicht für einen geeigneten Marker als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit Olaparib, dem in diesen Untersuchungen verwendeten PARP-Inhibitor (58). Die Arbeitsgruppe postuliert auch, dass die Ausbildung von RAD51-Foci, so wie es Dedes et al. beschrieben, nichts mit dem PTEN-Status zu tun habe. Letztlich zeigt sich an den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten fünf Zelllinien auch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem im Western Blot untersuchten PTEN-Status und der Wirksamkeit der Kombinationstherapie von PJ34 und Chemotherapie.

Eine weitere Arbeitsgruppe, nämlich um Bassi et al. stellte fest, dass die Wirksamkeit zytotoxischer Agenzien auf Zellen auch von der Lokalisation von PTEN abhängig ist. Bekannt ist, dass PTEN im Zytosol auf den PI3K-Akt-Signalweg wirkt. Im Zellkern (Nucleus) wird PTEN wahrscheinlich über SUMOylierung (SUMO = small ubiquitinrelated modifier = kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator) (59) reguliert. Die Lokalisierung von RAD51-Foci im Nucleus zur homologen Rekombination ist damit abhängig von der post-translationalen SUMOylierung von PTEN (60). Diese epigenetischen Effekte spielen dann ebenso eine Rolle und müssten weitergehend für all die in Frage kommenden Targets untersucht werden. Dies zeigt unter anderem, wie komplex die Strukturen sind, die der Wirksamkeit oder Resistenz der bisher in der Medizin verwendeten Tumortherapeutika zugrunde liegen und dass es weiterhin vieler grundlegender Forschungsergebnisse im Zellkulturversuch bedarf, um neue klinische Behandlungsmaßnahmen zu entwickeln, denn hinter dem Titel BRCAness verbergen sich noch mehr Targets, auf die an dieser Stelle nicht vollständig eingegangen werden kann. Sie sind jedoch über die gynäkologischen Tumoren und den vielversprechenden Ansatz der PARP-Inhibitoren hinaus wichtige Ansatzpunkte für die Tumortherapie.

So sei zum Beispiel noch einmal KRAS genannt, das in vielen malignen Tumoren mutiert ist, und diese für die Therapie mit Inhibitoren von ribosomaler Protein-S6-Kinase (RPS6KA2) sowie Inhibitoren des Transkriptionsfaktors GATA2 (Gen, das das GATA *binding protein 2* kodiert) oder ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*)-Proteinkinase) "empfänglicher" sind (25,61).

Auch im Verlaufe des Tumorwachstums und der Entwicklung dieses Zellverbandes kommt es sekundär zu somatischen Mutationen oder epigenetischer Aktivierung von Tumorsuppressoren und Protoonkogenen wie zum Beispiel BRCA 1 oder 2. Unter dem selektiven Druck eines PARP-Inhibitors und/oder der Chemotherapie überleben jene Zellen, in denen es per Zufall zu einer Reaktivierung von Proteinen, Enzymen oder Transkriptionsfaktoren kommt, die einen Mechanismus ermöglichen, der der Zelle einen Überlebensvorteil gegenüber der zytotoxischen Therapie gibt (25).

Weiterführende Fragestellungen, wie weitere Genausprägungen oder Mutationen das Verhalten der Zelllinien unter den ausgewählten Substanzen beeinflussen, gilt es, weiter zu untersuchen. Der Umfang der hier vorliegenden Arbeit ist an dieser Stelle begrenzt.

Letztlich kann es sein, dass eine der verwendeten Zellreihen auch eine Reaktivierung von PTEN oder auch einem anderen BRCA-like Target erfahren hat und dadurch nicht auf die Therapie anspricht. Lord, Ashworth und Tutt nennen dies dann *synthetic lethal resistance* = synthetisch letale Resistenz (25).

Auf dieser Grundlage wurden bereits weitere Ansätze zur Maximierung dieser Effekte untersucht. Weil beobachtet wurde, dass DNA-Fragmentierung eine Hochregulierung von programmed cell death protein-1 (PD-1) und programmed death-ligand 1 (PD-L1) bewirkt, erscheint die Kombination von PARP-Inhibitoren mit anti-PD-1/PD-L1-Antikörpern eine vielversprechende Therapieoption darzustellen. Solche Substanzen werden als Immunbezeichnet Checkpoint-Inhibitoren (7,62).Ein weiterer Ansatz solch einer "Dreierkombination" bietet die Therapie mit PARP-Inhibitor und einem PI3K-Inhibitor, auf der Grundlage, dass PTEN-defiziente endometriale Karzinomzellen eine Hochregulierung dieser Signal-Kaskade aufzeigten (wie oben schon erwähnt). Der Einsatz von PI3K-Inhibitoren reduzierte die Ausbildung von RAD51-Foci (63). Bian et al. untersuchten an vier PTEN-defizienten Endometriumkarzinom-Zelllinien die Kombination von Olaparib als PARP-Inhibitor mit Buparlisib, einem PI3K-Inhibitor. Sie konnten zeigen, dass dieser synergistische Effekt das Wachstum der Zellen in vitro signifikant reduzierte (64). Pembrolizumab, ein PD-1 Antikörper und sogenannter Immun-Checkpoint-Inhibitor, ist von der FDA zur Behandlung von Karzinomen mit hoher Mutationslast, unter anderem Karzinome der Gruppe "MSI (Mikrosatteliten-Instabilität)-hypermutiert" zugelassen und erhöhte hier das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben (7).

