

ANTINEOPLASTISCHE WIRKUNG VON PARP-
INHIBITOREN IN KOMBINATION MIT ATR- ODER
ATM-INHIBITOREN AUF EWING-SARKOMZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Hauke Matthias Schadwinkel,
geboren am 03. Juni 1994 in Preetz**

Gutachter

1. Prof. Dr. James Beck, Jena
2. PD Dr. Tanja Groten, Jena
3. Prof. Dr. Ingo Müller, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.2021

*Meinem Vater,
Matthias Schadwinkel (* 29.10.1962 – † 13.04.2020),
der mit seiner Ehrlichkeit, Kreativität, Treue, Güte und Fürsorge so viele Menschen bereichert hat,
dem ich so unendlich viel verdanke
und von dem ich hoffe, dass er auch dort, wo er jetzt ist, stolz auf mich sein kann.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	8
2 Einleitung	10
2.1 Ewing-Sarkom	10
2.1.1 Definition	10
2.1.2 Epidemiologie	10
2.1.3 Ätiologie	10
2.1.4 Symptome und Lokalisation	12
2.1.5 Therapie	13
2.1.6 Prognose	14
2.1.7 p53-Status bei Ewing-Sarkomen	14
2.2 DNA-Schadensantwort	15
2.2.1 Nukleotid- und Basen-Exzisionsreparatur	16
2.2.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	17
2.2.3 p53 und die Einleitung des Zellzyklusarrests	18
2.2.4 DNA-Schadensreparatur bei Tumorzellen	20
2.3 Die Rolle von PARP-1 bei Schädigung des Genoms	21
2.4 PARP-Inhibitoren	23
2.4.1 Olaparib	25
2.4.2 Veliparib	26
2.5 Die Rolle von ATM und ATR bei Schädigung des Genoms	27
2.6 ATR-/ATM-Inhibitoren	29
2.6.1 ATR-Kinaseinhibitor VE-821	30
2.6.2 ATM-Kinaseinhibitor KU-55933	31
3 Zielstellung der Arbeit	33
4 Material und Methoden	34
4.1 Materialien	34
4.1.1 Zelllinien	34
4.1.2 Geräte und Materialien	35
4.1.3 Reagenzien, Kits, Medien, Puffer und Software	36
4.1.4 TaqMan-Sonden	37
4.2 Methoden	38
4.2.1 Zellkultivierung	38

4.2.2	Anlegen der Zellkulturen	38
4.2.3	Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen und Well-Platten	38
4.2.4	Passagieren der Zellen	39
4.2.5	Anlegen der Well-Platten	40
4.2.6	Behandlung der Zellen / Wirkstoffapplikation	40
4.2.7	Ernten der Zellen	41
4.2.8	Durchflusszytometrie	41
4.2.9	Bestimmung des synergistischen Effekts mittels Kombinationsindexanalyse... ..	45
4.2.10	Hemmung der Apoptose mit z-VAD-fmk	47
4.2.11	Messung der Caspase-3-Aktivität	48
4.2.12	Quantitative Echtzeit-RT-PCR	50
4.2.13	Western Blot	55
4.2.14	Zellzyklusanalyse	57
4.2.15	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Durchflusszytometrische Messungen mit Bestimmung von Zelltod und $\Delta\Psi_m$	59
5.1.1	A673-Zellen	59
5.1.2	WE-68-Zellen	61
5.1.3	SK-ES-1-Zellen	64
5.1.4	SaOS-2-Zellen	66
5.2	Zelltod und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk	67
5.2.1	A673-Zellen	67
5.2.2	WE-68-Zellen	68
5.2.3	SK-ES-1-Zellen	69
5.3	Caspase-3-Aktivitätsmessung	69
5.3.1	A673-Zellen	70
5.3.2	WE-68-Zellen	70
5.3.3	SK-ES-1-Zellen	71
5.4	Quantitative Echtzeit-RT-PCR	72
5.4.1	Gene für proapoptotische Proteine	72
5.4.2	Gene für DNA-Schadensantwort-Proteine	74
5.4.3	Andere untersuchte Gene	75
5.5	Western Blots	76
5.5.1	A673-Zellen	77

5.5.2	WE-68-Zellen.....	78
5.6	Zellzyklusanalyse	79
6	Diskussion.....	82
6.1	Thematischer Hintergrund.....	82
6.2	Bewertung des p53-Status der verwendeten Zelllinien	83
6.3	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen	84
6.4	Intrazelluläre Veränderungen durch die Wirkstoffkombination	89
7	Schlussfolgerungen	95
8	Anhang	97
	Literaturverzeichnis.....	97
	Tabellenverzeichnis.....	108
	Abbildungsverzeichnis	109
	Ehrenwörtliche Erklärung	111

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
alt-EJ	<i>alternative end-joining</i> (alternative Endverknüpfung)
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and RAD3-related kinase</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BRCA-(1/2)	<i>breast-cancer (1/2), early-onset</i>
bzw.	beziehungsweise
CDK	<i>cyclin-dependent-kinase</i>
CDK1A	<i>cyclin-dependent-kinase inhibitor 1A-Gen</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CI	<i>combination index</i> , Kombinationsindex
cm	Zentimeter
C_T	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
DDR	<i>DNA damage response</i>
dest.	destilliert
DiOC ₆ (3)	3'3-Dihexyloxacarbocyaninioidid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase</i> (DNA-abhängige Proteinkinase)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphate)

DSB	<i>double-strand break</i> (DNA-Doppelstrangbruch)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E1AF	<i>ETS variant transcription factor</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor</i>
ED ₅₀	mittlere effektive Dosis
engl.	englisch
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ETAA1	<i>Ewing's tumor-associated antigen 1</i>
ETS	<i>E26-transformation-specific</i>
ETV1	<i>ETS variant transcription factor 1</i>
EWS/EWSR1	<i>EWS RNA binding protein 1</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FAM TM	6-FAM-Phosphoramidit (Fluoreszenzfarbstoff)
FEV	<i>fifth Ewing variant protein</i>
FKS	fetales Kälberserum
FLI1	<i>friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	Homologe Rekombination
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Kap.	Kapitel
K _I	Dissoziationskonstante
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
MDM2	<i>mouse double minute-2 homolog</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRN	MRE11-RAD50-NBS1-Proteinkomplex

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (Nicht-homologe Endverknüpfung)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
o. g.	oben genannt
OD	optische Dichte
p21	CDK-Inhibitor 1
p53	Protein 53
p73	Tumorprotein p73
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related kinases</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, formuliert am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>real-time-polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-PCR)
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
sec	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Abweichung vom Mittelwert)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAG2	<i>stromal antigen 2</i>
Tab.	Tabelle
TP53	<i>tumor protein 53</i> , Gen für p53
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
vgl.	vergleiche
VIC™	<i>2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein</i> (Fluoreszenzfarbstoff)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
z-VAD-fmk	<i>Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>
β-NAD ⁺	β-Nicotinamidadeninukleotid
γH2AX	<i>phosphorylated H2A histone family member X</i> (= pH2AX)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
°C	Grad Celsius

1 Zusammenfassung

Das Ewing-Sarkom stellt den zweithäufigsten primär malignen Knochentumor im Kindes- und Jugendalter dar. Trotz großer Fortschritte in der Behandlung dieses Malignoms durch eine multimodale und kombinierte Therapie besteht noch immer eine sehr schlechte Prognose beim Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven, die zudem durch das Vorliegen einer Mutation im *TP53*-Gen weiter verschlechtert wird. Angesichts der erheblichen akuten und chronischen Toxizität einer kombinierten Therapie mit verschiedenen Chemotherapeutika besteht mithin nach wie vor die Notwendigkeit, schonendere und gleichzeitig effektivere Therapiestrategien in der Behandlung des Ewing-Sarkoms zu etablieren.

Das Ewing-Sarkom bietet aufgrund seines kaum mutierten Genoms nur wenige Angriffspunkte für eine zielgerichtete Krebstherapie. Durch seine molekulare Eigenschaft mit der Expression des aberrierenden Transkriptionsfaktors EWS-FLI1, der zellulär zu erhöhten basalen Transkriptionsleveln und damit einhergehend zu erhöhtem replikativen Stress führt, ist dieser Tumor jedoch besonders anfällig für die Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen, die u. a. mithilfe von PARP- oder ATR-/ATM-Signalwegen initiiert werden. Bei Ausschaltung der DNA-Reparatur durch selektive Inhibition der beteiligten Enzyme nimmt die genomische Instabilität der Tumorzellen derart große Ausmaße an, dass ihre zelluläre Integrität nicht mehr gewahrt werden kann und der Zelltod eingeleitet wird. Sowohl PARP-Inhibitoren wie Olaparib und Veliparib als auch ATR- und ATM-Inhibitoren wie VE-821 bzw. KU-55933 haben sich gegenüber Ewing-Sarkomzellen *in vitro* als wirksam erwiesen. Allerdings besitzen sie *in vivo* in jeweiliger Einzelbehandlung keine ausreichende Effektivität.

In dieser Arbeit sollten daher die antineoplastischen Effekte einer Kombination dieser Hemmstoffe sowie deren zelluläre Wirkungsweise auf drei Ewing-Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status untersucht werden. Dafür wurden an den Zelllinien verschiedene Versuchsreihen in Form von durchflusszytometrischen Messungen zur Bestimmung des Zelltods und des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials, der Vergleich dieser Werte mit zusätzlicher Behandlung des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk, sowie außerdem Caspase-3-Aktivitätsmessungen, quantitative Echtzeit-RT-PCR, Western Blots und Zellzyklusanalysen durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass die Kombination aus PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren in der p53-Null-Zelllinie A673 einen starken synergistischen Effekt im Sinne einer synthetischen Letalität aufwies. Die Kombinationsbehandlung mit Olaparib und VE-821 führte

in diesen Zellen zur Akkumulation von DNA-Schäden, die unter p53-unabhängiger Expressionssteigerung proapoptotischer Gene wie *PUMA* oder *NOXA* in der Aktivierung der Caspase-3 und Einleitung der Apoptose mündeten. Es konnte die in der Literatur bereits beschriebene Induktion von DNA-Schäden durch die Einzelbehandlung mit Olaparib bestätigt werden. Zudem wurde dargestellt, dass VE-821 zur Aufhebung des durch die DNA-Schäden eingeleiteten G2-M-Zellzyklusarrests beitrug, sodass die geschädigten Zellen weiterhin den Zellzyklus durchliefen und die genomische Instabilität letztendlich im Zelltod resultierte. Da die A673-Zelllinie neben dem funktionellen Verlust von p53 zudem eine Mutation im *CDKN2A*-Gen aufweist, die einen klinisch besonders aggressiven Subtyp von Ewing-Sarkomen mit einer hohen Chemoresistenz kennzeichnet, verdeutlicht der starke Synergismus der Kombinationsbehandlung die Möglichkeit der gezielten Krebstherapie gegen diese Zellen.

Auch in den p53-Wildtyp-Ewing-Sarkomzellen WE-68 wurde ein synergistischer Effekt der Kombination aus PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren beobachtet, der im Vergleich zu den A673-Zellen allerdings etwas schwächer ausfiel. In dieser Zelllinie kam es zu persistierenden DNA-Schäden und einer starken Induktion von *CDKN1A* und *PUMA* sowie zu einer Aktivitätssteigerung der Caspase-3 mit Initiierung der Apoptose. Diese Zellen wiesen eine besondere Sensitivität gegenüber der Olaparib-Behandlung auf, die am ehesten auf die funktionelle Intaktheit von p53 zurückzuführen ist.

In der p53-mutierten Zelllinie SK-ES-1 zeigten Olaparib und Veliparib in Kombination mit VE-821 lediglich additive bis leicht antagonistische Effekte. Außerdem zeigte sich eine nur unzureichende Auslösung der Apoptose dieser Zellen, die zur Effektivitätsminderung der eingesetzten Kombinationsbehandlung beiträgt.

Zusammenfassend bietet die Kombination von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren die Möglichkeit eines vielversprechenden, neuen Therapieansatzes in der Behandlung des Ewing-Sarkoms.

2 Einleitung

2.1 Ewing-Sarkom

2.1.1 Definition

Die vierte Edition der WHO-Klassifikation der Weichteil- und Knochentumoren definiert das Ewing-Sarkom als klein- und rundzelliges Sarkom mit charakteristischen molekularen Eigenschaften und unterschiedlichem Ausmaß einer neuroektodermalen Differenzierung, das mit einer balancierten Translokation unter Beteiligung des *EWSRI*-Gens auf Chromosom 22 einhergeht. Außerdem werden in dieser Definition auch periphere primitive neuroektodermale Tumoren, periphere Neuroepitheliome und die zuvor als Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie sowie Askin-Tumoren bezeichneten Neoplasien als Ewing-Sarkome bezeichnet (Pappo und Dirksen 2018). Ewing-Sarkome können sowohl ossäre als auch extraossäre Manifestationen aufweisen (Tu et al. 2017).

2.1.2 Epidemiologie

Das Ewing-Sarkom ist nach dem Osteosarkom der zweithäufigste primär maligne Knochentumor des Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalters. Primäre Knochentumoren machen in diesem Alter etwa 5 % aller Tumoren aus (Balamuth und Womer 2010). Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 15 Jahre (Hogendoorn et al. 2010). Bei der hellhäutigen Bevölkerung wird die Inzidenz mit etwa 3 / 1.000.000 angegeben. Dabei ist das männliche Geschlecht mit einem Verhältnis von 1,5 : 1 etwas häufiger betroffen als das weibliche (Bolling et al. 2013). Insgesamt ist die Inzidenz des Ewing-Sarkoms bei Kaukasiern gegenüber der asiatischen und dunkelhäutigen Bevölkerung deutlich erhöht (Worch et al. 2011).

2.1.3 Ätiologie

Genetisches Charakteristikum des Ewing-Sarkoms ist eine balancierte Translokation im Genom der Patienten mit Beteiligung des *EWSRI*-Gens auf Chromosom 22, das mit einem von fünf Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorgruppe (*FLI-1*, *ERG*, *ETV1*, *EIAF* und *FEV*) fusioniert. In 85 % der Fälle findet hierbei eine reziproke Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ unter Bildung des *EWS/FLI*-Fusionsgens statt (Pishas und Lessnick 2016). Bei dieser Translokation wird die starke transkriptionsaktivierende Domäne des EWSR1-Proteins mit der DNA-bindenden Domäne des FLI-1-Proteins verknüpft, wodurch ein aberrierender chimärer Transkriptionsfaktor entsteht. Dieser konstant aktivierte Transkriptionsfaktor EWS-FLI1 kann nun GGAA-Sequenzen in der DNA binden und so entweder aktivierende oder supprimierende

Wirkung auf Zielgene vermitteln. In der Gesamtheit entstehen dadurch erhebliche Veränderungen in der Genexpression, die zu der Entstehung des hochmalignen undifferenzierten kleinrundzelligen Tumors beitragen (Pishas und Lessnick 2016, Paronetto 2013). Außerdem ist bei etwa 10 % der Patienten die Translokation t(21;22)(q22;q12) mit der Fusion von *EWS* und *ERG* nachweisbar. Bei dieser Translokation fusioniert *EWSR1* mit dem auf Chromosom 21 gelegenen *ERG*, einem Transkriptionsfaktor mit hoher Ähnlichkeit zum *FLI-1* (Lessnick und Ladanyi 2012). In seltenen Fällen kann außerdem die Translokation t(7;22)(p22;q12) mit Fusion von *EWS* und *ETV1* oder anderen Fusionspartnern vorkommen (Lessnick und Ladanyi 2012).

Im nicht-fusionierten Zustand kann *EWSR1* die RNA-Polymerase II und das Splicing der DNA regulieren und sorgt so u. a. für genomische Stabilität der Zelle. Aufgrund der transkriptionellen Deregulierung infolge der Bildung des aberrierenden Transkriptionsfaktors *EWS-FLI1* zeigen sich in Ewing-Sarkomzellen erhöhte basale Transkriptionslevel, da die Regulation der Transkription durch *EWSR1* nicht mehr adäquat erfolgen kann. Die gesteigerte Transkription führt zu blockierten Transkriptionskomplexen und Akkumulation von R-Schleifen (Nieto-Soler et al. 2016). Das Reparaturenzym *BRCA-1* wird zu den Schäden koordiniert, allerdings nachfolgend an das Chromatin gebunden und damit zurückgehalten. Bei dessen funktioneller Abwesenheit kommt es in Ewing-Sarkomzellen durch die Minderung der Fähigkeit zur homologen Rekombination zu einer beeinträchtigten DNA-Reparatur. Ewing-Sarkomzellen weisen so in ihren funktionellen Eigenschaften viele Ähnlichkeiten zu *BRCA-1*-mutierten Tumorzellen auf (Gorthi et al. 2018).