Parallel dazu wurde überlegt, inwieweit hormonelle Bedingungen die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren beeinflussen. Janzen et al. untersuchte 2013 im Mausexperiment die Effektivität von Olaparib bei niedrigen und hohen Östrogen-Konzentrationen. Zum einen war die Olaparib-Konzentration in Östrogen-behandelten Tieren niedriger, zum anderen war die Ausbildung von RAD51-Foci in den PTEN-defizienten Zelllinien mit höheren Östrogen-Konzentrationen gesteigert (65). Somit könnte auch die Kombination von PARP-Inhibitoren mit Hormontherapie für die Therapie des Endometriumkarzinoms bedeutsam werden (7).

5.4 Nekrose und Apoptose

Es ist bekannt, dass das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod im schnell wachsenden Tumorgewebe gestört ist und dass es aufgrund verschiedener Einflüsse, z.B. unter Hypoxie und oxidativem Stress, Chemotherapie oder Bestrahlung sowie dem weiten Feld der inflammatorischen Prozesse im Tumorgewebe sowohl zu Nekrose auch als zu Apoptose kommen kann. Nekrose ist das ungeordnete und passive Zugrundegehen der Zelle als Antwort auf ein akutes, überraschendes Trauma. Zellorganellen schwellen an, es kommt zur Lyse der Zellmembran, der Zellkern bleibt weitestgehend intakt. Es kommt zu einer Inflammation im Gewebe mit Ausschüttung vieler inflammatorischer Zytokine (66). Apoptose ist der Weg des "programmierten Zelltods". Dieser kann intrinsisch durch die Zelle selbst (mitochondriale Steuerung) ausgelöst werden oder extrinsisch durch Liganden (z.B. Fas-Ligand) an Rezeptoren an der Zellmembran (z.B. Fas-Rezeptor) in Gang gesetzt werden (67).

Durch den programmierten Zelltod wird die Integrität des Gewebes nicht gestört, die Zelle und deren DNA werden in Kernfragmente aufgespalten und verpackt, welche so markiert sind, dass sie im Verlauf von Makrophagen vernichtet werden. Eine wichtige Säule der Karzinogenese und Tumortherapie ist wie im Falle unserer Hypothese die Störung der Zelle in ihrer Regulation zum programmierten Zelltod. So ist p53 als wichtigstes bekanntes Tumorsuppressor-Gen an der Erkennung von Fehlern in der DNA beteiligt und kann die Zellteilung in der G1-Phase der Mitose stoppen. Erfolgt keine hinlängliche Reparatur, wird die Zelle, vermittelt über p53, dem programmierten Zelltod, der Apoptose zugeführt. Ist p53 defekt, so wie in vielen Tumorzellen, kann die defekte Tumorzelle ungehindert wachsen (67). Sehr wichtige Mitspieler auf dem Signalweg hin zur Apoptose sind die Caspasen (Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität) (66). Caspase 3 spaltet PARP-1 und setzt damit eine der Weichenstellungen für den programmierten Zelltod. PARP-1 wird durch DNA-Defekte aktiviert. Je stärker es aktiviert wird, desto mehr Energie in Form von NAD⁺ und ATP wird verbraucht. Da für die Apoptose Energie benötigt wird, kann es sein, dass bei starker Aktivierung von PARP-1 eine Nekrose oder eine sogenannte Nekroptose (s.u.) von Statten geht (66). Wird PARP-1 nun gehemmt, ist es denkbar, dass der Nekrose entgegengewirkt wird und mehr Apoptose stattfindet. Dies würde das Tumormilleu positiv beeinflussen, da durch Nekrose verstärkt Inflammation ausgelöst würde.

Zwischen diesen beiden hinlänglich bekannten Zelltod-Mechanismen gibt es Mischformen (68). Eine davon wird Nekroptose genannt. Sie ist eine Form organisierter Nekrose, benötigt weniger Energie als Apoptose und ist unabhängig von Caspasen. Sie wird zum Teil durch die gleichen Signale an Todes-Rezeptoren ausgelöst wie die Apoptose und unter Umständen durchgeführt, wenn die ATP-Reserven eine Apoptose nicht ermöglichen. In vivo liegt dieser Typ Zelltod z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen vor (66).

5.5 Methodische Einschränkungen

Wie es für in vitro mittels Zellkulturversuchen durchgeführte Experimente zu erwarten ist, müssen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch unter Berücksichtigung methodischer Einschränkungen diskutiert werden.

Mit Zellkulturmodellen können Verhaltensweisen von Tumorzellen methodisch vielfältig und gut zugänglich untersucht werden, das reale Verhalten in einem intakten humanen Gewebe kann allerdings nur gemutmaßt werden. Die Ergebnisse aus solchen Untersuchungen müssen sich in der Folge in Tierexperimenten und klinischen Studien beweisen. Darüber hinaus haben auch die gewählten Methoden Einschränkungen.

So kann im Vitalitätsassay nur auf die verbliebene Menge lebender Zellen im Well geschlossen werden. Was mit den zugrunde gegangenen Zellen passiert ist oder ob nur ein langsames Wachstum und gar kein Zelltod stattgefunden hat, kann nicht geklärt werden (69). Deshalb war es nötig, eine durchflusszytometrische Zählung vorzunehmen, um herauszufinden, ob sich die Apoptoserate in den Zellen, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, verstärkt (70). Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den mit PJ34 allein und Paclitaxel allein behandelten Zellen zeigt sich bei den Zelllinien AN3-CA, ECC-1 und HEC-1A.

In den Versuchen mit Carboplatin zeigt sich ein Anstieg der Apoptoserate auch bei diesen drei Zelllinien, wobei - wie bereits schon erwähnt - ein additiver Effekt der Therapeutika vermutet werden muss.

Zur Verifizierung bzw. zur weiteren Differenzierung und auch um bei den anderen Zelllinien zu erfahren, ob es zu Apoptose kommt, könnte man zum Beispiel versuchen, im Western Blot bei den behandelten Zellen *cleaved* PARP-1 (gespaltenes PARP-1-Enzym), Caspase 3 und Caspase 7 nachzuweisen. Beide Caspasen spalten PARP-1 im Rahmen der Apoptose, sodass 2 Bruchstücke von PARP-1 bei 89 und 24 kDa übrig bleiben. Interessant wären eventuell Ergebnisse eines Caspase-Assays (z.B. der Caspase-Glo® 3/7 Assay der Firma Promega) gewesen, um die beiden sehr spezifischen Marker für Apoptose auch quantitativ

nachweisen zu können (69,71). Die Arbeitsgruppe um Vermes et al. entwickelte des Weiteren den Annexin V-Assay, zu erwerben beispielsweise bei der Firma Essen Bioscience als IncuCyte® Annexin V Reagent, der sich dem Mechanismus der Bindung von Annexin V an intakte Zellmembranen bedient (72).

Diese tiefergehenden, ergänzenden Methoden wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, weil der Nachweis nach Nicoletti als sehr spezifisch und verlässlich gilt und in dem Fall als ausreichend bewertet wurde. Dabei wurden die Zellen für den hier angelegten Versuch im FACS nur zu den Zeitpunkten 24 h und 120 h nach Behandlung mit der Chemotherapie und/oder dem PARP-Inhibitor untersucht. Man kann nicht sagen, was zwischen diesen Messpunkten passiert ist bzw. was im weiteren Verlauf geschehen wäre. Es scheint sinnvoll, in weiteren, zukünftigen Experimenten weitere Messzeitpunkte (z.B. nach 72 h) zu berücksichtigen.

Was schon aus den Ergebnissen beim Vitalitätsassay abzulesen ist, ist zu vermuten, dass die Zellen unter Umständen nach 120 h bzw. 144 h Inkubation mit den Therapie-Medien zusätzlich zur 24-stündigen Anwachsphase, also nach insgesamt 7 Tagen im Well vermutlich keinen Platz mehr hatten oder die Nährstoffe des Mediums aufgebraucht waren. In zukünftigen Versuchen sollten weitere (frühere) Messzeitpunkte beachtet werden.

Die Zell-Zyklus-Analyse nach Nicoletti liefert zudem Informationen über den gesamten Zellzyklus. Die Daten über jene Zell-Zyklus-Stadien, die über die sub-G1-Phase hinausgehen, müssen in weiteren Versuchen näher untersucht werden und mit den Daten aus den Vitalitäts-Versuchen verglichen werden.

Zu hinterfragen sind außerdem die Ergebnisse des PARP-Aktivitätsassays, die mittels des PARP Universal Colorimetric Assay Kits der Firma R&D detektiert wurden. Als Versuch, die PARP-Aktivität in den Zellen zu bestimmen, konnte eine messbare Aktivität von PARP nur in zwei Zelllinien nachgewiesen werden. Dass bei den anderen drei Zelllinien kein PARP in aktiver Form vorliegt, ist kaum vorstellbar. In den weiteren hier dargelegten Versuchen ließ sich PARP nachweisen (im Western Blot). Auch aus den Ergebnissen mit der Kombinationstherapie zum Beispiel mit der Zelllinie AN3-CA lässt sich rückwirkend auf eine wahrscheinlich bestehende, weil hemmbare, PARP-Aktivität schließen. Die fehlende Messung einer PARP-Aktivität in den drei Zelllinien könnte an einer niedrigen Konzentration des Proteins in den eingesetzten Proben liegen. Um eine Konzentration über der Detektionsgrenze hinaus zu erreichen, könnte man die Konzentration des Proteins noch weiter eingedampft werden müssten. Dies wurde in gewissem Maße auch schon durchgeführt und dann die entsprechende Menge aufgetragen.

Da dieses Assay Kit relativ neu ist, wurde es in der Literatur nicht erwähnt, sodass keine Informationen von Anwendern über die Nachweise von PARP bei anderen Zelllinien zu finden waren. Alternativ hätte man zum Beispiel einen In-Cell-ELISA der Firma Thermo Fisher Scientific anwenden können (73).

5.6 Hypoxie

Bei jedem Experiment wurden die Zellen sowohl in Normoxie als auch unter oben genannten hypoxischen Bedingungen inkubiert. Unter der Annahme, dass solide Tumoren hypoxische Areale haben, sollten die Versuche auch in diesem Milieu durchgeführt werden, um zu sehen, ob sich Unterschiede herausbilden, die dann näher hätten untersucht werden können. Dies war bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten nicht der Fall. Die Ergebnisse unter Hypoxie waren fast identisch und sind deshalb in Kapitel 4 auch nicht explizit aufgeführt.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellkulturplatten zum Mediumswechsel und zum Auftragen der therapeutischen Medien unter der Sterilbank aus dem hypoxischen Milieu entfernt wurden und für kurze Zeit den normoxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Ob dieser schnelle Wechsel einen Einfluss auf das Wachstum und Verhalten der Zellen hatte, kann nicht genau gesagt werden. Schnelle Wechsel des Sauerstoffpartialdruckes sind letztlich auch im Tumorgewebe nicht selten, weswegen dieses Geschehen möglicherweise sogar authentischer war, als die dauerhafte Inkubation unter normalem Luftsauerstoffgehalt (ca. 21 %). In gesundem Gewebe sind mit 2,5 - 9 % Sauerstoffgehalt niedrigere Sauerstoff-konzentrationen, weswegen die ca. 21 % Luftsauerstoff im Inkubator auch nicht den in-vivo -Bedingungen entsprechen (31).