Das hochdifferenzierte Ewing-Sarkom gehört zu den Tumoren mit der geringsten Rate an Mutationen und besitzt außer der onkologisch treibenden Translokation mit Beteiligung von *EWSR1* meist nur wenige Veränderungen im Vergleich zum Genom gesunder Körperzellen (Crompton et al. 2014). Hauptsächlich bestehen *STAG2*-, *TP53*- und *CDKN2A*-Deletionen, aber auch *ATM*- und *BRCA-1/2*-Mutationen können auftreten (Grunewald et al. 2018, Crompton et al. 2014, Mody et al. 2017).

Die Histogenese des Tumors ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Das Ewing-Sarkom besitzt keine wie bei Osteosarkomen oder Fibrosarkomen nachgewiesene spezifische Differenzierung zu Vorläuferzellen, sondern besteht histologisch aus undifferenzierten kleinrundzelligen basophilen Zellen, deren Herkunft bisher nicht zweifelsfrei klassifiziert werden konnte (Tu et al. 2017). Einige Studien liefern allerdings Hinweise auf eine mögliche

Entstehung aus mesenchymalen Stammzellen, die entweder aus dem Mesoderm oder der Neuralleiste stammen könnten. Mesenchymale, pluripotente Stammzellen wandeln sich bei intakter Zellfunktion in verschiedenste mesodermale Zelltypen um, zu denen auch Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten gehören. Diese mesodermalen Zellen finden sich neben dem Knochenmark auch in anderen Geweben, wodurch sich das seltene Auftreten extraossärer Manifestationen des Ewing-Sarkoms erklären lässt. Dabei wird durch die *EWS-FLII*-Mutation einer solchen pluripotenten Vorläuferzelle der Weg der normalen Differenzierung verhindert (Lessnick und Ladanyi 2012, Riggi et al. 2005, Tu et al. 2017).

2.1.4 Symptome und Lokalisation

Die Symptome beim Ewing-Sarkom sind unspezifisch: Zunächst treten, häufig auch nach einem banalen Trauma, Schmerzen im Bereich der Primärlokalisierung auf, die im Verlauf mit palpabler Raumforderung einhergehen können (Widhe und Widhe 2000). Selten kommt es durch die ossäre Manifestation zu pathologischen Frakturen der betroffenen Knochen. Zusätzlich können eine lokale Rötung und Überwärmung sowie im weiteren Verlauf Fieber und ein allgemeines Krankheitsgefühl auftreten, was die Abgrenzung zur Osteomyelitis erschwert. Aufgrund der unspezifischen Symptome sowie der Schwierigkeit der korrekten Befundung in der Bildgebung des Tumors können mehrere Monate von Symptombeginn bis zur endgültigen Diagnosestellung vergehen (Bolling et al. 2013, Ozaki 2015). Dies spielt auch eine Rolle für den hohen Prozentsatz der Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen vorliegen: Bei Diagnosestellung weisen bereits bis zu 25 % der Patienten Fernmetastasen auf. Bei 10 % der untersuchten Patienten finden sich diese in der Lunge, bei 10 % im Knochen und 5 % besitzen eine Kombination aus den genannten bzw. sonstige Lokalisationen (Hogendoorn et al. 2010).

Die häufigste primäre Lokalisation von Ewing-Sarkomen stellen die Diaphysen der langen Röhrenknochen (47 %) dar, zusätzlich sind Beckenknochen (26 %), Rippenbögen (16 %) und die Wirbelsäule (6 %) betroffen. Das Ewing-Sarkom kann allerdings in so gut wie jedem Skelettknochen entstehen (Bolling et al. 2013). Dabei treten 15 - 20 % der Ewing-Sarkome zunächst nicht primär im Knochen selbst, sondern im umliegenden Weichteilgewebe des Knochens auf (Tu et al. 2017). In seltenen Fällen wird auch eine Manifestation in inneren Organen wie u. a. Niere, Lunge oder Nebenniere berichtet (Salah et al. 2019). Gelegentlich kann neben dem Knochengewebe gleichzeitig ein Teil des umliegenden Weichteilgewebes betroffen sein, in diesem Fall spricht man von einem „Codman-Dreieck“ (Bolling et al. 2013).

2.1.5 Therapie

Beim Ewing-Sarkom findet ein multimodales Therapiekonzept Anwendung, das aus neoadjuvanter Chemotherapie, Lokalthherapie (bestehend aus operativer radikaler Resektion oder Radiotherapie) und anschließend adjuvanter Chemotherapie besteht. Aufgrund des komplexen Managements der Erkrankung sollte die Behandlung spezialisierten Zentren vorbehalten sein und, falls möglich, im Rahmen klinischer Studien erfolgen (Paulussen et al. 2009). Es gibt für die Behandlung des Ewing-Sarkoms keine international anerkannte Risikoklassifikation. Häufig werden prognostische Faktoren wie die initiale Tumorgroße, die An- oder Abwesenheit von Fernmetastasen oder das Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie herangezogen. Diese Faktoren werden jedoch durch die verwendete Therapie in unterschiedlichstem Ausmaß beeinflusst bzw. variieren zwischen den einzelnen Studien zu stark, um daraus eine allgemeingültige Klassifizierung des individuellen Risikos heranziehen zu können (Balamuth und Womer 2010).

Aktuell werden nach der großen multizentrischen europäischen Studie EWING 2008 bei Diagnosestellung durch Biopsie eines Ewing-Sarkoms zunächst drei bis sechs Zyklen aus initialer systemischer neoadjuvanter Chemotherapie nach dem sogenannten VIDE-Schema (Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid) und ein Zyklus nach dem VAI-Schema (Vincristin, Actinomycin D und Ifosfamid) empfohlen, bevor die Lokalthherapie aus Bestrahlung oder vorzugsweise radikaler chirurgischer Resektion folgt (Ladenstein et al. 2010). Bei der chirurgischen Lokalthherapie wird eine R0-Resektion angestrebt. Ist die chirurgische Resektion nicht möglich oder kann nur eine R1- oder R2-Resektion erfolgen, ist eine alleinige oder anschließende Bestrahlung indiziert. Nachfolgend wird eine adjuvante Chemotherapie mit sechs bis zehn Zyklen der Chemotherapeutika in dreiwöchigem Intervall nach dem VAI-Schema (s. o.) bei männlichen bzw. nach dem VAC-Schema (zusätzlich Cyclophosphamid statt Ifosfamid) bei weiblichen Patienten durchgeführt. Vierer- oder Sechserkombinationen haben sich bei der Behandlung am wirkungsvollsten erwiesen. Insgesamt dauert die Behandlung etwa acht bis zwölf Monate (Ladenstein et al. 2010, Paulussen et al. 2009). Dabei bringt die zusätzliche Gabe von Etoposid und Ifosfamid nur bei primärem, nicht-metastasierten Tumor eine Prognoseverbesserung, während die Dosiserhöhung der einzelnen Alkylanzien das *Outcome* der Patienten nicht verbessert (Grier et al. 2003, Granowetter et al. 2009).

Durch die Anwendung der Kombination von Chemotherapeutika und Evaluierung in großen multizentrischen Studien konnte seit den Fünfzigerjahren eine bemerkenswerte Verbesserung der Überlebensrate von etwa 10 % auf 70 % erreicht werden (Jurgens und Dirksen 2011).

Bei Vorliegen von Fernmetastasen ist diese allerdings deutlich weniger stark ausgeprägt (s. Kap. 2.1.6). Anzumerken ist außerdem, dass in den vergangenen 15 Jahren keine weitere Optimierung der Therapie mehr erzielt werden konnte (Casey et al. 2019).

2.1.6 Prognose

Die individuelle klinische Prognose des Ewing-Sarkoms kann variieren und ist von diversen Faktoren abhängig. Zu den wichtigsten gehören die initiale Tumorgröße (Volumen ≥ 200 ml oder größter Durchmesser ≥ 8 cm) sowie die Lokalisation des Primärtumors, das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose, das Patientenalter sowie das histologische Ansprechen auf die Therapie (Bosma et al. 2018).

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung des Ewing-Sarkoms durch die multimodale Therapie besteht weiterhin eine sehr schlechte Prognose bei Vorliegen von Metastasen und beim Auftreten von Rezidiven. Liegen beim Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen vor, so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei weniger als 30 % (Gaspar et al. 2015). Beim Vorliegen von Rezidiven liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei unter 20 %. Prognostisch günstigere Faktoren sind hierbei nur die Zeit von der Erstdiagnose bis zum Rezidiv (> 2 Jahre) und ein lokales Rezidiv (Stahl et al. 2011).

Die Prognose bei extraossärem Befall ist bei gleicher Standardbehandlung vergleichbar mit derjenigen von Patienten mit primärer ossärer Manifestation (Lynch et al. 2018). Allerdings weisen Patienten mit Weichteilmanifestation ein deutlich höheres Risiko für lokale Rezidive auf (Salah et al. 2019).

2.1.7 p53-Status bei Ewing-Sarkomen

Das als „Wächter des Genoms“ bekannt gewordene Protein p53, das bei DNA-Schäden eine zentrale Rolle in der Verhinderung einer onkologischen Transformation und zellulären Entartung einnimmt, gilt durch seine angestoßenen zellulären Prozesse zur Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion der Apoptose und der Initiierung der DNA-Reparatur in den meisten Tumoren als maßgeblicher Tumorsuppressor (s. Kap. 2.2.3). Daher wundert es nicht, dass das *TP53*-Gen das am häufigsten veränderte Gen aller Tumoren darstellt und in etwa 50 % aller Fälle mutiert ist (Vogelstein et al. 2000). Im Gegensatz dazu findet sich allerdings bei Ewing-Sarkomen in lediglich ungefähr 10 % der Tumoren eine *TP53*-Mutation, die restlichen 90 % exprimieren den p53-Wildtyp. Tatsächlich nimmt das Ewing-Sarkom damit den Platz mit der geringste Rate an *TP53*-Mutationen aller Sarkome ein (Nielsen et al. 2011).

Außerdem bleibt in Ewing-Sarkomen die Integrität der von p53 initiierten funktionellen Signalwege und Zellzyklus-Checkpoints weitestgehend bewahrt (Kovar et al. 2003). Der aberrierende Transkriptionsfaktor des EWS-FLI1-Fusionsproteins besitzt allerdings die Fähigkeit, die Aktivität von p53 zu unterdrücken. Dies kann einerseits durch indirekte Mechanismen wie die Beeinflussung des mit p53 interagierenden Notch-Signalwegs (Ban et al. 2008), andererseits aber auch durch direkte Bindung von EWS-FLI1 an p53 mit Bildung eines Proteinkomplexes im Zellkern geschehen (Li et al. 2010). Bei zusätzlicher Mutation im *TP53*-Gen, die sich in 10 % der Fälle nachweisen lässt, besitzen Ewing-Sarkome jedoch eine deutlich schlechtere Prognose. Diese Tumorzellen besitzen ein signifikant verringertes Ansprechen auf Chemotherapeutika und ein aggressiveres Verhalten mit invasivem Wachstum und früher Metastasierung (Huang et al. 2005, de Alava et al. 2000). Hauptsächlich dominieren in Ewing-Sarkomzellen ähnlich zu anderen Tumoren *Missense*-Mutationen des *TP53*-Gens, bei denen die p53-Funktion noch partiell erhalten bleibt, das mutierte Protein jedoch auch als onkogener Treiber wirken kann (Kovar et al. 1993, Freed-Pastor und Prives 2012).

2.2 DNA-Schadensantwort

Die DNA-Schadensantwort (engl. *DNA Damage Response*) umfasst alle molekularen und zellulären Mechanismen, die nach einer Schädigung der DNA innerhalb der Zelle ablaufen. In jeder menschlichen Zelle treten ungefähr 10^4 - 10^5 DNA-Schädigungen pro Tag auf (Giglia-Mari et al. 2011). Diese können durch eine Vielzahl von Schädigungsmechanismen ausgelöst werden, die sowohl durch exogene Faktoren als auch durch endogene Prozesse zustande kommen. Zu den bedeutendsten Ursachen zählen Umweltfaktoren wie ionisierende Strahlung in Form von UV-, Gamma- oder Röntgenstrahlung sowie eine Vielzahl genotoxischer chemischer Karzinogene, allerdings auch durch Zellmetabolismus anfallende reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Fehler im korrekten Ablauf der Replikation und spontane hydrolytische Reaktionen der Nukleotide (Giglia-Mari et al. 2011).

Aus diesen Ursachen resultiert eine große Anzahl struktureller Schäden an der DNA. Dazu gehören u. a. Punktmutationen in Form von Basenmodifikationen durch Oxidation, Methylierung, Photocyclisierung, Deaminierung, Depurinierung und Depyrimidierung. Aber auch Basenfehlpaarungen durch fehlerhafte Replikation (engl. *mismatch*), eine Blockierung von Replikationsgabeln oder die Bildung von DNA-Addukten durch Auftreten von DNA-Protein- und DNA-DNA-Vernetzungen, welche die Replikation erschweren oder verhindern,

können auftreten. Die gefährlichsten Mutationen stellen jedoch besonders Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche der DNA dar (Sancar et al. 2004). Nicht oder nur unvollständig reparierte Läsionen können zu Mutationen führen, die infolge inkorrekturer Zellfunktion Entstehungsort eines malignen Tumors sein können. Durch unkontrollierte Teilung der geschädigten Zellen und invasives Wachstum des Tumorgewebes besteht letztendlich eine potenzielle Gefahr für den gesamten Organismus (Pilie et al. 2019).

Um diesem genomischen Stress entgegenwirken zu können, hat die Zelle eine Vielzahl von Systemen entwickelt, die DNA-Schäden entdecken, deren Anwesenheit signalisieren und so biochemische Signalkaskaden einleiten können, um sowohl lokal die Reparatur des Schadens zu induzieren als auch in der gesamten Zelle durch verschiedenste Mechanismen dafür zu sorgen, dass bei gestörter Integrität des Genoms eine weitere Replikation und damit die Vervielfältigung des Schadens mit der Gefahr einer unkontrollierten Teilung verhindert wird.

2.2.1 Nukleotid- und Basen-Exzisionsreparatur

Bei intakter DNA-Schadensantwort kommt es zunächst zu einer Detektion der Schädigung und daraufhin zur Akkumulation sowie gegenseitiger Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturenzyme am Ort der Läsion, die schließlich die endgültige Reparatur des Schadens einleiten. Für die unterschiedlichen Formen der DNA-Schädigung existieren verschiedene spezialisierte Reparaturmechanismen. Während ein großes Spektrum an verschiedenen Schäden mit Unebenheiten in der DNA-Doppelhelix (engl. *bulky lesions*) wie z. B. DNA-Addukte oder Pyrimidin-Dimere mithilfe der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert wird, die in einem vielschrittigen Prozess ein größeres DNA-Segment um den Schaden herum herausschneidet und ersetzt, werden kleinere chemische Veränderungen an Basen wie Oxidierung, Hydroxylierung, Desaminierung oder Alkylierung, die nicht die Integrität der DNA-Doppelhelix stören, direkt durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) wiederhergestellt (Giglia-Mari et al. 2011). Zunächst entfernen in diesem Prozess verschiedene DNA-Glykosylasen die modifizierten Basen, bevor durch die AP-Endonuklease ein kleiner Einzelstrangbruch eingefügt, die resultierende abasische Stelle durch die DNA-Polymerase β komplementär aufgefüllt und mithilfe der Ligase wieder verknüpft wird (Hegde et al. 2008). Auch DNA-Einzelstrangbrüche können durch eine Form der BER mit dem Schlüsselenzym PARP-1 repariert werden, deren genauer Ablauf ausführlicher im Kap. 2.3 dargestellt ist.

2.2.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Insbesondere ionisierende Strahlung, darunter UV-Strahlung, und reaktive Sauerstoffspezies sind wichtige Ursachen für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB – engl. *double-strand breaks*). Diese stellen den schwerwiegendsten DNA-Schaden dar, da sie zum Gen-Rearrangement führen können und bei diesen Schäden der komplementäre, verbliebene DNA-Einzelstrang durch Durchtrennung beider Nukleotidketten nicht mehr als Matrize zum Ablesen der ursprünglichen DNA-Information dienen kann, wie es bei DNA-Schädigungen der Fall ist, die z. B. mithilfe Basenexzisions- oder Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden können (Jackson und Bartek 2009). So vermag nicht nur der Schaden selbst, sondern auch dessen inadäquate Reparatur zum programmierten Zelltod oder Mutationen im Genom zu führen, wofür schon ein einziger DSB ausreicht (Shrivastav et al. 2008, Rich et al. 2000).