Im verwendeten Hypoxie-Modell wurde ein Sauerstoffpartialdruck von 1 % im Inkubator sichergestellt. Dies entspricht angelehnt an die Klassifizierung von Koi et al., die einen Sauerstoffgehalt von <0,01 % als starke, 1 % als mäßige und 3 % als milde Hypoxie bezeichnen, einer sogenannten mäßigen Hypoxie (33).

Der Theorie folgend wurde in den Experimenten das Modell der mäßigen und dabei chronischen Hypoxie nachgestellt, in der es zu langen hypoxischen Phasen über möglicherweise mehrere Tage kommt, woran sich die Re-Oxygenierung anschließt (33). Man hatte erkannt, dass es durch Hypoxie beziehungsweise durch Re-Oxygenierung zu oxidativem Stress kommen kann, der die Resistenzmechanismen des Tumors stärken kann, da es zu Selektionsdruck auf die Zellen kommt (31–33). Dies hätte für das hier gezeigte Modell bedeuten können, dass die Zellen weniger gut auf den hier gewählten Therapieansatz ansprechen. Wie schon erwähnt, gab es in den hier dargestellten Ergebnissen der Gegenüberstellung aus normoxischen und hypoxischen Zellkulturmodellen keine Unterschiede im Verhalten der Zellen bei der Reaktion auf die angewendeten Agenzien. Es können demzufolge keine klaren Rückschlüsse erfolgen, ob die Anwendung von Hypoxie im Zellkulturmodell ein "physiologischeres" Verhalten der Zellen hervorbringt. Man kann in weiteren Experimenten HIF-1 (hypoxia inducable factor-1) parallel per ELISA quantifizieren, um die Wirksamkeit der Hypoxie auf das Zellkulturmodell zu zeigen. Obwohl die hier gewählte Methode gut etabliert und anerkannt ist (33), wäre eine weitere

Methode zur Nachstellung der Hypoxie die Zugabe von Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂), was HIF- α induziert, gewesen (74).

5.7 Ausblick

Mit Blick auf die hier niedergeschriebenen Versuchsergebnisse und Gedanken ist festzuhalten, dass das Konzept der synthetischen Letalität für die Tumortherapie sehr vielfältig ist und dass PARP-Inhibitoren darin eine wesentliche Rolle für die Therapie gynäkologischer Tumore übernehmen.

Die hier gezeigten Ergebnisse geben einen Hinweis dafür, dass endometriale Karzinomzellen durch PARP-Inhibition für Chemotherapeutika zu sensibilisieren sind. Letztlich sind die Ergebnisse aus der in-vitro-Forschung noch im Tiermodell und klinisch zu überprüfen, bevor sie in Therapien und Leitlinien aufgenommen werden.

Des Weiteren herrschen noch Defizite in der Forschung darüber, welche Targets mit den PARP-Inhibitoren ein Zusammenspiel bilden, wenn die bekanntesten wie BRCA und PTEN keine Rolle spielen (58). Es gibt widersprüchliche Aussagen darüber, ob die Funktionseinschränkung von PTEN (durch Mutation oder epigenetisch) in direktem Zusammenhang mit der Sensitivität des malignen Zellverbandes gegenüber Chemotherapie steht (20, 57).

Hierfür haben Turner et al. an Zellen eines metastasierten Mammakarzinoms (CAL 51) getestet, welche Gene sich mittels siRNA (small interfering RNA= eng. für kleine eingreifende RNA) identifizieren lassen und eine Sensibilität für PARP-Inhibitoren nach sich ziehen. Dabei fand sich eine Reihe von möglichen Targets. Die Tests wurden in Anlehnung an die Hypothese auch *synthetic lethal siRNA screens* genannt (75).

Um beim Patienten vor einer etwaigen Tumortherapie herauszufinden, mit welcher Therapie man den Tumor gezielt angreifen kann, müssen solche Tests routinemäßig durchgeführt werden. Das heißt, der Tumor muss genetisch untersucht werden. Da es aber durch Selektionsdruck, Hypoxie und andere Faktoren wiederum zur Veränderung des Tumor-Genoms kommen kann, müsste dies theoretisch zu mehreren Zeitpunkten der Therapie vorgenommen werden - insbesondere beim Auftreten eines Rezidivs müsste dies getan werden, damit gezielter behandelt werden kann. Am Beispiel von Olaparib hat sich dies bereits bei Platin-resistenten Mammakarzinomen gezeigt (49).

Für Temserolimus, einen Inhibitor von mTOR, besteht beim Platin-resistenten Endometriumkarzinom in der Rezidivsituation ebenfalls schon die Möglichkeit zur Monotherapie. Colombo et al. zitierten hierzu in ihrem Review "Current status of moleculartargeted drugs for endometrial cancer" die Autoren um Oza et al., die eine Therapie mit Temserolimus als Monotherapie bei noch nicht mit Chemotherapie behandelten Patientinnen empfehlen, eher noch als bei Patienten, die bereits Chemotherapie bekommen haben. Dies sei aber nicht kohärent mit dem PTEN-Status der Patientinnen (4,10).

Von den PARP-Inhibitoren wurde zunächst Olaparib unter dem Namen Lynparza[™] der Firma AstraZeneca in den USA und der EU seit 2014 zunächst als sogenanntes *"orphan drug"* (Arzneimittel für seltene Erkrankungen) zugelassen. Es ist bei fortgeschrittenem, rezidiviertem Ovarialkarzinom mit einer BRCA-Mutation im Anschluss an eine platinhaltige Chemotherapie, wenn eine komplette oder partielle Remission vorliegt, zugelassen. Danach folgte Niraparib 2017 zur Erhaltungstherapie bei Ovarial- und Tubenkarzinom sowie bei primärer Peritonealkarzinose. Der Wirkstoff Niraparib hatte in der Phase-III-Studie eine beinahe Verdreifachung des progressionsfreien Überlebens beim rezidivierten Ovarialkarzinom gezeigt (76). Rucaparib wurde 2016 zur Therapie des Ovarial- und Tubenkarzinoms sowie der primären Peritonealkarzinose mit BRCA-Mutation erst in den USA und 2018 auch in Europa zugelassen (77,78).

Danach folgten Talazoparib (USA 2018, EU 2019) für Brustkrebs mit BRCA1/2-Mutation. Veliparib und Pamiparib befinden sich in klinischen Studien, auch für Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Gliom sowie Magen- und Cardiakarzinom, und mit Amelparib wird ein weiterer PARP-Inhibitor in der experimentellen Anwendung erprobt (77).

Was bisher fehlt, ist die Ausweitung der Zulassung auf weitere Tumorentitäten, die oben erklärte BRCAness aufweisen und für Platin-haltige Chemotherapie sensibel sind. Um entsprechende Daten generieren zu können, müssen in den kommenden Jahren weitere Phase-II- und III-Studien zum Beispiel beim Endometriumkarzinom folgen. Darüber hinaus existieren Studien, die die Kombination mehrerer Targets in vivo untersuchen. Dazu gehört die Kombination von Checkpoint-Inhibitoren mit PARP-Inhibitoren (7).

Die ersten erfolgreichen Einsätze in der Klinik und zahlreiche erfolgversprechende Ergebnisse in der Forschung an PARP-Inhibitoren zeigen, dass die hier vorgelegten Ergebnisse auch eine Bestätigung der Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren in der Grundlagenforschung gezeigt haben und eine Translation in die klinische Forschung geschieht. PARP-Inhibitoren und andere Substanzen, deren Wirkmechanismen auf dem Konzept der synthetischen Letalität basieren, sind vielversprechende Agenzien, um Tumortherapie individueller, verträglicher und wirksamer zu machen.

Teile dieser Arbeit wurden 2017 unter dem Titel "PARP inhibition sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis" in der Zeitschrift "Oncology Letters" veröffentlicht (79).

6 Zusammenfassung

PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase)-Inhibitoren sind bereits für die Therapie des Ovarialkarzinoms zugelassen und für andere Tumorentitäten in Phase II- und III-Studien. Sie erlangen beim Endometriumkarzinom zunehmend an Bedeutung. Hierbei spielte bisher die Therapie mit Taxol und Platin-haltigen Substanzen die alleinige Rolle. Während Taxol den Abbau der Mikrotubuli verhindert, bewirkt Carboplatin Doppelstrangbrüche. Die BRCA1- oder BRCA2-Mutation, die typischerweise beim Mamma- und Ovarialkarzinom auftritt, ist beispielgebend für weitere medikamentöse Angriffspunkte, die basierend auf der Hypothese von synthetischer Letalität, in Kombination mit Chemotherapie das Tumorwachstum bekämpfen können. Unter der Vermutung, dass die Mutation von PTEN beim Endometriumkarzinom hierfür eine wichtige Rolle spielt, wurden in dieser Arbeit unter Berücksichtigung der Proliferations- und Apoptoseraten die fünf unterschiedlich differenzierten Endometriumkarzinomzelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A, KLE und RL95-2 untersucht. Sie wurden dosis- und zeitabhängig mit Paclitaxel bzw. Carboplatin und dem PARP-Inhibitor PJ34 inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie und eines Vitalitätsassays wurden Apoptoserate, Zellzyklusverteilung und Proliferation der Zellen bestimmt. Mittels Western Blot wurde die Existenz von PARP in allen 5 Zelllinien nachgewiesen, mit einem PARP-Aktivitätsassay die Enzymaktivität gezeigt, bzw. die Wirkung von PJ34 dargestellt. Im Vitalitätsassay zeigte sich unter der Behandlung von PJ34 und Paclitaxel eine deutliche Verminderung der Vitalität bei den Zelllinien AN3-CA, ECC-1, HEC-1A. Mittels Durchflusszytometrie ließ sich teilweise ein Anstieg der Apoptoserate zeigen. Die Kombination von Carboplatin und PJ34 zeigte indifferente Effekte. In Vorbereitung wurden durch Dosistitrationen subtoxische Dosen für die Chemotherapeutika ermittelt, die im Zellkulturversuch zusammen mit PJ34 eingesetzt wurden. Es konnten wesentlich geringere Dosen Taxol zusammen mit PJ34 eine ähnliche Wirkung erzielen wie die entsprechend toxische Monotherapie. Die klassische dosisabhängige apoptotische Wirkung der Chemotherapie, vor allem die des Taxols, kann somit mittels PARP-Inhibition unterstützt werden. Die angeregte apoptotische Wirkung könnte durch die Hemmung von PARP, welches eine Schlüsselrolle bei der Einleitung der Apoptose hat, unterstützt werden. Defekte in DNA-Reparaturmechanismen der Tumorzellen wirken synergistisch mit der Hemmung von PARP als Schlüsselenzym zur Reparatur von Einzelstrangbrüchen, wobei eine PTEN-Mutation hier nicht eindeutig als ursächlicher Defekt ermittelt werden konnte. Es zeigen sich allerdings weitere klinische Ansatzpunkte der Behandlung mit PARP-Inhibitoren bei der Therapie des Endometriumkarzioms. Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (79).