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann durch homologe oder durch nicht-homologe Reparaturmechanismen erfolgen (Scully et al. 2019, Jackson und Bartek 2009, Sung und Klein 2006). Die etwas akkuratere homologe Rekombination (HR) ist in Prokaryoten und Hefezellen weit verbreitet, während in höheren Eukaryotenzellen die Möglichkeit einer Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination von der entsprechenden Phase des Zellzyklus abhängt, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt der Reparatur befindet. Bei diesem Reparaturmechanismus werden wechselseitig Nukleotidsequenzen von identischen DNA-Doppelsträngen analoger Chromatide ausgetauscht. An diesem Vorgang sind u. a. der MRN-Komplex, ATM sowie BRCA-1 beteiligt (s. auch Kap. 2.5) (Scully et al. 2019). Da für die HR ein homologes Schwesterchromatid als Template zur Reparatur benötigt wird, kann sie nur in der S- und G2-Phase erfolgen. Bei postmitotischen Zellen und Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, muss bei Doppelstrangbrüchen auf die häufig als wesentlich fehleranfälliger beschriebenen Reparaturmechanismen der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ – *non-homologous end-joining*) oder alternativen Endverknüpfung (alt-EJ - *alternative end joining*) zurückgegriffen werden (Scully et al. 2019).

Bei der NHEJ werden nach einem Doppelstrangbruch zunächst beide freien DNA-Enden von dem ringförmigen Heterodimer Ku70/80 gebunden, das eine hohe Affinität zu freien DNA-Enden besitzt. So werden die DNA-Stränge vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt und der Bruch einigermaßen stabilisiert (Walker et al. 2001). Anschließend folgt die Bindung der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PKcs aus der PIKK-Familie (s. Kap. 2.5). Diese fügt die Bruchenden mithilfe des Ligationskomplexes IV/XRCC4 wieder zusammen (Weterings und Chen 2008). Da es bei diesem Prozess allerdings häufiger zu Deletionen einzelner Nukleotide

und Modifikation blockierender Hydroxyl- oder Phosphatgruppen kommt, führt diese Form der DNA-Reparatur vergleichsweise häufig zu kleinen Fehlern gegenüber der ursprünglichen Basenabfolge (Schipler und Iliakis 2013). Wenn z. B. Mutationen für Ausfälle in der HR oder NHEJ sorgen, kann auch die alternative Endverknüpfung (alt-EJ) die Reparatur von DSBs übernehmen. Bei diesem in gesunden Zellen noch nicht vollständig verstandenen Reparaturmechanismus werden die DNA-Termini zunächst weitläufiger zu einzelsträngigen DNA-Enden zurückgeschnitten, bis dadurch entstehende kurze homologe (= mikrohomologe) DNA-Sequenzen durch bestimmte Proteine wieder miteinander verbunden werden. Diese Proteine sind ebenfalls in der HR involviert, auch PARP wurde in diesem Reparaturmechanismus als wichtiges teilhabendes Protein identifiziert (Sallmyr und Tomkinson 2018). Hier drohen durch den größeren Sequenzverlust durch Reparatursfehler allerdings auch gravierende Mutationen für die Zelle. In vielen Tumorzellen findet sich eine vermehrte Aktivität der an der alt-EJ beteiligten Enzyme, die diese auch zum Ziel verschiedener zielgerichteter Therapien machen können (Sallmyr und Tomkinson 2018).

2.2.3 p53 und die Einleitung des Zellzyklusarrests

Durch die Detektion von DNA-Schäden werden viele verschiedene intrazelluläre Prozesse angestoßen, die u. a. die Verhinderung der weiteren Zellteilung mit Vervielfältigung des Schadens beinhalten. Ein elementar wichtiges Schlüsselenzym zur Bewahrung der genetischen Integrität der Zelle ist dabei das als „Wächter des Genoms“ bekanntgewordene und durch das *TP53*-Gen auf dem Chromosom 17p13.1 codierte Protein p53, das bei DNA-Schäden aufgrund zellulärer posttranslationaler Stabilisierung akkumuliert und die Transkription von Genen einleitet, die u. a. an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose und an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Vogelstein und Kinzler 2004).

Das Protein p53 wird in der Zelle konstitutiv exprimiert, bei intakter DNA allerdings infolge durch MDM2 vermittelter Ubiquitinierung mittels E3- und E4-Ubiquitinligasen sofort wieder abgebaut. Meist bestehen daher nur geringe intrazelluläre Proteinlevel von p53; die Halbwertszeit des Proteins beträgt lediglich etwa 20 Minuten (Somasundaram 2000). Wirken jedoch zelluläre Stressoren wie DNA-Schäden, hypoxische Zustände oder Onkogenaktivierung auf die Zelle, wird p53 u. a. durch die Kinasen ATM, ATR oder CHK1 am Serin 15 phosphoryliert, verliert infolgedessen seine Affinität zu MDM2 und wird nicht mehr ubiquitiniert. Durch diese posttranslationale Modifikation kommt es zur sprunghaften Akkumulation von p53, das daraufhin die Transkription verschiedener Gene bewirkt (Moll und

Petrenko 2003). Ein wichtiges davon ist das *CDKN1A*-Gen, dessen codiertes Protein p21 (= CDK-Inhibitor 1) neben anderen zellulären Funktionen wie der Verhinderung der Zelldifferenzierung und -seneszenz mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK-1A,-1B, -D und -E) einen Komplex bildet und diese damit inhibiert. Dies führt zur Einleitung des Zellzyklusarrests und Arretierung der Kontrollpunkte G1/S, S/G2 und G2/M, wobei p21 besonders den Eintritt in die S-Phase reguliert. Zunächst paradox anmutend, inhibiert aktives p21 jedoch auch die Apoptose der Zelle, um im eingetretenen Zellzyklusarrest eine suffiziente Wiederherstellung der DNA-Schäden gewährleisten zu können. Während p21 in den meisten Zellen als Tumorsuppressor angesehen wird, kann es so allerdings in bestimmtem zellulären Kontext auch als Onkogen gelten (Abbas und Dutta 2009). Mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus transkribiert p21 auch MDM2, sodass nach Reparatur des Schadens die intrazellulären hohen Proteinlevel von p53 wieder sinken. Im Gegensatz zu p21 fungiert p53 als transkriptioneller Aktivator von proapoptotischen Genen wie *PUMA (BBC3)* und *BAX*, die beide zur Bcl-2-Familie gehören, und besitzt so die Möglichkeit, bei großem Ausmaß der DNA-Schädigungen auch die Apoptose der Zelle einzuleiten (Nakano und Vousden 2001, Knudson et al. 2001).

Das *TP53*-Gen ist in über 50 % der humanen Tumoren mutiert. Dabei gehen diese Mutationen meist mit höheren Metastasierungsraten und einer deutlich schlechteren Prognose einher (Girardini et al. 2014). Neben dem Verlust seiner Tumorsuppressorfunktion durch seine zentrale Rolle bei der Initiierung von Reparatur und Zellzyklusarrest kann das mutierte *TP53* zusätzlich auch als Onkogen wirken und damit das Verhalten verschiedener Tumoren dramatisch verändern (Freed-Pastor und Prives 2012). In über 70 % der Tumoren kommt es zu einer *Missense*-Mutation, die dazu führt, dass das transkriptionsunfähige Protein in voller Länge codiert wird und daraufhin in der Zelle akkumuliert. Häufig ist dabei besonders der DNA-bindende Abschnitt betroffen, der zwar zur Funktionseinschränkung von p53 führt, allerdings viele seiner morphologischen Eigenschaften nicht beeinflusst, sodass p53 weiterhin beispielsweise von MDM2 inhibiert und daher in dessen negative Rückkopplung eingebunden werden kann. Letztendlich ist das mutierte *TP53* fähig, im Sinne einer *Gain-of-function*-Mutation durch intrazelluläre Inhibierung oder Aktivierung anderer Proteine entscheidend zur Bildung, Invasion oder Metastasierung der Tumorzellen beizutragen (Goh et al. 2011, Muller und Vousden 2013, Brosh und Rotter 2009, Strano et al. 2007).

Da die Akkumulation hoher Mengen an mutiertem p53 fast nur in Tumorzellen zu finden ist, stellt das mutierte p53 einen vielversprechenden Ansatz zielgerichteter Therapien dar, für den momentan weiterhin Wirkstoffe erprobt werden (Sobhani et al. 2020).

2.2.4 DNA-Schadensreparatur bei Tumorzellen

Es erstaunt nicht, dass in Tumorzellen häufig Gendefekte oder -mutationen in Proteinen der DNA-Schadensantwort zu finden sind (Brown et al. 2017). Durch die Defizienz dieser Systeme entzieht sich die Tumorzelle der Kontrolle derjenigen Mechanismen, die eine weitere Vervielfältigung des Schadens minimieren und kann sich so ungehindert weiterteilen. Bezogen auf eine Tumorzellpopulation stellt dies auch einen Selektionsvorteil für diese Zellen mit Verdrängung sich weniger schnell teilender Zellen dar (Cahill et al. 1999). Bei gesunden Zellen kann durch eine ausgeprägte Redundanz der unterschiedlichen Systeme auch beim Ausfall eines der beteiligten Reparaturproteine dessen Aufgabe meist durch ein anderes kompensiert werden, sodass auch bei Mutation oder Hemmung eines der an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine der Mechanismus der Reparatur und Zellzyklusarrest weiterhin ablaufen kann (Darzynkiewicz 2011). Besonders Doppelstrangbrüche, die u. a. mithilfe wichtiger Proteine wie ATM repariert werden, stellen hierbei eine große Gefahr für die Zelle dar (Shrivastav et al. 2008).

Viele Tumorzelllinien weisen durch ein stark verändertes und instabiles Genom mit stetiger unkontrollierter Teilung und zellulärem Stress allerdings auch größere Defekte bei Komponenten der DNA-Schadensreparatur auf, die sie so anfälliger für DNA-Schäden machen. Durch ihre genomische Instabilität sind Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen meist ohnehin einem höheren Ausmaß an replikativem Stress ausgesetzt (Gaillard et al. 2015). Nimmt das Ausmaß der DNA-Schäden bzw. der genomischen Instabilität nun durch Stressoren zu stark zu, fehlt Tumoren durch die Defizienz verschiedenster suffizienter Reparatursysteme eine adäquate Möglichkeit der Behebung des Schadens. So muss die Tumorzelle z. B. bei Ausfall der HR durch Mutation von BRCA-1 daraufhin meist auf alternative, wesentlich fehleranfälligeren Mechanismen der Reparatur wie z. B. NHEJ zurückgreifen, was die genomische Instabilität abermals erhöht. Durch die Hemmung bestimmter Enzyme wie PARP oder ATR bzw. ATM, die in einigen Tumoren häufig überexprimiert und für deren Überleben essentiell sind, wird die genomische Instabilität so groß, dass es zu einem selektiven Untergang der Tumorzellen kommt (Farmer et al. 2005, Gaillard et al. 2015). Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Wirkungsweise der selektiven Toxizität.

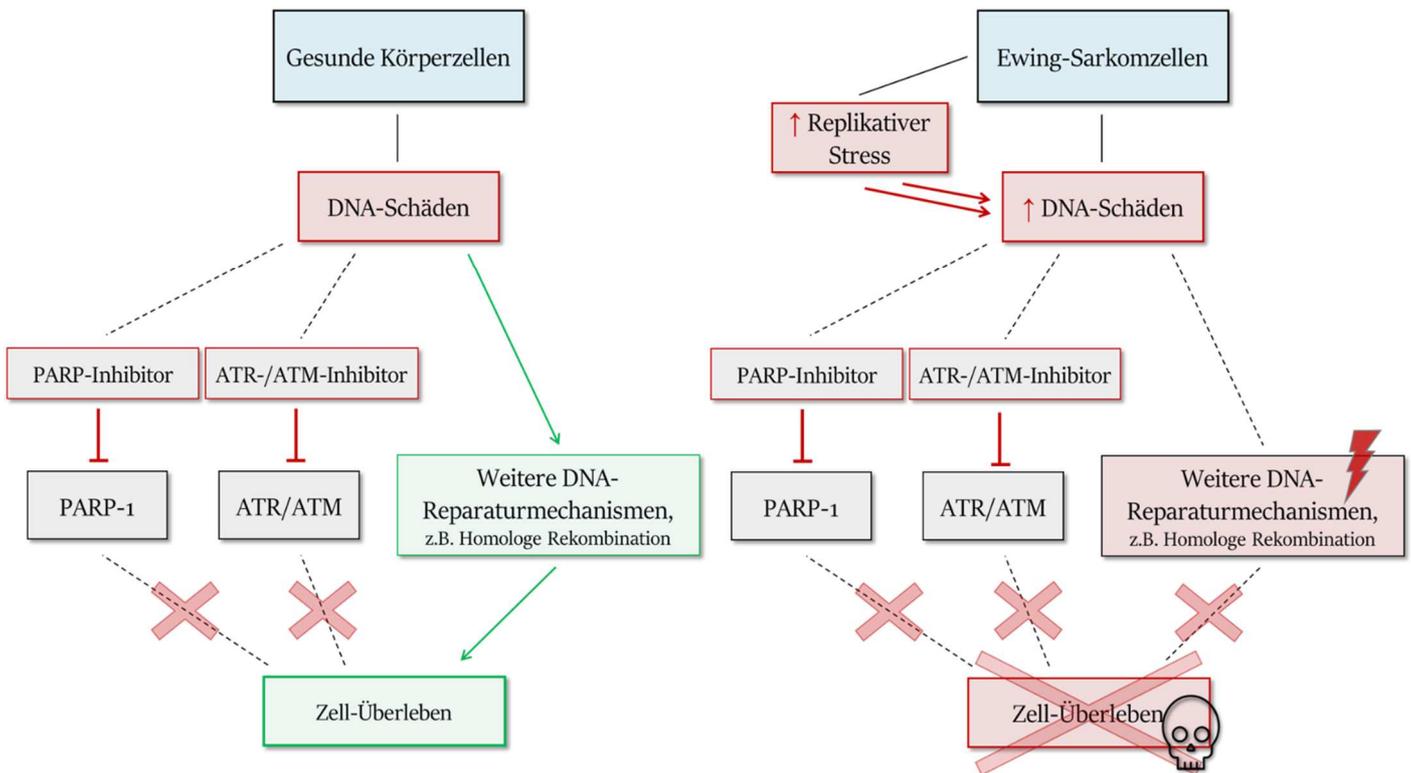


Abb. 1: Schematische Darstellung der selektiven Toxizität der Kombination von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren auf Ewing-Sarkomzellen. Bei auftretenden DNA-Schäden und medikamentöser Hemmung von PARP und ATR bzw. ATM, die beide eine zentrale Rolle in der DNA-Schadensantwort einnehmen, ist die Zelle auf intakte zusätzliche DNA-Reparaturmechanismen wie bspw. die Homologe Rekombination (HR) angewiesen. In Ewing-Sarkomzellen herrscht aufgrund des spezifischen aberrierenden Transkriptionsfaktor EWS-FLI1 ein erhöhter replikativer Stress vor, der die Ausbildung weiterer DNA-Schäden begünstigt. Da diese Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen außerdem häufig funktionelle Defekte in weiteren Reparaturproteinen aufweisen, kann die zelluläre Integrität aufgrund der genomischen Instabilität nicht weiter aufrechterhalten werden. Dies führt zum tumorspezifischen Zelltod.

2.3 Die Rolle von PARP-1 bei Schädigung des Genoms

Die humane Poly(ADP-ribose)-Polymerase-Familie besteht aus 17 funktionell ähnlichen Enzymen, die mithilfe einer posttranslationalen Modifikation die ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen katalysieren. Hierbei werden ADP-Ribose-Einheiten vom Cofaktor β -NAD⁺ (β -Nicotinamidadenindinukleotid) auf die Zielproteine übertragen und dadurch verzweigte oder lineare Polymere geschaffen, die als Signalmoleküle dienen (De Vos et al. 2012). PARP sind in fast alle zellulären Prozesse eingebunden und nehmen so eine elementare Funktion z. B. in der DNA-Reparatur, Transkription und Translation von Proteinen, Homöostase von Zellen, Signaltransduktion und Zelltod ein.

Eine Fehlfunktion der ADP-Ribosylierung kann mit unterschiedlichsten Krankheiten assoziiert sein, darunter Karzinomentstehung, neurodegenerative Erkrankungen, Herzinsuffizienz und Diabetes (Daniels et al. 2015).

PARP-1, PARP-2 und PARP-3 sind wichtige Enzyme dieser Familie, die neben Beeinflussung von zellulären Vorgängen wie Zelldifferenzierung und -proliferation eine zentrale Rolle bei der Detektion von DNA-Schäden und Initiierung von DNA-Einzelstrangbruch- und Basenexzisionsreparatur einnehmen. Sie besitzen z. T. überlappende Eigenschaften und eine ähnliche Wirkungsweise. PARP-1 ist allerdings das am besten verstandene der PARP-Proteine und offenbar das wichtigste für die Bewahrung der genomischen Stabilität unter physiologischen Bedingungen, da es über 85 % der PARP-Aktivität ausmacht (Fatokun et al. 2014, De Vos et al. 2012, Pishas und Lessnick 2016).