7 Literaturverzeichnis

- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Mar 11];49(6):1374–403. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23485231/
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik T und N der P mit E. S3-Leitlinie Diagnostik , Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom. 2018;(April):1–232. Available from: https://www.l2-3ogie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Endometriumkarzinom/LL_E ndometriumkarzinom Langversion 1.0.pdf
- Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, et al. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. Int J Gynecol Cancer [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Mar 10];26(1):2. Available from: /pmc/articles/PMC4679344/
- Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, et al. Endometrial cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2017 Apr 21];24(SUPPL.6):vi33–8. Available from: https://academic.oup.com/annonc/articlelookup/doi/10.1093/annonc/mdt353
- 5. Denschlag D, Ulrich U, Emons G. The Diagnosis and Treatment of Endometrial Cancer: Progress and Controversies. Dtsch Arztebl Int [Internet]. 2011 Aug 29 [cited 2022 Mar 10];108(34–35):571. Available from: /pmc/articles/PMC3167060/
- 6. Wallace AE, Gibson DA, Saunders PTK, Jabbour HN. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma. J Endocrinol. 2010;206(2):141.
- Musacchio L, Caruso G, Pisano C, Chiara Cecere S, Napoli M Di, Attademo L, et al. PARP Inhibitors in Endometrial Cancer: Current Status and Perspectives. 2020 [cited 2022 Mar 20]; Available from: http://doi.org/10.2147/CMAR.S221001
- Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, et al. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2014 Dec 11];24(1):36–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330675
- Pectasides D, Xiros N, Papaxoinis G, Pectasides E, Sykiotis C, Koumarianou A, et al. Carboplatin and paclitaxel in advanced or metastatic endometrial cancer. Gynecol Oncol [Internet]. 2008 May [cited 2014 Dec 12];109(2):250–4. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825808000838
- Oza AM, Elit L, Tsao M-S, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, et al. Phase II Study of Temsirolimus in Women With Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Trial of the NCIC Clinical Trials Group. J Clin Oncol [Internet]. 2011 Aug 20;29(24):3278–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158598/
- 11. MedScape. Abraxane (paclitaxel protein bound) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more [Internet]. 2014 [cited 2014 Dec 17]. Available from: http://reference.medscape.com/drug/abraxane-paclitaxel-protein-bound-9999775#0
- 12. Akram T, Maseelall P, Fanning J. Carboplatin and paclitaxel for the treatment of

advanced or recurrent endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2005 May [cited 2015 Jan 12];192(5):1365–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902110

- Howat S, Park B, Oh IS, Jin Y-W, Lee E-K, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. N Biotechnol [Internet]. 2014 May 25 [cited 2014 Dec 17];31(3):242–5. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678414000235
- Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer [Internet]. 2004 Jul 21;4(4):253–65. Available from: http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n4/fig_tab/nrc1317_F6.html
- 15. IFAP GmbH. Home ifap GmbH. [cited 2015 Jan 22]; Available from: http://www.ifap.de/
- Sigma-Aldrich. Carboplatin | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2015 Jan 22]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/C2538?lang=de®ion=DE
- Voigt W, Dietrich A, Schmoll H-J. Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. Pharm Unserer Zeit [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Jan 22];35(2):134–43. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/pauz.200500162
- Calvert AH. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of combination carboplatin/paclitaxel. Semin Oncol [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2015 Jan 22];24(1 Suppl 2):S2-85-S2-90. Available from: http://europepmc.org/abstract/MED/9045345
- Lord CJ, Ashworth A. Targeted therapy for cancer using {PARP} inhibitors. Curr Opin Pharmacol [Internet]. 2008 Aug;8(4):363–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489208000829
- 20. Anthony K. Class PI3K signaling events [Internet]. National Cancer Institute, Pathway Interaction Database. 2010. Available from: http://pid.nci.nih.gov/search/pathway_landing.shtml?pathway_id=200116&source= NATURE&genes_a=&genes_b=&what=graphic&jpg=on&ppage=1
- 21. Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, et al. PTEN Deficiency in Endometrioid Endometrial Adenocarcinomas Predicts Sensitivity to PARP Inhibitors. Sci Transl Med [Internet]. 2010;2(53). Available from: http://stm.sciencemag.org/content/2/53/53ra75.abstract
- 22. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature [Internet]. 2005 Apr 14 [cited 2014 Jul 10];434(7035):917–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature03445
- 23. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. Annu Rev Pathol [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Jan 5];4:127–50. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710138&tool=pmcentr ez&rendertype=abstract
- 24. Brasseur K, Gévry N, Asselin E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 11];8(3):4008. Available from: /pmc/articles/PMC5354810/

- Lord CJ, Tutt ANJ, Ashworth A. Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors. Annu Rev Med [Internet]. 2015 Jan 14 [cited 2017 Apr 21];66(1):455–70. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050913-022545
- O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. Mol Cell [Internet]. 2015 Nov [cited 2015 Nov 19];60(4):547–60. Available from: http://www.cell.com/article/S109727651500831X/fulltext
- 27. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. Science (80-) [Internet]. 2017 Mar 16;355(6330):1152 LP 1158. Available from: http://science.sciencemag.org/content/355/6330/1152.abstract
- 28. Pharmazeutische Zeitung online: Ovarialkarzinom: Olaparib erhält EU-Zulassung [Internet]. [cited 2015 Dec 1]. Available from: http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=55702
- 29. Curtin NJ, Helleday T. Inhibition of DNA repair as a therapeutic target. Cancer Drug Des Discov. 2008 Jan 1;284–304.
- Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. Front Cell Dev Biol. 2020 Sep 9;8:879.
- Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. Curr Top Microbiol Immunol [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 25];345:105–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20517715
- 32. Snyder SA, Dewhirst MW, Hauck ML. The role of hypoxia in canine cancer. Vet Comp Oncol [Internet]. 2008 Dec [cited 2016 Feb 26];6(4):213–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178681
- 33. Koi M, Boland CR. Tumor hypoxia and genetic alterations in sporadic cancers. J Obstet Gynaecol Res [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Apr 25];37(2):85–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272156
- Yang S, Xiao X, Meng X, Leslie KK. A mechanism for synergy with combined mTOR and PI3 kinase inhibitors. PLoS One [Internet]. 2011 Jan 19 [cited 2015 Jan 30];6(10):e26343. Available from: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026343
- 35. {PARP} Universal Colorimetric Assay {R&D} Systems [Internet]. Available from: http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_parp_colorimetric_assay.as px
- 36. Kuramoto H. Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. Acta Obstet Gynaecol Jpn [Internet]. 1972 Jan [cited 2019 Jun 25];19(1):47–58. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4678779
- Satyaswaroop PG. Endometrial Cancer. In: Masters, John; Palsson B, editor. Human Cell Culture - Cancer Cell Lines Part 2 [Internet]. 2002 [cited 2015 Jan 30]. p. 377. Available from: http://www.springer.com/biomed/cancer/book/978-0-7923-5878-7
- ATCC. ATCC Uterine Cancer Cell Panel [Internet]. 2016 [cited 2017 May 4]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TCP-1023.aspx#documentation

- Promega. A Cell Viability Assay Based on Monitoring Respiration by Optical Oxygen Sensing. Anal Biochem. 2000 Feb 15;278(2):221–7.
- 40. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc [Internet]. 2006 Aug 9 [cited 2019 Jun 19];1(3):1458–61. Available from: http://www.nature.com/articles/nprot.2006.238
- 41. Cobb L. Cell Based Assays: the Cell Cycle, Cell Proliferation and Cell Death. Mater Methods [Internet]. 2013 Feb 16 [cited 2017 May 11];3. Available from: http://www.labome.com/method/Cell-Based-Assays-the-Cell-Cycle-Cell-Proliferation-and-Cell-Death.html
- 42. Hyde J, Benbrook DM. Sensitivities of Uterine Adenocarcinoma, Mixed Mullerian Tumor {(MMT)} and Sarcoma Cell Lines to Chemotherapeutic Agents and a {Flex-Het} Drug. Am J Pharmacol Toxicol. 2006;1(4):83.
- 43. Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, et al. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. Nat Genet [Internet]. 1996 Jun [cited 2017 May 2];13(2):238–40. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng0696-238
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of {BRCA2-deficient} tumours with inhibitors of {poly(ADP-ribose)} polymerase. Nature [Internet]. 2005 Apr;434(7035):913–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature03443
- 45. Yap TA, Boss DS, Fong PC, Roelvink M, Tutt A, Carmichael J, et al. First in human phase I pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of KU-0059436 (Ku), a small molecule inhibitor of poly ADP-ribose polymerase (PARP) in cancer patients (p), including BRCA1/2 mutation carriers. J Clin Oncol [Internet]. 2007;25(18_suppl):3529. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2007.25.18 suppl.3529
- 46. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health National Cancer Institute. BRCA1 and BRCA2: Cancer Risk and Genetic Testing Fact Sheet - National Cancer Institute [Internet]. 2015 [cited 2017 May 2]. Available from: https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-factsheet
- 47. Kishi Y, Fujihara H, Kawaguchi K, Yamada H, Nakayama R, Yamamoto N, et al. PARP Inhibitor PJ34 Suppresses Osteogenic Differentiation in Mouse Mesenchymal Stem Cells by Modulating BMP-2 Signaling Pathway. Int J Mol Sci [Internet]. 2015 Oct 19 [cited 2017 May 3];16(10):24820–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492236
- 48. Chevanne M, Zampieri M, Caldini R, Rizzo A, Ciccarone F, Catizone A, et al. Inhibition of PARP activity by PJ-34 leads to growth impairment and cell death associated with aberrant mitotic pattern and nucleolar actin accumulation in M14 melanoma cell line. J Cell Physiol [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 May 3];222(2):401–10. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21964
- 49. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers. N Engl J Med [Internet]. 2009 Jul 9 [cited 2017 May 3];361(2):123–34. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0900212

- 50. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek S, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib in BRCA-deficient advanced breast cancer. J Clin Oncol [Internet]. 2009;27(18_suppl):CRA501–CRA501. Available from: http://dx.doi.org/10.1200/jco.2009.27.18_suppl.cra501
- 51. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. Lancet Oncol [Internet]. 2011 [cited 2017 May 3];12(9):852–61. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204511702145
- 52. Germain CS, Niknejad N, Ma L, Garbuio K, Hai T, Dimitroulakos J. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3. Neoplasia {(New} York, {NY)}. 2010;12(7):527.
- 53. Zhang B, Zhao R, He Y, Fu X, Fu L, Zhu Z, et al. MicroRNA 100 sensitizes luminal A breast cancer cells to paclitaxel treatment in part by targeting mTOR. Oncotarget [Internet]. 2016 Feb 2 [cited 2019 Jun 25];7(5):5702–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744318
- 54. Wellcome Trust Sanger Institute GRL. COSMIC: Sample overview for 1576457 [Internet]. [cited 2017 May 3]. Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/
- 55. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene [Internet]. 27(41):5497–510. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.245
- 56. Roock W De, Vriendt V De, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and {PTEN} mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol [Internet]. 2011;12(6):594–603. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204510702096
- 57. Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2017 May 4];19(18):2122–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131611
- 58. Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Wada-Hiraike O, Kashiyama T, Enomoto A, et al. Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. BMC Cancer [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Nov 16];14:179. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4007824&tool=pmcentr ez&rendertype=abstract
- Andreou AM, Tavernarakis N. SUMOylation and cell signalling. Biotechnol J [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 May 9];4(12):1740–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946876
- Bassi C, Ho J, Srikumar T, Dowling RJO, Gorrini C, Miller SJ, et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. Science [Internet]. 2013 Jul 26 [cited 2017 May 9];341(6144):395–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888040
- Xu K, Wang J, Gao J, Di J, Jiang B, Chen L, et al. GATA binding protein 2 overexpression is associated with poor prognosis in KRAS mutant colorectal cancer. Oncol Rep [Internet]. 2016 Jul 21 [cited 2017 May 9];36(3):1672–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27460045