PARP-1 besitzt die Fähigkeit, insbesondere Einzelstrangbrüche und Basenmutationen, allerdings auch blockierte Replikationsgabeln und Doppelstrangbrüche zu detektieren und daraufhin als Homo- oder Heterodimer an die DNA zu binden (Bai 2015). Durch diese Aktivierung katalysiert es die Bildung von polymeren Ketten aus ADP-Ribose (PAR – *poly-ADP-ribose*) an nukleären Zielproteinen, zu denen neben umgebenden Histonen (Heteromodifikation) auch es selbst gehört (Automodifikation). Je größer die Schäden sind, desto mehr PAR akkumuliert im Zellkern. Während sich die Histone durch PAR von der DNA lösen, dient PARP als Plattform zur Bindung rekrutierter DNA-Reparatur- und Signalenzyme wie der DNA-Ligase III, DNA-PKcs, Ku70 und ATM sowie Chromatin-Remodeling-Faktoren an der beschädigten Stelle, die diese ausbessern können (De Vos et al. 2012). Die Automodifikation mit verzweigten PAR-Ketten wird außerdem benötigt, damit PARP wieder von der DNA dissoziieren kann. In Situationen, in denen die Zelle keinen Stressoren unterliegt, scheint die Aktivierung von PARP nicht unbedingt zur Reparatur benötigt zu werden. Sobald allerdings stärkere Schäden vorliegen, ist die Funktionalität von PARP unabdingbar (De Vos et al. 2012, Bai 2015, Brown et al. 2017).

Bei massiven Schäden an der DNA kann PARP-1 indessen auch zusätzlich den Untergang der betroffenen Zelle als protektiven Schutzmechanismus vor einer onkogenetischen Transformation auslösen. Dabei sind drei sich teilweise überschneidende Wege bekannt, die zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod führen können, der Parthanatos genannt wird („Par“ vom auslösenden PAR-Polymer; „Thanatos“ als die Personifikation des Todes in der griechischen Mythologie). Einerseits wird bei übermäßiger Aktivierung von PARP-1 der intrazelluläre

Vorrat seines Substrats NAD⁺ aufgebraucht. Die funktionelle Verminderung des zur Verfügung stehenden NAD⁺ beeinträchtigt den zellulären Metabolismus mit Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung, sodass es durch den ATP-Mangel zu einer zellulären energetischen Krise mit nachfolgendem Untergang der Zelle kommt (Fatokun et al. 2014). Zusätzlich wird durch Katalyse großer Mengen des Polymers PAR die Freisetzung von AIF (*apoptosis-inducing factor*) aus dem Mitochondrium bewirkt. Durch dessen Translokation in den Zellkern initiiert AIF dort die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung, die zum Zelltod führen (Yu et al. 2002). Außerdem kann PARP-1 durch mehrere zusätzliche Signalwege auch zur „klassischen“ Zellnekrose beitragen (Virag et al. 2013, Fatokun et al. 2014). Eine mögliche Begründung, dass die Zelle bei exzessiven DNA-Schäden von Apoptose zu regulierter Nekrose wechselt, findet sich darin, dass dieser Prozess deutlich weniger Energie benötigt (Roos et al. 2016).

PARP ist in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert (Curtin und Szabo 2013). Darin unterscheidet es sich von vielen anderen DNA-Reparaturenzymen, bei denen im Allgemeinen eher der Funktionsverlust oder die Defizienz eines Reparaturenzyms mit onkogenetischen Folgen für die Zelle einhergeht, da auftretende DNA-Schäden nicht mehr suffizient repariert werden und zu Mutationen führen können. PARP hingegen findet sich verstärkt u. a. in Ewing-Sarkomzellen und auch in BRCA-mutierten Ovarialkarzinomen, bei denen die Promoterregion *ETS* des für PARP codierenden Genabschnitts hypomethyliert ist (Newman et al. 2002, Li et al. 2014).

2.4 PARP-Inhibitoren

Die zentrale Rolle von PARP innerhalb der DNA-Schadensantwort bei Einzelstrangbruch- und Basenexzisionsreparatur macht es zu einem vielversprechenden Angriffsort einer gezielten Krebstherapie (engl. *targeted therapy*). Die Entdeckung und das Verständnis seiner Funktion führte zur Entwicklung spezifischer kleinmolekularer PARP-Inhibitoren, die mit der Bindungsstelle seines Cofaktors β -NAD⁺ am katalytischen Zentrum von PARP-1 und PARP-2 interagieren (Lord und Ashworth 2017).

Tumorzellen weisen häufig ein vermindertes Repertoire an funktionsfähigen DNA-Reparaturmechanismen auf. Hinzu kommt, dass sie gleichzeitig durch Mutationen und unkontrollierte Replikation und Transkription stärkerem replikativen Stress als gesunde Körperzellen ausgesetzt sind. Maligne Zellen sind daher besonders stark auf intakte Wege der

DNA-Reparatur angewiesen und reagieren auf deren Beeinträchtigung deutlich anfälliger als gesunde Zellen, die über die volle Kapazität an suffizienten Reparaturmechanismen verfügen (Brown et al. 2017).

Bei der Inhibition von PARP kommt es zu einer Verminderung der zellulären Reparatursfähigkeit von Einzelstrangbrüchen und Basenmutationen der DNA. Folglich können Einzelstrangbrüche persistieren, die während des Replikationsprozesses in der S-Phase der Zelle vermehrt Doppelstrangbrüche verursachen. Zusätzlich besitzen PARP-Inhibitoren die Fähigkeit, PARP-1 auf der DNA „einzufangen“. Durch die Inhibierung der Synthese von PAR-Ketten an sich selbst wird der katalytische Zyklus von PARP unterbrochen und die Lösung des Enzyms von der DNA verhindert. Dies begünstigt aufgrund blockierter Replikationsgabeln die Ausbildung von Doppelstrangbrüchen (Lord und Ashworth 2017). Auch die DNA-Protein-Komplexe, die von PARP zum Ort der Schädigung rekrutiert werden, blockieren in ihrer inaktiven Form die weitere Replikationsmaschinerie, sodass aus den ursprünglichen Einzelstrangbrüchen durch persistierende Replikationsgabeln Doppelstrangbrüche entstehen (Michelena et al. 2018). Mithilfe dieses Mechanismus führen die PARP-Inhibitoren neben der Verhinderung der Reparatur zugleich selbst zu einer direkten Schädigung des Genoms. Damit die Zelle diese zytotoxisch relevanten Schädigungen reparieren kann, werden intakte Reparatorenzyme der homologen Rekombinationsreparatur wie BRCA-1 und BRCA-2 und andere beteiligte Proteine wie ATM benötigt. Beim funktionellen Verlust dieser Enzyme durch Mutation oder Inhibierung können DSB nicht mehr suffizient repariert werden, sodass es zum tumorspezifischen Zelltod kommt. Dies erklärt die Sensibilität BRCA-1/2-mutierter Tumoren auf PARP-Inhibitoren (Pommier et al. 2016, Ledermann et al. 2012).

Die ersten Ansätze einer Therapie mit PARP-Inhibitoren bestanden darin, diese mit DNA-schädigenden Substanzen zu kombinieren, damit die Inhibition der benötigten Reparaturmechanismen deren möglichen Resistenzfaktor aufhebt. Die meisten PARP-Inhibitoren können in verschiedensten Kombinationen mit klassischen Chemotherapeutika und fraktionierter Bestrahlung zu einer Potenzierung antineoplastischer Effekte (engl. *sensitizer*) führen. Sie besitzen allerdings aufgrund ihrer synthetischen Letalität auf Tumorzellen mit defekter HR auch in Einzelbehandlung tumorspezifische toxische Effekte (Curtin und Szabo 2013).

Ewing-Sarkomzellen besitzen hohe endogene Konzentrationen an *PARP-1*-mRNA. Auch die Proteinaktivität von PARP-1 ist in diesen Zellen um ein Vielfaches höher als in vergleichbaren soliden Tumoren wie z. B. dem Osteosarkom (Pishas und Lessnick 2016, Bailey et al. 2019).

Tatsächlich gehört das Ewing-Sarkom zu den fünf Malignomen, in denen die Expression von PARP-1 am höchsten ist (Pishas und Lessnick 2016). Brenner et al. konnten zeigen, dass eine mögliche Begründung der hohen PARP-1-Expression in diesen Tumorzellen in dessen Interaktion mit dem charakteristischen Fusionsprotein EWS-FLI1 liegt. Dieser aberrierende Transkriptionsfaktor steigert die Expression von PARP-1, das dann im Sinne einer positiven Rückkopplung wiederum die transkriptionale Aktivierung von EWS-FLI1 fördert (Brenner et al. 2012). Durch EWS-FLI1 treten in den Zellen allerdings auch vermehrt DNA-Strangbrüche auf, die Ewing-Sarkomzellen besonders abhängig von funktionell intakten Reparaturenzymen wie PARP machen (Brenner et al. 2012). Es konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Expression von EWS-FLI1 und der Sensitivität auf PARP-Inhibitoren beobachtet werden. Daher sprachen Ewing-Sarkomzellen in ungefähr gleichem Ausmaß wie BRCA-defiziente Zellen auf PARP-Inhibitoren an, während gesunde Körperzellen nicht beeinträchtigt wurden (Garnett et al. 2012). Allerdings wurde auch beobachtet, dass die Aktivität von EWS-FLI1 die Bcl-2-Expression erhöht, deren Induktion zu einer gewissen apoptotischen Resistenz der Monotherapie beiträgt und den Bedarf an Kombinationstherapien weiter hervorhebt (Heisey et al. 2019).

2.4.1 Olaparib

Der Wirkstoff Olaparib (AZD-2281, Lynparza®, Strukturformel s. Abb. 2) ist der erste klinisch eingesetzte PARP-Inhibitor zur Behandlung solider Tumoren, der seit dem Jahr 2014 in der EU und in den USA zur Behandlung des Platin-sensitiven Rezidivs eines BRCA-mutierten Ovarialkarzinoms sowie seit 2018 in den USA und 2019 in Europa bei BRCA-Mutationsträgerinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, HER2-negativem Mammakarzinom zugelassen ist (Rolfo et al. 2019). Der von der Firma AstraZeneca entwickelte Wirkstoff weist eine antineoplastische Aktivität gegen eine Vielzahl verschiedenster Tumoren auf. Dazu gehören neben Ovarial- und Mammakarzinomen u. a. auch Endometrium-, Magen- und kolorektale Karzinome, die besonders bei Defekten in anderen Reparaturenzymen wie ATM sensitiv auf Olaparib reagieren (Deeks 2015, Wang et al. 2017). Auch bei Prostatakarzinomen, die Defekte in DNA-Reparaturgenen aufweisen und nicht mehr mittels herkömmlicher Therapie behandelt werden können, konnte durch die Behandlung mit Olaparib eine signifikante antineoplastische Wirkung erzielt werden (Mateo et al. 2015).

Am stärksten sprechen allerdings BRCA-1/2-defiziente Tumorzellen auf Olaparib an, bei denen die homologe Rekombinationsreparatur der auftretenden DSB defekt ist. Olaparib besitzt

außerdem eine gute Wirksamkeit bei Funktionsverlusten anderer an diesem Reparatursprozess beteiligter Proteine, wodurch in Zukunft möglicherweise auch Patienten/-innen mit entsprechenden Gendefekten ähnlich profitieren könnten (Hodgson et al. 2018). Durch die Monotherapie mit Olaparib konnte bei Patientinnen mit HER2-negativen und BRCA-mutierten metastatischen Mammakarzinom das Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung gesenkt und das mediane progressionsfreie Überleben um 2,8 Monate gegenüber der Standardtherapie verlängert werden (Robson et al. 2017). Bei der Behandlung des Platin-sensitiven Rezidivs eines BRCA-mutierten Ovariakarzinoms mit Olaparib als Monotherapie konnte das progressionsfreie Überleben der Erkrankten im Median um 3,6 Monate verlängert werden (Ledermann et al. 2012). Olaparib weist dabei im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie nur geringe Nebenwirkungen auf und wurde generell gut vertragen (Fong et al. 2009). Mögliche Nebenwirkungen treten in Form von Übelkeit und Erbrechen sowie Müdigkeit und Anämien auf (Ledermann et al. 2012). Zurzeit befindet sich Olaparib in einer Vielzahl von klinischen Studien, die den Nutzen bei verschiedenen weiteren Tumorerkrankungen untersuchen, darunter auch bei Ewing-Sarkomen. In einer Phase-II-Studie bei Patienten mit therapierefraktärem Ewing-Sarkom konnte gezeigt werden, dass Olaparib in Einzelbehandlung gut vertragen wurde, aber keine signifikante Verbesserung erbrachte (Choy et al. 2014). In Kombination mit dem Zytostatikum Temozolomid wurde jedoch ein synergistischer Effekt festgestellt, der momentan genauer evaluiert wird (Engert et al. 2015, Casey et al. 2019).

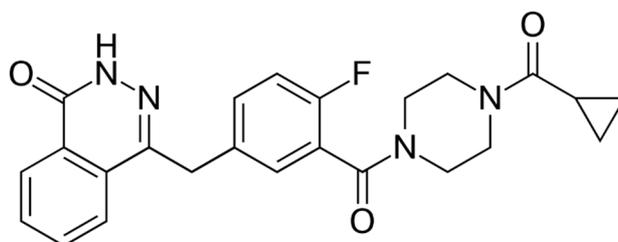


Abb. 2: Strukturformel von Olaparib

2.4.2 Veliparib

Veliparib (ABT-888, Strukturformel s. Abb. 3) ist ein selektiver PARP-Inhibitor, der sowohl PARP-1 ($K_I = 5,2 \text{ nmol/L}$) als auch PARP-2 ($K_I = 2,9 \text{ nmol/L}$) inhibiert und dabei in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine wesentlichen Nebeneffekte auf andere Rezeptoren oder Ionenkanäle aufweist (Wagner 2015). In der Gruppe der bis zum jetzigen Zeitpunkt entwickelten PARP-Inhibitoren stellt dieser Wirkstoff den spezifischsten Inhibitor von PARP-1 und PARP-2 dar (Thorsell et al. 2017). Allerdings scheint bei Veliparib verglichen

mit anderen PARP-Inhibitoren die Fähigkeit, PARP-1 auf der DNA „einzufangen“ und damit DNA-Doppelstrangbrüche zu verursachen, schwächer ausgeprägt zu sein (Murai et al. 2012).

Schon 2007 wurde durch Donawho et al. gezeigt, dass der von der amerikanischen Firma AbbVie Inc. entwickelte Wirkstoff die antineoplastische Wirkung von Zytostatika wie Temozolomid, Cisplatin, Carboplatin und Cyclophosphamid in einer Vielzahl von Tumoren deutlich verstärkt. Dazu gehören Melanome, Lymphome, Kolonkarzinome, Mammakarzinome und Gliome. Von einer Einzelbehandlung ist allerdings kein nennenswerter Effekt auf Karzinome nachweisbar gewesen. Momentan befindet es sich in Phase-II- und Phase-III-Studien zur Behandlung des Ovarialkarzinoms (Slade 2020). Veliparib hat eine gute orale Bioverfügbarkeit und besitzt außerdem die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, sodass ein möglicher therapeutischer Ansatz in Kombination mit Temozolomid zur Behandlung von Hirntumoren besteht (Lok et al. 2017, Donawho et al. 2007). Aufgrund der verhinderten Reparatur von sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüchen der DNA potenziert Veliparib zudem den Effekt fraktionierter Bestrahlung (Donawho et al. 2007). Momentan ist Veliparib der einzige klinisch relevante PARP-Inhibitor, der in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika eine gute Verträglichkeit aufwies (Slade 2020).

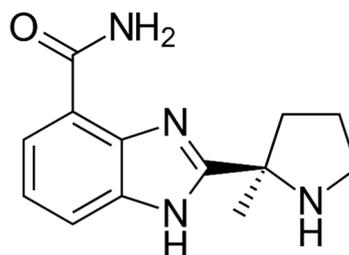


Abb. 3: Strukturformel von Veliparib

2.5 Die Rolle von ATM und ATR bei Schädigung des Genoms

Die beiden Proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated kinase*) und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase*) dienen bei DNA-Doppelstrangbrüchen und blockierten Replikationsgabeln als Sensor des Schadens und leiten komplexe intrazelluläre Signalkaskaden zur Reparatur sowie den Zellzyklusarrest ein (Jackson und Bartek 2009). Beide Enzyme sind Mitglieder der humanen PIKK-Familie (*phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases*), deren sechs Mitglieder als Serin-/Threoninproteinkinasen in einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen eingebunden sind, die von der Regulation der DNA-Schadensantwort über

Proliferation, Metabolismus und Differenzierung der Zelle reichen. Sie weisen eine ähnliche Sequenz zu Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) aus der Gruppe der Transferasen auf (Lempiainen und Halazonetis 2009). ATM und ATR gehören gemeinsam mit der DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), einem weiteren Vertreter der PIKK-Familie, zum Kern der DNA-Schadensantwort und nehmen besonders bei Schädigungsformen, die mithilfe der homologen Rekombination (HR) und der NHEJ sowie der Stabilisierung von blockierten Replikationsgabeln behoben werden, eine zentrale Rolle ein (Alkan et al. 2018). Dabei sind ATM und DNA-PKcs primär an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt, bei freier einzelsträngiger DNA läuft die DNA-Schadensantwort hauptsächlich über ATR ab (Lecona und Fernandez-Capetillo 2018). Außerdem scheinen sie eine wesentliche Funktion in der Rückkopplung der Initiierung des Zelltods innezuhaben (Roos et al. 2016). Trotz Aktivierung bei unterschiedlichem Schaden an der DNA überschneiden sich die ablaufenden Signalwege zum Teil.

Treten in einer Zelle Doppelstrangbrüche auf, wird ATM zusammen mit DNA-PKcs durch den MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex) an die Stelle des Schadens rekrutiert. In seiner inaktiven Form liegt ATM als funktionelles Homodimer vor, das bei der Rekrutierung zu aktiven Monomeren dissoziiert. Diese katalysieren als Reaktion auf den DNA-Schaden die Phosphorylierung von hunderten Substraten, darunter das den DSB flankierende Histon H2AX (oder in phosphorylierter Form γ H2AX genannt), welches seinerseits eine Signalkaskade initiiert, durch die andere Komponenten der DNA-Reparatur aktiviert und an den Ort der Schädigung gebracht werden (Weber und Ryan 2015, Blackford und Jackson 2017). Außerdem bildet ATM einen entscheidenden Faktor bei der Aktivierung des G1/S-Zellzyklus-Kontrollpunkts und verhindert so das Eintreten der Zelle in die S-Phase bei Schädigungen im Genom (Weber und Ryan 2015). Bei Doppelstrangbrüchen phosphoryliert es p53, welches dadurch vor der Ubiquitinierung durch MDM2 geschützt wird (s. Kap. 2.2.3). Auch MDM2 gehört zu den Faktoren, die durch ATM beeinflusst werden (Marine und Lozano 2010). Das so stabilisierte p53 transkribiert daraufhin eine Vielzahl von Genen, die in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, wie z. B. p21. Es kann allerdings auch die durch Caspasen vermittelte Apoptose einleiten (Sullivan et al. 2012). Ein weiteres in die Regulation des Zellzyklus eingebundenes und von ATM aktiviertes Protein ist CHK2, das den Abbau von CDK-25A fördert, welches für die Aktivierung der für den Beginn der S-Phase benötigten Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK-2) sorgt (Weber und Ryan 2015).

ATR wird durch einen Komplex aus RPA (*replication protein A*) und ATRIP (*ATR-interacting protein*) an einzelsträngige DNA gebunden. Diese liegt in der menschlichen Zelle am häufigsten bei blockierten Replikationsgabeln vor, kann aber auch durch DNA-Endresektionen bei Doppelstrangbrüchen auftreten. Durch allosterische Aktivierung verschiedener Proteine phosphoryliert ATR multiple Reparaturenzyme wie beispielsweise BRCA-2, die den Schaden beheben (Lecona und Fernandez-Capetillo 2018). Ein weiteres durch ATR aktiviertes Protein ist CHK1, das mithilfe globaler Signalkaskaden und Modulierung von Proteinen wie CDK-25A den transienten Zellzyklusarrest einleitet (Blackford und Jackson 2017). Trotz der Überschneidung beider Signalwege wird ATR generell als der hauptsächliche Mediator der Intra-S-Phase- und G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunkte angesehen, während der G1-Kontrollpunkt besonders durch ATM beeinflusst wird (Weber und Ryan 2015).

Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im für die Serin-Proteinkinase ATM codierenden Genabschnitt führen beim Menschen zum Krankheitsbild der Ataxia teleangiectasia, auch Louis-Bar-Syndrom oder Boder-Sedgwick-Syndrom genannt. Diese Patienten weisen eine Vielzahl von Symptomen wie Ataxien, Teleangiektasien und eine verminderte Immunkompetenz auf, die u. a. auf einer gestörten Fähigkeit zur Einleitung des Zellzyklusarrests bei DNA-Doppelstrangbrüchen und Hypersensitivität auf ionisierende Strahlung basieren (Bienemann et al. 2011). Daher wurde angenommen, dass spezifische Inhibitoren für ATM oder dessen funktionell ähnliches Enzym ATR die antineoplastischen Effekte einer Chemo- oder Radiotherapie verstärken können (Hickson et al. 2004).

2.6 ATR-/ATM-Inhibitoren

Durch die Reparatur von Beschädigungen im Genom von Tumorzellen können ATM und ATR zu deren Überleben beitragen, besonders da diese Zellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen häufig stärkerem replikativen Stress ausgesetzt sind. Dieser kommt durch eine hohe Mutationsrate und die der regulierten Kontrolle entzogenen Replikation und Transkription zustande. Maligne Zellen sind daher besonders auch auf funktionell intaktes ATM und ATR angewiesen (Blackford und Jackson 2017). Zusätzlich führt die Funktion beider Enzyme zur Wirkungslimitierung DNA-schädigender Substanzen, die als Chemotherapeutika in der Behandlung von Karzinomen eine wesentliche Rolle einnehmen. Die Inhibition von ATM oder ATR führt mithilfe verschiedenster Mechanismen zu einer Erhöhung der genomischen Instabilität, z. B. durch Induktion von Strangbrüchen an blockierten Replikationsgabeln und der Akkumulation von DNA-Schäden durch Verhinderung einer adäquaten Reparatur.

Außerdem hat die Aufhebung einer regulierten Kontrolle und Inaktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte zur Folge, dass Zellen mit persistierenden DNA-Schäden in die S-Phase des Zellzyklus eintreten können, was daraufhin eine mitotische Katastrophe mit p53-unabhängigem Zelltod der beschädigten Zelle auslöst (Lecona und Fernandez-Capetillo 2018, Alkan et al. 2018). Bei Gabe DNA-schädigender Substanzen verstärkt die zusätzliche Inhibition eines der beiden Enzyme deutlich den Zelltod von Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Körperzellen (Charrier et al. 2011, Greene et al. 2017).

In Tumorzellen mit einem hohen Ausmaß an replikativem Stress, zu denen aufgrund der erhöhten basalen Transkriptionslevel durch EWS-FLI1 auch das Ewing-Sarkom gehört, herrscht der Selektionsdruck vor, der genomischen Instabilität entgegenwirken zu können (Nieto-Soler et al. 2016). Genomsequenzierung in Ewing-Sarkomzellen zeigte ein generelles Fehlen von Mutationen in DNA-Reparaturgenen, während der ATM- als auch ATR-Signalweg funktionell intakt bleiben (Pishas und Lessnick 2016). Stattdessen herrschte eine erhöhte Expression von CHK1 vor, das den Zellen offenbar hilft, mit dem zellulären Stress umzugehen (Nieto-Soler et al. 2016). Durch diese hohe Abhängigkeit von einem intakten ATM-/ATR-Signalweg stellen Inhibitoren beider Enzyme eine vielversprechende Möglichkeit zur selektiven Tumorbeeinflussung dar, besonders auch in der Erprobung eines Therapieansatzes beim Ewing-Sarkom (Lecona und Fernandez-Capetillo 2018, Gaillard et al. 2015). Ewing-Sarkomzellen haben sich als hochsensitiv gegenüber ATR-Inhibitoren erwiesen (Nieto-Soler et al. 2016).

2.6.1 ATR-Kinaseinhibitor VE-821

Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren gegen ATR gestaltete sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit seines aktiven Zentrums zu anderen Enzymen der PIKK-Familie und der eine Strukturanalyse erschwerenden Größe des Proteins zunächst langwierig (Lecona und Fernandez-Capetillo 2018). Der ATP-kompetitive ATR-Inhibitor VE-821 (Strukturformel s. Abb. 4) gehört zu der ersten Gruppe wirklich kompetenter und spezifischer ATR-Inhibitoren, die entwickelt wurden. Er besitzt mit einer K_I von 13 nM für ATR eine exzellente Selektivität und weist nur eine minimale Kreuzreaktivität zu anderen Kinasen der PIKK-Familie wie ATM, DNA-PKcs, mTOR und Phosphoinositol-3-Kinase- γ auf (Reaper et al. 2011). VE-821 hat in vielen *in vitro* Studien in unterschiedlichen Tumorzelllinien einen starken synergistischen Effekt mit multiplen verschiedenen genotoxischen Wirkstoffen gezeigt, während bei der Behandlung an normalen Körperzellen nur eine sehr geringe Zytotoxizität bei reversiblen

Zellzyklusarrest ohne signifikante Erhöhung des Zelltods auftrat (Salovska et al. 2014, Josse et al. 2014, Huntoon et al. 2013, Reaper et al. 2011).

Besonders in Kombination mit DNA-vernetzenden Substanzen wie Cisplatin wurde ein starker Effekt beobachtet. Zusätzlich wurde dieser durch den funktionellen *Knockdown* der p53-Genexpression, durch ATM-Defizienz oder durch gleichzeitige Gabe des ATM-Inhibitors KU-55933 (s. u.) potenziert (Reaper et al. 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff VE-821 Tumorzellen auch in starker Hypoxie und in verschiedensten Sauerstoffkonzentrationen für ionisierende Strahlung sensibilisiert. Hypoxische Tumorzellen weisen im Allgemeinen eine stärkere Resistenz gegen Chemotherapie auf, sodass die Hypoxie stets ein großes Hindernis für eine suffiziente Behandlung dargestellt hat (Pires et al. 2012). Die beiden ATR-Inhibitoren VE-822, das ein Analogon von VE-821 mit gesteigerter Wirksamkeit und verbesserter Bioverfügbarkeit darstellt, und AZD6738 befinden sich zurzeit in verschiedenen präklinischen Studien (Thomas et al. 2018).

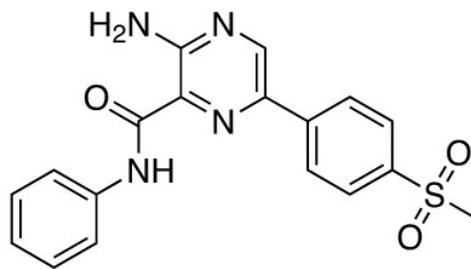


Abb. 4: Strukturformel von VE-821

2.6.2 ATM-Kinaseinhibitor KU-55933

Der Wirkstoff KU-55933 (Strukturformel s. Abb. 5) ist der erste hochselektive ATM-Kinaseinhibitor, der entwickelt wurde. Durch die Hemmung der Serinproteinkinase ATM mit einer K_i von 2,2 nM führt er in malignen Zellen zu einer Sensibilisierung gegenüber ionisierender Strahlung und DNA-schädigenden Zytostatika wie Doxorubicin oder Etoposid. Außerdem tritt bei diesen Zellen ein Verlust des Eintritts in den Zellzyklusarrest auf, der sonst durch ionisierende Strahlung ausgelöst wird. KU-55933 ist hochspezifisch für ATM und weist keine Kreuzreaktivität zu anderen Kinasen der PIKK-Familie auf (Hickson et al. 2004, Weber und Ryan 2015).

Um die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit des noch stark lipophilen KU-55933 zu verbessern, wurde die Kernstruktur des Wirkstoffes weiter überarbeitet, sodass in der Folge der ATM-Inhibitor KU-59403 mit verbesserter Löslichkeit entwickelt werden konnte.

Dieser Wirkstoff wurde als erster berichteter ATM-Inhibitor *in vivo* bei Mäusen eingesetzt, wo er eine gute Gewebeverteilung zeigte und in Dosen, die sich in Einzelbehandlung als nicht toxisch herausstellten und in Kombinationsbehandlung gut vertragen wurden, die zytotoxische Wirkung von Topoisomerase-Inhibitoren in humanen Kolonkarzinom-Xenografts signifikant verstärkte. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Chemo- und Radiosensibilisierung der ATM-Inhibierung nicht p53-abhängig war (Batey et al. 2013).

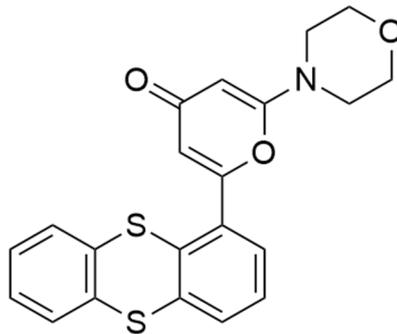


Abb. 5: Strukturformel von KU-55933

3 Zielstellung der Arbeit

Im Zuge der Evaluierung möglicher zielgerichteter Therapien gegen Ewing-Sarkomzellen wurde deren Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren wie Olaparib und ATR- oder ATM-Inhibitoren beschrieben, die allerdings in jeweiliger Monotherapie eine unzureichende Wirksamkeit für die suffiziente Behandlung des Ewing-Sarkoms zu besitzen scheinen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen der Kombinationsbehandlung mit PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren auf Ewing-Sarkomzellen *in vitro* zu untersuchen. Dabei standen antineoplastische Wirkungen wie Zelltod und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials besonders im Vordergrund, die mittels der Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Insbesondere sollte ein möglicher Synergismus im Sinne einer synthetischen Letalität durch die Kombinationsbehandlung mit PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren aufgedeckt werden. Dafür wurden die drei Ewing-Sarkomzelllinien A673, WE-68 und SK-ES-1 mit jeweils unterschiedlichem p53-Status eingesetzt und ihr Verhalten auf die Kombinationsbehandlung verglichen, um mögliche Rückschlüsse der zellulären Effekte auch hinsichtlich des prognostisch wichtigen Ereignisses eines Verlusts oder der Mutation des *TP53*-Gens ziehen zu können. Ergänzend wurde eine Versuchsreihe mit der p53-Null-Osteosarkomzelllinie SaOS-2 zum Vergleich der Ergebnisse mit denen eines anderen Knochentumors durchgeführt.

Außerdem sollten die intrazellulären Vorgänge und Veränderungen beschrieben werden, die durch die jeweiligen Einzel- und Kombinationsbehandlungen in den Ewing-Sarkomzellen auftraten. Um eine mögliche Einleitung der Apoptose durch die Behandlung aufzudecken, wurde der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk eingesetzt und die Aktivität der Caspase-3 bestimmt. Mithilfe der Echtzeit-RT-PCR wurden quantitative Veränderungen der Genexpression durch die Einzel- und Kombinationsbehandlung aufgedeckt und intrazelluläre Veränderungen der Proteinkonzentrationen mittels Western Blots detektiert. Zusätzlich wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, um Veränderungen im Zellzyklus durch die Behandlung darzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu dienen, einen genaueren Einblick in das Verhalten von Ewing-Sarkomzellen auf die Behandlung mit PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren zu erhalten, um mithilfe dieser Erkenntnisse vielleicht eine neue Möglichkeit bieten zu können, alternative Therapiestrategien zur Behandlung des Ewing-Sarkoms zu erschließen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Die unten aufgeführten Materialien und Reagenzien wurden über die Universitätsapotheke Jena oder unmittelbar von den in Tab. 2 und Tab. 3 jeweilig genannten Herstellern bezogen.