- 62. Stewart RA, Pilie PG, Yap TA. Development of PARP and Immune-Checkpoint Inhibitor Combinations. Cancer Res [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2022 Apr 17];78(24):6717–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498083/
- 63. Philip CA, Laskov I, Beauchamp MC, Marques M, Amin O, Bitharas J, et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. BMC Cancer [Internet]. 2017 Sep 8 [cited 2022 Apr 17];17(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886696/
- 64. Bian X, Gao J, Luo F, Rui C, Zheng T, Wang D, et al. PTEN deficiency sensitizes endometrioid endometrial cancer to compound PARP-PI3K inhibition but not PARP inhibition as monotherapy. Oncogene. 2018 Jan 18;37(3):341–51.
- Janzen DM, Paik DY, Rosales MA, Yep B, Cheng D, Witte ON, et al. Low levels of circulating estrogen sensitize PTEN-null endometrial tumors to PARP inhibition in vivo. Mol Cancer Ther [Internet]. 2013 Dec [cited 2014 Dec 8];12(12):2917–28. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3904550&tool=pmcentr ez&rendertype=abstract
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res [Internet]. 2013 [cited 2017 May 11];1833(12):3448–59. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913002243
- Jäckel MC. Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose)Perspektiven f{ü}r ein biologisches Tumorstaging? HNO [Internet]. 1998;46(6):614–25. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s001060050283
- 68. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Mar 18];25(3):486. Available from: /pmc/articles/PMC5864239/
- Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature [Internet]. 2005 Mar 31;434(7033):652–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature03317
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods [Internet]. 1991 Jun [cited 2017 May 8];139(2):271–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175991901980
- Müller B. Differentielle Analyse des Phosphoproteoms Apoptose-induzierter Jurkat ACC 282-Zellen [Internet]. 1st ed. Berlin: Logos Verlag Berlin GmbH; 2012 [cited 2017 May 8]. Available from: https://books.google.de/books?id=NF1dAgAAQBAJ&pg=PA66&dq=Differentielle +Analyse+des+Phosphoproteoms+Apoptoseinduzierter+Jurkat+ACC+...&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwifvsuo5-DTAhVDXCwKHfk6CxsQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Differentielle%2520Analy se%2520des%2520Phosphoproteoms%252

- 72. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods [Internet]. 1995 Jul [cited 2017 May 8];184(1):39–51. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002217599500072I
- 73. Thermo Fisher Scientific. PARP (Cleaved) Multispecies In-Cell ELISA Kit, Near Infrared - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2017 May 16]. Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62224
- 74. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell [Internet]. 2003 Apr [cited 2017 May 14];3(4):347–61. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610803000850
- 75. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, et al. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. EMBO J [Internet]. 2008 May 7;27(9):1368–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2374839/
- 76. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 May 19];375(22):2154–64. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1611310
- 77. Mutschler E, Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B, Ruth P. Mutschler Arzneimittelwirkungen - Pharmakologie, Kinische Pharmazie, Toxikologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2020.
- 78. PARP-Inhibitoren beim Ovarialkarzinom: Schöne neue Welt! [Internet]. [cited 2022 Mar 18]. Available from: https://www.arzneimitteltherapie.de/heftarchiv/2018/10/parp-inhibitoren-beimovarialkarzinom-schone-neue-welt-aus-expertensicht.html
- 79. Dinkic C, Jahn F, Zygmunt M, Schuetz F, Rom J, Sohn C, et al. PARP inhibition sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis. Oncol Lett [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 Jun 26];13(4):2847–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28454476

Publikationen

Dinkic C, Jahn F, Zygmunt M, Schuetz F, Rom J, Sohn C, et al.

PARP inhibition sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis Oncol Lett [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 Jun 26];13(4):2847–51 (Artikel)

Wenig H., Jahn F., Heidrich S., Zygmunt M., Fluhr H.

PARP-Hemmung sensibilisiert humane endometriale Karzinomzellen für Paclitaxelund Carboplatin-vermittelte Apoptose

59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 9.–13.10.2012, München (Posterbeitrag)

Fluhr H., Jahn F., Zygmunt M.

Inhibition of PARP sensitizeshuman endometrial carcinoma cellsto paclitaxel-induced apoptosis

CESAR-Jahrestagung / CESAR Annual Meeting 2011 Greifswald, 16-18 June 2011 (Vortrag)

Jahn F., Zygmunt M., Fluhr H.

PARP-Hemmung sensibilisiert humane endometriale Karzinomzellen für Paclitaxelinduzierte Apoptose

127. Tagung der NGGG, Greifswald 20-21.05.2011, Rubrik: Onkologie (Posterbeitrag)