4.1.1 Zelllinien

Tab. 1: Verwendete Zelllinien mit den jeweiligen Eigenschaften

	WE-68	A673	SK-ES-1	SaOS-2
Typ	Humane Ewing-Sarkom-Zellen			Humane Osteosarkom-Zellen
p53-Status	p53-Wildtyp ^{1,2}	p53-Null ¹	p53-Mutation ^{1,2}	p53-Null ¹
Morphologie	Adhärente Zellen			
Inkubation	37 °C; 5 % CO ₂			
Benötigtes Medium	<ul style="list-style-type: none"> > RPMI-1640 Medium (mit stabilem Glutamin) > 10 % FKS > Penicillin G 100 units / ml > Streptomycin 0,1 mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> > DMEM mit 4,5 g/l Glucose > 10 % FKS > Penicillin G 100 units / ml > Streptomycin 0,1 mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> > RPMI-1640 Medium (mit stabilem Glutamin) > 10 % FKS > Penicillin G 100 units / ml > Streptomycin 0,1 mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> > McCoy's 5A > 15 % FKS > 1,2 % Glutamin (6 ml) > Penicillin G 100 units / ml > Streptomycin 0,1 mg/ml
Herkunft	Dr. F. van Valen, Münster	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig		
Abstammung	Weibliche 19-jährige Patientin, Lokalisation: Fibula ¹	Weibliche 15-jährige Patientin, Muskelgewebe ¹	Primärtumor eines 18-jährigen männlichen Patienten ¹	Primärtumor einer 11-jährigen weiblichen Patientin ¹
Besonderheit	Wachstum nur auf kollagenbeschichteten Materialien			Kollagenbeschichtung nicht nötig
Trypsinierungszeit	5 min	10 min	10 min	10 min
Verwendete Well-Platten	12-Well-Platten	6-Well-Platten	12-Well-Platten	6-Well-Platten

¹ Ottaviano et al. 2010; ² Sonnemann et al. 2015

4.1.2 Geräte und Materialien

Tab. 2: Verwendete Geräte und Materialien

Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific Wertheim
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences
Cellstar® Kulturflaschen 25/75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10/25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Zellkulturplatten, 6/12/96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips Plus 0,5/10,0/25,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Cryo.s™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser (plan geschliffen)	Fisher Scientific, Schwerte
Eisbereiter SPR 80	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen
Eppendorf BioPhotometer® / Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
Filterpipettenspitzen Clearline® low binding filter tips 1-20 µl/100 µl/1.000 µl	Biosigma, Venedig, Italien
FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Kühlschrank, Gefrierschrank FACS-Labor	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, Gefrierschrank Lagerraum	Robert Bosch GmbH München
Kühlschrank, Gefrierschrank Zellkulturlabor	Liebherr-International Deutschland GmbH
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Meliseptol® rapid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MicroAmp, optische Klebefolie	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop DMLB	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop Leica	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Laboratory & Medical Supplies
Mikrozentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
Optische 96-Well-Reaktionsplatte	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Optisches Bedeckungsdruckpolster (Cover Compression Pads)	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteur-Pipetten 150mm + 230mm	Hecht-Assistent, Sondheim v. d. Rhön
PCR Workstation	VWR international, Wien
PCR-Gerät 7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten Eppendorf Reference 0,5-10, 10-100, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10/100/1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Plattenzentrifuge	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PS-Röhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Safe Lock Tubes 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Serum Pipette steril, 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
S-Monovette Rack D13 + D17	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Thermo scientific S2020 1.2 Sterilwerkbank	Thermo Electron LED GmbH Langensfeld
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Ultraschall Reiniger 20 HC	EMAG AG Deutschland
Ultratiefkühlschrank -86 °C Forma 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach
Wasserbad GFL	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zellzähler Counter AC-15	Karl Hecht AG
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich AG, Tuttlingen

4.1.3 Reagenzien, Kits, Medien, Puffer und Software

Tab. 3: Verwendete Reagenzien, Kits, Medien, Puffer und Software

Ac-DEVD-AMC (fluorogenes Substrat Caspase-3-Aktivitätsmessung)	Bachem, Weil am Rhein
Ampuwa® 10 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
BD FACSDiva™ Software	Auswertung der Durchflusszytometrie
BioWhittaker™ DMEM	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ McCoy's 5A Medium	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ PEN-STREP 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 U/ml Streptomycin	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ Trypsin EDTA 10x	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker™ Trypsin EDTA 1x	Lonza, Vieviers, Belgien
Caspase-Lysepuffer (pH 7,5)	Eigene Arbeitsgruppe
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
DiOC ₆ (3) (3'3'- Dihexyloxycarbocyaniniodid), Endkonzentration: 50 nM	Molecular Probes
DNase I Digest Kit	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
DTT (Dithiothreitol)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, Kalifornien, USA
Ethanol, >99,8 %ige Reinheit	J.T. Baker, Radnor, Pennsylvania, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KU-55933, Stammlösung 10 mM	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Lyophilisat aus Rattenschwanzkollagen	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
MARS Data Analysis Software	Auswertung der Caspase-3-Aktivität
Microsoft Excel 2016 Software	Statistische Auswertung
Microsoft PowerPoint 2016 Software	Graphiken-Erstellung
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Olaparib	LC Laboratories, Woburn, USA
Omega Software	Photometrische Messung der Caspase-3-Aktivität
Omniscrypt RT Kit mit dNTP-Mix, RT-Puffer, Omniskript-RT, RNase-Out und RNase-freiem Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden
Origin 2019 Software	Graphische Auswertung
peqGOLD Total RNA Kit RNA-Lysepuffer, Waschpuffer I + II, Säulen	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
Phosphataseinhibitor Phosstop	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
Propidiumiodid, Stammlösung: 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor complete ultra tablets	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
Random Hexamers	QIAGEN GmbH, Hilden
Ribonuclease-A (RNase-A)	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
RNaseOUT, Ribonukleaseinhibitor	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SDS 2.2.2.2	Messung und Auswertung der TaqMan®-PCR
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TRIS Ultra	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
VE-821, Stammlösung 20 mM	Selleckchem Deutschland, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Christian Marx, FLI Jena
Veliparib	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

4.1.4 TaqMan-Sonden

Alle Sonden wurden von ThermoFisher Scientific bezogen.

Tab. 4: Verwendete Primer-Sonden für die RT-PCR

ATR	Hs00992123_m1
BAX	Hs00180269_m1
BBC3 (PUMA)	Hs00248075_m1
BCL2L11 (BIM)	Hs00708019_s1
BRCA-1	Hs01556193_m1

CDKN1A (p21)	Hs00355782_m1
EWS-FLI1	Hs03024497_ft
MDM2	Hs00242813_m1
PMAIP1 (NOXA)	Hs00560402_m1
TP53	Hs01034249_m1

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultivierung

Für die Zellkulturen wurden die unter Tab. 1 aufgeführten Zelllinien mit jeweils gekennzeichneten unterschiedlichen Kulturmedien und Trypsinierungszeiten verwendet. Sonstige Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien in der Durchführung der experimentellen Arbeiten wie z. B. notwendige Zellzahlen bei der Aussaat der Zellen sind im Folgenden stets aufgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden durchgehend unter sterilen Bedingungen an der Werkbank durchgeführt.

4.2.2 Anlegen der Zellkulturen

Die verwendeten Zelllinien wurden in mehreren Aliquots mit 75 % des jeweiligen gefrorenen Mediums, 20 % FKS und 5 % DMSO als Kryoprotektivum bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Anlegen einer Zellkultur wurde ein Aliquot entnommen, zügig im Wasserbad bei 37 °C unter ständigem Schwenken des Tubes aufgetaut und in 15 ml des jeweils benötigten Mediums überführt. Anschließend musste die Suspension bei Raumtemperatur und 1200 U/min für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in eine 25 cm²-Kulturflasche mit 20 ml des vorgewärmten Mediums eingebracht werden. Die Zellkultur wurde im Kulturschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Je nach Zellzahl und Konfluenz der Zellen bestand die Möglichkeit, die Kultur schon in der folgenden Zellpassage in 75 cm²-Kulturflaschen fortzuführen. Ab der 3. Zellpassage konnten die Zellen für Experimente genutzt werden.

4.2.3 Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen und Well-Platten

Um das Zellwachstum der drei verschiedenen Ewing-Sarkomzelllinien auf der Oberfläche der Kulturflaschen und Well-Platten zu gewährleisten, musste diese zunächst mit Kollagen beschichtet werden. Für dieses Verfahren wurden 10 mg steriles Lyophilisat aus Rattenschwanzkollagen in 500 ml 0,1 %iger Essigsäure gelöst. Nach 24 h wurde diese Lösung auf die benötigten Kulturflaschen und Well-Platten verteilt. Hierbei wurden in eine 75 cm²-

Kulturflasche 18 ml, in eine 25 cm²-Kulturflasche je 6 ml und außerdem in sowohl 6-Well- als auch 12-Well-Platten jeweils 1 ml pro Well gegeben. Zur Anlagerung des Kollagens auf die Oberfläche der Materialien wurde die Kollagen-Essigsäure-Lösung unter sterilen und erschütterungsfreien Bedingungen für mindestens 24 h in den Kulturflaschen und Well-Platten belassen, bevor sie dann mit einer Absaugvorrichtung entfernt wurde. Nach dem Abwarten der Lufttrocknung mit vollständigem Verschwinden der Flüssigkeit konnten die Kulturflaschen und Well-Platten steril verpackt und bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.2.4 Passagieren der Zellen

Für jede einzelne Zelllinie wurde im Abstand von abwechselnd drei und vier Tagen eine Überführung in eine neue Zellkulturflasche vorgenommen. Vor Beginn der Passage wurde das bei 8 °C gelagerte Medium, PBS und Trypsin im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zunächst wurde das vorhandene Medium vollständig aus der Kulturflasche entfernt und diese danach zweimal mit je 10 ml des vorgewärmten PBS gewaschen. Damit die adhärennten Zellen sich von der Oberfläche lösten, mussten 2,5 ml 1x Trypsin EDTA in die Flasche gegeben und die Zellen mit der jeweilig in der Tab. 1 angegebenen unterschiedlich langen Trypsinierungszeit bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden. Nach vorsichtigem Beklopfen und mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Ablösung aller Zellen von der Oberfläche wurden dann zunächst 7 ml Medium hinzugegeben und die Zellen durch stetiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach weiterer Zugabe von 10 ml Medium folgte dann die Zentrifugation der Zellsuspension bei 1800 rpm für 5 min. Auf das Zellpellet wurden zunächst 3 ml Medium gegeben, die Zellen resuspendiert und dann je nach Größe des ursprünglichen Pellets 9 - 12 ml des Mediums zur Verdünnung hinzugegeben.

Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau:

Für die Bestimmung der Zellzahl folgte die Entnahme von 20 µl der Zellsuspension. Unter Zugabe von 20 µl Trypanblau wurde die Suspension gevortext, anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und die Zellen mikroskopisch in zwei diagonal gegenüberliegenden großen Quadraten ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Trypanblau ergab sich die Zellzahl nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} = \text{Zellen pro ml}$$

Durch die Aufnahme von Trypanblau in abgestorbene Zellen und daraus resultierender Anfärbung konnte zudem zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl aller vorhandenen Zellen}} * 100 \% = \text{Zellvitalität}$$

Unter Beachtung der Vitalität wurden die Zellen nach der Zellzählung in eine neue Kulturflasche mit 20 ml des benötigten Mediums überführt. Aufgrund von Unterschieden in morphologischen Eigenschaften wie Zellgröße, -teilungsrate und -konfluenz der einzelnen Zelllinien waren verschiedene Zellzahlen vonnöten, die in Tab. 5 aufgeführt sind.

Tab. 5: Verwendete Zellzahlen für die Aussaat in 75 cm²-Kulturflaschen bei der Zellpassage

	A673	WE-68	SK-ES-1	SaOS-2
3-Tages-Turnus	1,4 * 10 ⁶ /ml	3,2 * 10 ⁶ /ml	2,5 * 10 ⁶ /ml	1,5 * 10 ⁶ /ml
4-Tages-Turnus	1,2 * 10 ⁶ /ml	2,2 * 10 ⁶ /ml	1,5 * 10 ⁶ /ml	1,0 * 10 ⁶ /ml

4.2.5 Anlegen der Well-Platten

Für geplante Versuche wurden die Zellen im Rahmen der jeweiligen Zellkulturpassage 24 h vor der Behandlung mit den einzelnen Wirkstoffen in Well-Platten ausgesät. Dabei sind je nach Zelllinie unterschiedliche Zellzahlen für die Well-Platten verwendet worden, die aufgrund unterschiedlicher Größe und Konfluenz der einzelnen Zelllinien und unterschiedlichen Versuchsanforderungen im Vorfeld festgelegt wurden und in der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt sind. Die Zellsuspension wurde nach Bestimmung der Zellzahl mit dem jeweiligen Medium in einem 50 ml-Röhrchen nach Berechnung verdünnt, sodass die für die Versuche benötigte Zellzahl erreicht wurde. Danach wurde per Multipipette in die kollagenbeschichteten 6-Well-Platten der A673 und SaOS-2 pro Well zunächst 1 ml vorgewärmtes Medium und anschließend 1 ml der Zellsuspension hinzugegeben. Hinsichtlich des kleineren Volumens der kollagenbeschichteten 12-Well-Platten der WE-68 und SK-ES-1 wurde direkt 1 ml der Zellsuspension je Well pipettiert. Anschließend kam es für einen Zeitraum von 24 h zur Inkubation der Kulturplatten im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit.

4.2.6 Behandlung der Zellen / Wirkstoffapplikation

Im Rahmen der experimentellen Versuche wurden die Zellen 24 h nach dem Anlegen der Wells mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt. Um die benötigten unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe zu erreichen, mussten für die einzelnen Versuche

Verdünnungsreihen angefertigt werden. Die verwendeten Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt und sind in der Beschreibung der einzelnen Methoden angegeben.

4.2.7 Ernten der Zellen

Um die adhärennten Zellen für die Versuche nutzen zu können, mussten die Zellen im Rahmen der Zellernte stets von der Oberfläche der Well-Platten abgelöst werden. Für alle durchflusszytometrischen Messungen (Messung des Zelltods, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Hemmung der Apoptose durch z-VAD-fmk und Zellzyklusanalyse) wurde die Zellernte wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Auch bei den anderen verwendeten Messmethoden waren die einzelnen Schritte der Zellernte und deren Reihenfolge stets gleich, abweichende Konzentrationen der verwendeten Materialien sind ansonsten bei der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt.

Für die Zellernte wurden zunächst die Überstände in den Wells mit einer Pipette abgezogen, in FACS-Röhrchen überführt und jedes Well mit 1 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, das daraufhin ebenfalls in FACS-Röhrchen gegeben wurde. Anschließend wurden in jedes Well einer 6-Well-Platte 500 µl und in jedes Well einer 12-Well-Platte 250 µl einer 1 : 10 mit PBS verdünntem Trypsin-Lösung pipettiert und die Zellen für die Dauer der jeweiligen Trypsinierungszeit (s. Tab. 1) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zunächst die vollständige Ablösung der Zellen von der Oberfläche durch das Mikroskop kontrolliert, bevor die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit 1 ml PBS vereinzelt und in das jeweilige FACS-Röhrchen gegeben wurden. Jedes Well wurde danach nochmals mit 1 ml PBS gewaschen und der Inhalt dann ebenfalls in das FACS-Röhrchen überführt, um etwaige verbliebene Zellen aus den Wells zu entfernen.

4.2.8 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie, umgangssprachlich auch FACS-Analyse (engl. *fluorescence-activated cell sorting*) genannt, erlaubt die Analyse vieler intrazellulärer Vorgänge in Zellpopulationen, darunter auch vieler Vorgänge, die durch die Wirkstoffbehandlung bestimmt werden sollten.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Messung eines optischen Signals, das eine Zelle oder exakt ausgedrückt ein Partikel aussendet, wenn dieser einen oder mehrere monochromatische Laserstrahlen passiert. Zunächst werden die Zellen mithilfe einer hydrodynamischen Fokussierung vereinzelt und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom

hintereinander („perlschnurartig“) durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Dieser Lichtstrahl wird durch die vorbeifließenden Zellen abgelenkt (Tyndall-Effekt) und das hierbei entstehende Streulicht durch einen Detektor ausgewertet. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Zellgröße und der Komplexität ihrer Strukturen. Quantitativ kann sowohl das sich proportional zur Zellgröße verhaltende Vorwärtsstreulicht (FSC; engl. *forward scatter*) als auch das sich proportional zur Zellgranularität verhaltene Seitwärtsstreulicht (SSC; engl. *side scatter*) bestimmt werden. Durch Kombination von FSC und SSC besteht damit die Möglichkeit, eine Differenzierung von Zelltypen in heterogenen Proben vorzunehmen (s. Abb. 6).

Zusätzlich kann man die Zellen mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Bei Passage des monochromatischen Laserstrahls absorbieren diese Moleküle Lichtenergie in einer für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlänge, die dessen Absorptionsmaximum entspricht. Die angeregten Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch die Absorption auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach Verlassen des Laserstrahls springen die Elektronen unter Abgabe der eben aufgenommenen Energie mittels Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Die so emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Sensor registriert werden kann, verhält sich proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochromen innerhalb der Zelle. Durch mehrere hintereinandergeschaltete Laser und auch mehrere Fluoreszenzfarbstoffe können so multiparametrische Korrelationen dargestellt werden.

4.2.8.1 Messung des Zelltods und des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$

Mithilfe der Durchflusszytometrie können der Zelltod und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ bestimmt werden.

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der nur von Zellen mit gestörter Membranintegrität oder perforierter Zellmembran aufgenommen wird. Auf diese Weise kann PI zur Diskriminierung der Zellviabilität beitragen, da er von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird, sondern nur in toten oder perforierten Zellen in die doppelsträngige DNA interkaliert. Bei Einlagerung in die DNA besitzt PI ein Absorptionsmaximum bei 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 617 nm, außerdem nimmt seine Fluoreszenzintensität um das 20- bis 30-fache zu.

Bei vitalen Zellen und intakten Mitochondrien besitzen die Mitochondrien ein negativ geladenes Transmembranpotential $\Delta\Psi_m$, das durch Enzyme der Atmungskette gebildet wird. Durch starken Zellstress bzw. die Einleitung der Apoptose kann die mitochondriale

Doppelmembran allerdings ihre Integrität verlieren und permeabel werden, wodurch es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt.

Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid) kann die Zellmembran überwinden und sich aufgrund seiner positiven Ladung selektiv in Mitochondrienmembranen mit intaktem $\Delta\Psi_m$ anlagern. Verliert die Zelle allerdings durch bestimmte Prozesse die mitochondriale Integrität und damit das mitochondriale Membranpotential, kann kein DiOC₆(3) mehr angelagert werden. Somit akkumuliert dieser lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoff nur in Zellen mit intaktem $\Delta\Psi_m$, während er Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nicht anfärbt. Dadurch ist er ein idealer Indikator für Zellstress und drohenden oder bereits eingetretenen Zelltod. Das Absorptionsmaximum von DiOC₆(3) befindet sich bei 484 nm und das Emissionsmaximum bei 501 nm.

4.2.8.2 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messungen

Da sich die beiden Fluoreszenzspektren der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe überschneiden, können ohne präzise Kompensation Signaldetektionen im Kanal des jeweils anderen Fluorochroms auftreten und so durch falsch positive Ereignisse zuverlässige und exakte Aussagen der Messungen verhindern. Daher mussten diese Überschneidungen der beiden Fluoreszenzspektren vor Beginn der Messungen ermittelt und anschließend abgezogen werden. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet. Hierfür wurden vor dem ersten Versuch jeder am Durchflusszytometer gemessenen Zelllinie zusätzlich jeweils drei Wells zu gleichen Bedingungen und Zellzahlen wie den Experimenten angelegt, allerdings ohne diese am nächsten Tag zunächst mit Wirkstoffen zu behandeln. In eines der drei Wells wurde 45 min vor der Ernte unter Lichtschutz 1 μ l DiOC₆(3) pro ml Medium gegeben. Im Anschluss folgte die Zellernte wie in Kap. 4.2.7 angegeben sowie die Vorbereitung der Messung am Durchflusszytometer. In das zweite der drei Kompensation-Wells wurde zur definitiven Abtötung der Zellen vor der Messung 55 μ l 0,5 %iges Triton X-100 und nach kurzer Wartezeit 1 μ l PI hinzugegeben, das sich in der DNA der abgetöteten Zellen interkalierte. Das letzte Well diente als Negativkontrolle ohne sonstige Behandlung zur Feststellung der durchflusszytometrischen Eigenschaften der jeweiligen zu untersuchenden Zellpopulation. Nach der Messung der drei Wells und Anpassung der Gates (FSC, SSC und Fluoreszenzintensität von PI und DiOC₆(3)) konnte die benötigte Kompensation errechnet und angewandt sowie daraufhin mit den experimentellen Messungen begonnen werden.

Vor Beginn der Messungen am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II erfolgte die Anlage eines entsprechenden Experiments, in das die errechnete Kompensation eingefügt und drei Dotplots eingetragen wurden, in denen die vom Gerät registrierten Ereignisse als Punkte registriert werden konnten. In diesen Dotplots wurden FSC gegen SSC, FSC gegen PI und FSC gegen DiOC₆(3) aufgetragen. Zusätzlich wurde je ein Histogramm mit DiOC₆(3) gegen PI bzw. die Zellzahl angelegt. Die registrierten Ereignisse mussten durch Fenster (sogenannte Gates) separiert werden, um Verfälschungen des Ergebnisses durch Zellkonglomerate und Zelldetritus zu vermeiden (s. Abb. 6). Pro Probe wurden dann am Durchflusszytometer 10.000 Ereignisse ausgewertet. Außerdem musste am Anfang jeder FACS-Messung eine Kalibrierung des Durchflusszytometers mithilfe der BD Cytometer Setup & Tracking Beads™ vorgenommen werden.

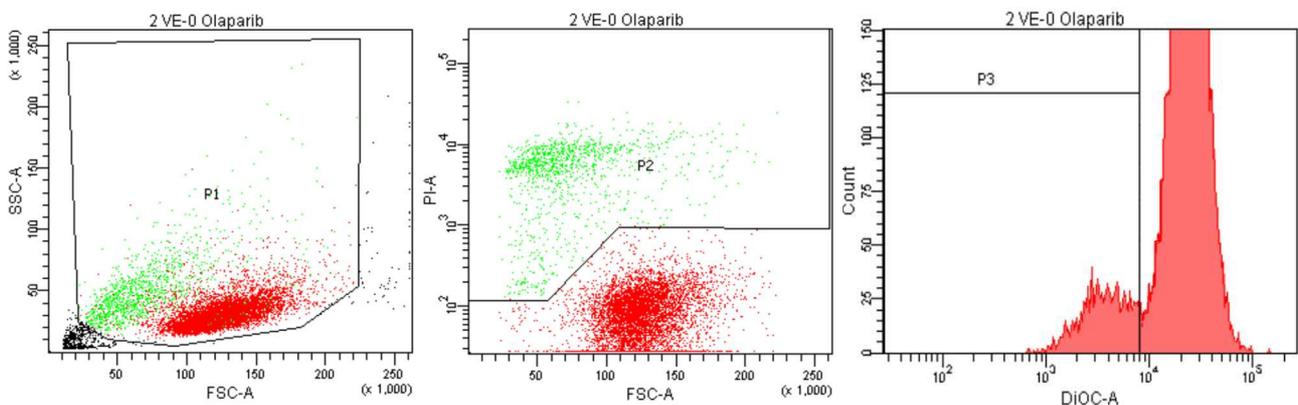


Abb. 6: Dotplots zur Auswertung der FACS-Messungen, beispielhaft an einer Probe der Zelllinie A673 abgebildet. Das erste Gate P1 zeigt die zu untersuchenden Zielzellen; das zweite Gate P2 den Anteil derjenigen Zellen, die PI aufgenommen haben; das Gate P3 stellt in dieser Probe im linken Bereich des Gates den Anteil derjenigen Zellen mit Verlust des $\Delta\Psi_m$ dar.

4.2.8.3 Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen

Für die WE-68- und SK-ES-1-Zelllinien wurden kollagenbeschichtete 12-Well-Platten mit 150.000 Zellen/Well in 1 ml Medium und für die A673- und SaOS-2-Zellen 6-Well-Platten mit 100.000 Zellen/Well in 2 ml Medium angelegt. Bei der Wirkstoffapplikation, die 24 h nach Anlegen der Well-Platten erfolgte, wurden je nach Zelllinie verschiedene Konzentrationen verwendet (s. Tab. 6). Die Wirkstoffe VE-821 und KU-55933 lassen sich aufgrund ihrer Lipophilie nur mit DMSO verdünnen, das zytotoxisch wirken kann. Um Verfälschungen beim Ergebnis zu vermeiden, wurde daher zum Ausgleich die gleiche Menge des zur Verdünnung verwendeten DMSO zur Kontrollreihe hinzugegeben.

Tab. 6: Verwendete Konzentrationen der Wirkstoffe bei den durchflusszytometrischen Messungen

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (μM)			
		A673	WE-68	SK-ES-1	SaOS-2
Olaparib	PARP-Inhibitor	1 / 5 / 10 / 20 / 40	0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25	0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4	1 / 5 / 10 / 20 / 40
Veliparib	PARP-Inhibitor	5 / 10 / 20 / 40 / 100	1 / 2 / 5 / 10 / 20	1 / 2 / 5 / 10 / 20	-
VE-821	ATR-Inhibitor	2 / 5	0,2 / 0,4 / 1,5	5 / 10	2 / 5
KU-55933	ATM-Inhibitor	10 / 15	5 / 10	-	-

Die verwendeten Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt. Olaparib und Veliparib wurden mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 und KU-55933 mit DMSO. In den Versuchen wurden verschiedene Kombinationen der Hemmstoffe untereinander untersucht, s. Ergebnisteil der Arbeit.

Exakt 45 min vor Beginn der Zellernte der für die Messung des Zelltds und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials vorgesehenen Wells wurden zu diesen unter Lichtschutz jeweils 1 μl DiOC₆(3) pro ml Medium hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben wieder im Brutschrank inkubiert. Nach dem Zeitraum von 48 h nach der Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Wirkstoffen wurden die Well-Platten wie Kap. 4.2.7 dargestellt geerntet. Weiterhin wurden die FACS-Röhrchen nun bei 1800 rpm bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 μl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden fortan in einer mit Eis gefüllten Wanne aufbewahrt. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurde in jedes Röhrchen 1 μl PI hinzugegeben, der Inhalt gevortext und für mindestens 30 sec gewartet. Schließlich konnten die FACS-Röhrchen in die Messvorrichtung des Durchflusszytometers eingesetzt werden und mit dem Messvorgang begonnen werden. Die Versuche mit den Fluorochromen PI und DiOC₆(3) erfolgten zeitgleich und wurden später simultan am Durchflusszytometer ausgewertet.

4.2.9 Bestimmung des synergistischen Effekts mittels Kombinationsindexanalyse

In der Pharmakologie wird Synergie als ein überadditiver Effekt beim Zusammenwirken von zwei oder mehr Wirkstoffen bezeichnet, der zu einer deutlich größeren Wirkung führt, als die isolierte Anwendung der Einzelsubstanzen erwarten lässt. Zur quantitativen Bestimmung des Synergismus und Antagonismus bei der gleichzeitigen Gabe verschiedener Hemmstoffe wurde der im Jahr 1984 von Chou und Talalay eingeführte Kombinationsindex („combination index“, CI) verwendet, der heute die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung eines möglichen Synergismus darstellt (Chou und Talalay 1984, Chou 2006).

Schon 1976 hatte Chou mithilfe mathematischer Deduktion die Medianeffektgleichung („median effect equation“) entwickelt, die auf den vier bedeutsamen Gleichungen nach Henderson-Hasselbach, Hill, Michaelis-Menten und Scatchard beruht und diese vereint.

Die generelle Medianeffektgleichung nach Chou kann für einen Inhibitor folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m$$

Hierbei bezeichnet f_a den Anteil durch den Inhibitor beeinflusster Enzyme, f_u den unbeeinflussten Anteil dieser Enzyme, der in der Dosis bzw. Konzentration D vorhanden ist ($f_u = 1 - f_a$). D_m ist die Mitteleffektdosis (z. B. IC_{50} , ED_{50} oder LD_{50}), die durch den Wirkstoff erreicht werden kann; m stellt zudem einen Koeffizienten für die Form der Dosiswirkungskurve dar, wobei $m = 1$ einen hyperbolischen, $m > 1$ einen sigmoidalen und $m < 1$ einen flachsigmoidalen Verlauf angibt. Durch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Inhibitoren kann diese Gleichung erweitert werden. So gilt für zwei vorhandene Substanzen mit $m = 1$:

$$\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} = \frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} + \frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} = \frac{D_1}{(D_m)_1} + \frac{D_2}{(D_m)_2}$$

Wenn $m \neq 1$, gilt stattdessen:

$$\left[\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{1/m} = \left[\frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{1/m} + \left[\frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{1/m} = \frac{D_1}{(D_m)_1} + \frac{D_2}{(D_m)_2}$$

Basierend auf diesen beiden Gleichungen entstand der Kombinationsindex CI für zwei gleichzeitig wirkende Inhibitoren:

$$CI = \frac{D_1}{(D_x)_1} + \frac{D_2}{(D_x)_2} = \frac{D_1}{(D_m)_1} * \left[\frac{f_a}{1 - f_a} \right]^{1/m_1} + \frac{D_2}{(D_m)_2} * \left[\frac{f_a}{1 - f_a} \right]^{1/m_2}$$

Die Werte $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ stehen für die Dosis, die das System in der jeweiligen Einzelbehandlung mit dem Wirkstoff zu einem bestimmten Prozentsatz hemmen. Diese Dosen können mit der generellen Medianeffektgleichung wie obenstehend beschrieben bestimmt werden.

Nimmt der CI-Wert Werte < 1 an, steht dies für einen synergistischen Effekt; bei Werten > 1 besteht ein antagonistischer und bei $CI = 1$ ein additiver Effekt. Je nach Ausmaß des Wertes lassen sich außerdem verschiedene Stärkegrade des Effekts bestimmen (Chou 2006, Chou und Talalay 1984). Die CI-Werte der Kombinationsbehandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen

wurden nach durchflusszytometrischer Analyse mithilfe des Programms CompuSyn von Biosoft errechnet. Hierbei wurden die Daten der experimentellen Messungen mit PI verwendet.

4.2.10 Hemmung der Apoptose mit z-VAD-fmk

Der Wirkstoff z-VAD-fmk (Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]-Fluoromethylketon) ist ein Pancaspase-Inhibitor, der kovalent an das aktive Zentrum der Caspaseproteasen bindet und zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Caspasenaktivität führt. Er weist ansonsten keine zytotoxischen Effekte auf und ist zellmembrangängig. Da die kaskadenartige Aktivierung von Caspasen die gemeinsame Endstrecke verschiedener Wege der Apoptose darstellt, ist die Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität mit einer starken Verminderung der Apoptosefähigkeit einer Zelle verbunden. Somit konnte untersucht werden, ob der zytotoxische Effekt der Behandlung mit PARP- und ATR-Inhibitoren auch mit der Einleitung der Apoptose einhergeht.

Das angewandte Procedere entspricht außer den in Folgenden genannten Änderungen dem Schema einer durchflusszytometrischen Messung. Die Zellen der drei Ewing-Sarkomzelllinien wurden mit 100.000 Zellen/Well bei der A673 (6-Well-Platten) und 150.000 Zellen/Well für die WE-68 und SK-ES-1 (12-Well-Platten) ausgesät. 60 min vor der Behandlung mit den Wirkstoffen und etwa 24 h nach dem Anlegen der Well-Platten wurde allerdings die Hälfte der Wells mit jeweils 20 µM z-VAD-fmk vorbehandelt und die Zellen anschließend wieder im Brutschrank inkubiert. Es wurden für die Behandlung der Zellen folgende Konzentrationen verwendet (s. Tab. 7):

Tab. 7: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe unter Zugabe von z-VAD-fmk

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (µM)		
		A673	WE-68	SK-ES-1
Olaparib	PARP-Inhibitor	20	0,5	1
VE-821	ATR-Inhibitor	2	0,4	10
z-VAD-fmk	Pan-Caspase-Inhibitor	20		

Die verwendeten Konzentrationen wurden nach der Ermittlung eines möglichst großen zytotoxischen Effekts in den durchflusszytometrischen Versuche (s. o.) für jede Zelllinie ausgewählt. Olaparib und z-VAD-fmk wurden mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 mit DMSO. Zum Ausgleich des zur Verdünnung von VE-821 benötigten zytotoxischen DMSO wurde die gleiche Menge zur Kontrolle und zur Einzelbehandlung mit Olaparib hinzugegeben. z-VAD-fmk wurde 60 min vor der Behandlung mit den Hemmstoffen auf die Wells appliziert.

So wurden jeweils ein Well der Kontrolle, je eine Einzelbehandlung mit VE-821 und Olaparib sowie die Kombination dieser beiden Wirkstoffe sowohl ohne als auch mit zusätzlich 20 µM

z-VAD-fmk angefertigt. Das restliche Vorgehen entsprach ansonsten dem in Kap. 4.2.7 und Kap. 4.2.8 dargestellten Vorgehen; Zelltod sowie Verlust des mitochondrialen Membranpotentials konnten mit PI bzw. DIOC₆(3) am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II gemessen werden.

4.2.11 Messung der Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3 ist eine Effektor-Caspase, die eine wichtige Rolle in der Apoptose der Zelle einnimmt. Ihre Aktivitätsmessung durch Fluoreszenzspektrometrie ist daher ein wichtiger Hinweis auf die apoptotische Aktivität der behandelten Zellen. Das aktive Heterotetramer spaltet als Cystein-Protease bestimmte andere Proteine, darunter auch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP; s. Kap. 2.3). Dieses Enzym wird von der Caspase-3 C-terminal an der Stelle Asp-216 gespalten. Die dazu gehörige Aminosäuresequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), deren Erkennung und Spaltung hochspezifisch für die Caspase-3 ist, dient als Basis für das synthetische, fluorogene Caspase-3-Substrat Ac-DEVD-AMC. In diesem synthetischen Substrat ist das fluoreszierende Molekül AMC (7-Amino-4-Methylcumarin) an das Tetrapeptid DEVD gebunden, das von der Caspase-3 gespalten wird. Nach der Abspaltung kann dieser Fluoreszenzfarbstoff durch Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm bei 430 bis 460 nm Licht emittieren. Mit einem Fluoreszenzspektrometer lässt sich dieses quantifizieren und so eine mögliche erhöhte Aktivität der Caspase-3 nachweisen.

4.2.11.1 Vorbereitung und Behandlung der Zellen

Die für die Durchführung benötigten Caspase-3-Lysepuffer und Aktivitätspuffer mussten zuvor angesetzt werden. Für 50 ml Lysepuffer wurden die folgenden Mengen und Konzentrationen verwendet:

25 ml NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (20 mM)
5 ml Tris-HCl [pH 7,5] (100 mM)
5 ml Na ₄ P ₂ O ₇ (100 mM)
6,5 ml NaCl (1 M)
0,5 ml Triton X-100 (100 %)

Diese Lösung wurde mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und mit etwa 100 µl 9 % HCl auf pH 7,5 eingestellt. Für den Aktivitätspuffer wurden entsprechend der Probenmenge (hier 14 Proben à 110 µl) folgende Mengen und Konzentrationen verwendet:

40 µl HEPES [pH 7,5] (1 M)
200 µl Glycerin 100 %
1,656 ml Aqua dest.
4 µl DTT
100 µl Caspase-3-Substrat

Das DTT und Caspase-3-Substrat wurden erst kurz vor der Applikation des Aktivitätspuffers lichtgeschützt hinzugegeben. Für die Messung der Caspase-3-Aktivität wurden für die drei verwendeten Ewing-Sarkomzelllinien 200.000 Zellen/Well ausgesät, die nach 24 h mit den folgenden Konzentrationen behandelt wurden (s. Tab. 8):

Tab. 8: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Caspase-3-Aktivitätsmessung

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (µM)		
		A673	WE-68	SK-ES-1
Olaparib	PARP-Inhibitor	1 / 5 / 10 / 20 / 40	0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1	0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4
VE-821	ATR-Inhibitor	2	0,4	10

Die verwendeten Konzentrationen wurden nach der Ermittlung eines möglichst großen zytotoxischen Effekts in den durchflusszytometrischen Versuche (s. o.) für jede Zelllinie ausgewählt. Olaparib wurde mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 mit DMSO. Zum Ausgleich des zur Verdünnung von VE-821 benötigten zytotoxischen DMSO wurde die gleiche Menge zur Kontrollreihe hinzugegeben.

Die Zellen wurden 24 h nach der Behandlung nach dem in Kap. 4.2.7 genannten Ablauf und mit den gleichen Konzentrationen geerntet, dabei allerdings in 15 ml-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Auffüllung der Röhrchen bis auf 14 ml mit PBS und die Zentrifugation bei 1800 rpm in der vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C für 5 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet auf Eis gelagert und der letzte Rest Flüssigkeit vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, sodass nur noch das Zellpellet trocken verblieb. Daraufhin wurden 100 µl des zuvor angesetzten Caspase-3-Lysepuffers auf jede einzelne Probe gegeben und die Zellen dabei durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und ohne Luftblasen in vorgekühlte Eppendorf-Röhrchen eingebracht. Es erfolgte die Lyse der Proben für 15 min bei 8 °C im Kühlschrank. Nach Ablauf der Lysierungszeit wurden auf jeweils eine Probe 110 µl vom Aktivitätspuffer hinzugefügt, der Inhalt der Röhrchen gevortext und vorsichtig ohne Luftblasen in eine 96-Well-Platte gegeben. Pro Messreihe wurden als Leerwert 100 µl des Lysepuffers und 110 µl des Aktivitätspuffers und als zusätzlicher Nullwert außerdem 210 µl destilliertes Wasser verwendet. Die Well-Platte wurde dann für 2 h lichtgeschützt bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bevor mit der Messung am Fluoreszenzphotometer begonnen werden konnte. Dafür wurde das Fluoreszenzphotometer FLUOstar Omega verwendet, das die Fluoreszenzen bei

einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm Wellenlänge bestimmt. Die Quantität der Caspase-3-Aktivität der verschiedenen Proben wurde daraufhin unter Subtraktion des Mittelwerts der Leerproben als relative Aktivitätszunahme gegenüber der als 1 gesetzten unbehandelten Probe berechnet.

4.2.12 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Um Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Behandlung mit den eingesetzten Wirkstoffen auch auf Ebene der Genexpression ziehen zu können, wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Expression bestimmter Zielgene in den Zelllinien A673 und WE-68 untersucht. Bei dem verwendeten Verfahren wurde eine Kombination von Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und „Real time“ PCR eingesetzt, die deren Funktionsprinzipien vereinigt. Diese kombinierte Methode stellt derzeit eine der modernsten Methoden zur Quantifizierung vorhandener Nukleinsäuren dar. Hierbei wird zunächst nach dem Prinzip der RT-PCR die mRNA der in der Probe enthaltenen Zellen isoliert und gereinigt und anschließend durch den Einsatz der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im nachfolgenden Reaktionszyklus wird nun das Verfahren der „Real time“ PCR angewandt und die gewonnene cDNA mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Mithilfe der dabei eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe der TaqMan-Sonden kann die Quantifizierung der Nukleinsäuren während eines Reaktionszyklus im relativen Mengenvergleich zu einem Referenzgen in Echtzeit ermöglicht werden.

4.2.12.1 Vorbereitung und Behandlung der Zellen

Für die RT-PCR wurden je 2 Wells pro Einzelbehandlung mit 150.000 Zellen/Well für die A673 und 200.000 Zellen/Well bei der WE-68 angelegt. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit den folgenden Wirkstoffen behandelt (s. Tab. 9):

Tab. 9: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die PCR-Messung

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (µM)	
		A673	WE-68
Olaparib	PARP-Inhibitor	5	0,5
VE-821	ATR-Inhibitor	2	0,4

Die verwendeten Konzentrationen wurden mithilfe der durchflusszytometrischen Versuche (s. o.) ausgewählt. Olaparib wurden mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 mit DMSO. Es wurde eine Kontrolle ohne Wirkstoff, eine Einzelbehandlung mit Olaparib sowie mit VE-821 und eine Kombination der beiden Wirkstoffe angefertigt. Zum Ausgleich des zur Verdünnung von VE-821 benötigten zytotoxischen DMSO wurde die gleiche Menge zur Kontrolle und zur Einzelbehandlung mit Olaparib hinzugegeben.

Nach einem Zeitraum von 24 h nach der Behandlung wurden die Zellen wie in Kap. 4.2.7 dargestellt geerntet. Nach dem Zentrifugieren bei 1800 rpm und Raumtemperatur für 5 min wurde der Überstand verworfen und die letzte Flüssigkeit vorsichtig abgezogen. Das trockene Zellpellet wurde im Folgenden eisgekühlt weiterverarbeitet; die Pipetten wurden von nun an nur noch mit Filtertips verwendet.

4.2.12.2 RNA-Isolation

Zunächst musste die RNA der behandelten Zellen isoliert werden und vor dem Abbau durch RNasen geschützt werden. Um den Abbau der im Vergleich zur DNA wesentlich instabileren RNA zu vermeiden, sollten RNA und RNasen möglichst frühzeitig voneinander getrennt werden. Die RNA-Isolation wurde nach dem Arbeitsprotokoll des peqGOLD-Total-RNA-Kits der Firma peqlab Biotechnologie GmbH durchgeführt. Bei diesem wird die RNA selektiv an eine Silikonmembran einer RNA-Säule gebunden, die restlichen Zellbestandteile, Enzyme und DNA entfernt und die RNA schließlich ausgewaschen. Zunächst mussten die Zellen jeder einzelnen Probe mit jeweils 400 µl RNA-Lysepuffer-T lysiert werden, der zum Abbau der RNase und anderer Enzyme führte. Nachfolgend wurde das Lysat auf eine DNA-Removing-Säule aufgebracht und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die DNA-Removing-Säule wurde verworfen, zur Fällung der Nukleinsäuren 400 µl 70 %iger Ethanol zum Unterstand gegeben und mit der Pipette sorgfältig gemischt, bis es homogenisiert war. Daraufhin wurde das gesamte Lysat jeder Probe auf jeweils eine PerfectBind-RNA-Säule mit einem neuen Unterstandröhrchen gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, bevor der Unterstand verworfen wurde. Um eventuelle Kontaminationen zu entfernen, wurden 500 µl RNA-Waschpuffer-I auf die PerfectBind-RNA-Säule hinzugegeben, für 5 min einwirken gelassen und bei 13000 rpm 15 sec zentrifugiert, bevor abermals der Unterstand verworfen und die Säule auf ein neues Unterstandsröhrchen gesetzt wurde. Um mögliche verbliebene DNA zu entfernen, musste diese als nächster Schritt durch DNase-Verdau abgebaut werden. Dazu wurde das peqGold DNase I Digest Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) verwendet; pro Probe wurden 75µl des DNase-Verdau-Mix, bestehend aus mit der Pipette vermischter 1,5 µl DNase und 73,5 µl des DNase-Digestionspuffers, auf die PerfectBind-RNA-Säule aufgebracht und für 15 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Im Anschluss wurden mehrere Waschschrte durchgeführt. Als erstes wurde 350 µl RNA-Waschpuffer-I hinzugegeben und bei 13.000 rpm für 15 sec zentrifugiert, der Unterstand verworfen sowie ein weiterer folgender Waschschrte mit Zugabe von 500 µl RNA-Waschpuffer-II auf die Säule, anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 sec und Verwerfen des Unterstands durchgeführt. Nachfolgend wurde

abermals 500 µl RNA-Waschpuffer-II auf die PerfectBind-RNA-Säule gegeben, für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Abschließend wurde zum Auswaschen der RNA die PerfectBind-RNA-Säule auf ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen gesetzt und je nach Größe des initialen Zellpellets 35-70 µl RNase-freies Wasser auf die Säule aufgebracht, 1 min gewartet und schließlich noch für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Unterstand im Eppendorf-Röhrchen mit der isolierten RNA wurde für maximal 24 h bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

4.2.12.3 Photometrische RNA-Bestimmung

Um Reinheitsgrad und die Konzentration der isolierten RNA zu bestimmen, wurde die Lichtabsorption der RNA in der verdünnten Lösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm am Spektralphotometer gemessen. In diesem Verfahren wird die optische Dichte (OD) gemessen, in diesem Fall als Maß für die Extinktion des Lichts bei $\lambda = 260$ nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, und bei $\lambda = 280$ nm (OD_{280}), was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Durch den Quotienten der beiden OD-Messungen (OD_{260} / OD_{280}) kann das Maß eventueller Verunreinigungen durch Proteine oder verbliebener DNA bestimmt werden. Ein Verhältnis von 2,0 würde hierbei für reine RNA sprechen, unter der Verwendung des peqGOLD-Total-RNA-Kits sollte ein Quotient von 1,8 bis 2,0 erreicht werden. Niedrigere Werte können durch Verunreinigung der Lösung mit z. B. Proteinen, DNA und/oder aromatischen Substanzen entstehen.

Eine OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. So lässt sich die Konzentration der RNA in jeder Probe gemäß folgender Formel ermitteln:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Auswertung von Reinheitsgrad und Konzentration der einzelnen Proben wurden auf Eis 4 µl der RNA-Proben mit 76 µl RNase-freiem Wasser entsprechend einer 1 : 20 Verdünnung gemischt, gevortext und kurz anzentrifugiert. Als photometrischer Leerwert der Messung dienten 80 µl RNase-freies Wasser, dessen OD_{260} und OD_{280} noch vor den Messungen der einzelnen Proben in einer UV-Licht-durchlässigen Glasküvette bestimmt wurden. Darauffolgend konnten nacheinander die einzelnen verdünnten Proben nach jeweils sorgfältiger Ausspülung der Glasküvette am Photometer gemessen werden. Für die folgende Umschreibung der RNA in cDNA sollte jede Probe exakt 0,5 µg RNA enthalten. Dafür wurden 0,5 µg durch die am Photometer erhaltene Konzentration der einzelnen Proben (µg / µl) dividiert und das

errechnete Volumen der RNA-Probe mit der jeweiligen Differenz an RNase-freiem Wasser auf das benötigte Endvolumen von 13 µl aufgefüllt.

4.2.12.4 *c-DNA-Transkription*

Die isolierte RNA sollte im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben werden. Für dieses Verfahren wurden das Arbeitsprotokoll und die Materialien des Omniscript® Reverse Transcription Kits von Qiagen benutzt.

Für jede einzelne Probe wurde der folgende Mix erstellt:

2 µl 10×Puffer-RT
2 µl Random-Hexamer
2 µl dNTP-Mix
0,25 µl RNase-Out
1 µl Omniscript RT

Dieser Mix wurde nach Auftauen der einzelnen Substanzen gemischt, gevortext und kurz an zentrifugiert. Bei den daraufhin auf Eis erfolgenden Arbeiten wurden jeweils 7 µl vom Mix auf jede Probe gegeben, gemischt, an zentrifugiert und schließlich bei 37 °C für eine Stunde im Wärmeblock inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben mit cDNA durch Zugabe von 20 µl Wasser pro Röhrchen verdünnt und jeweils zwei Aliquots à 20 µl angefertigt. Die Proben konnten danach entweder direkt für die PCR-Messung verwendet werden oder bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren werden.

4.2.12.5 *PCR-Messung*

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion setzt sich aus einem dreischrittigen Reaktionszyklus zusammen, der wiederholt abläuft und letztendlich zu einer Vervielfältigung der ursprünglich zur Verfügung stehenden Nukleinsäuren führt. Zunächst werden bei einer Temperatur von 95 °C die Doppelstränge der DNA durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. Im nächsten Schritt lagern sich bei einer Temperatur von 60 °C die Primer der untersuchten Gene an ihre komplementären Bindungsstellen an. Primer sind kurze Oligonukleotide, die den zu untersuchenden Genabschnitt begrenzen und den Synthesebeginn bzw. -abbruch initiieren. Im letzten Schritt synthetisiert die vom Mikroorganismus *Thermus aquaticus* stammende hitzestabile Taq-DNA-Polymerase bei 60 °C entlang dem nun als Matrize dienenden DNA-Einzelstrang einen neuen Doppelstrang, der im darauffolgenden Zyklus erneut getrennt und wieder vervielfältigt wird. Bei quantitativer Echtzeit-PCR werden für diese Methode allerdings spezifische Sonden benötigt, die neben dem

sequenzspezifischen Primer am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (VIC™ oder FAM™-Markierung) aufweisen, dessen Fluoreszenz bei freien TaqMan-Sonden durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET, engl. *fluorescence resonance energy transfer*) von einem nicht-fluoreszierendem sogenannten Quencher am 3'-Ende unterdrückt wird. Während der Synthese des neuen Doppelstrangs löst die Taq-DNA-Polymerase durch ihre Exonuclease-Aktivität mithilfe hydrolytischer Spaltung den fluoreszierenden Reporterfarbstoff von der DNA ab, dessen Fluoreszenz im Folgenden nicht mehr durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt wird. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Intensität der sequenzspezifischen Reporterfluoreszenz, die in Echtzeit nach jedem Amplifikationszyklus bei spezifischer Wellenlänge gemessen werden kann. Der Anstieg der Intensität verhält sich dabei proportional zur Menge der entstandenen Amplifikate. Die Expressionslevel der untersuchten Zielgene wurden mit dem eines Referenzgens als Kontrolle verglichen. Als dieses Referenzgen wurde das konstitutiv in jeder Zelle vorkommende und konstant exprimierte β_2 -Mikroglobulin miterfasst.

Für die Messung der Proben am PCR-Gerät wurde für jede Probe ein Mastermix pro untersuchtem Zielgen und für das Referenz-Gen erstellt. Dieser setzte sich je Probe mit 25 μ l bestehend aus 12,5 μ l Universal-PCR-Mastermix, 11,25 μ l RNase-freiem Wasser und 1,25 μ l Primer-Sonden-Mix zusammen. Von jeder Probe wurden 2 μ l cDNA zu 50 μ l des Mastermix für jedes Gen gegeben, gevortext und kurz an zentrifugiert. Da von jeder Probe eine Doppelbestimmung sowohl für die Zielgene als auch das Referenz-Gen vorgenommen werden sollte, wurde dieser Inhalt anschließend zu je 25 μ l in 2 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Außerdem wurden zu jedem Gen zwei Negativ-Kontrollen ohne cDNA, sondern nur mit dem Mastermix mitgeführt. Die 96-Well-Platte wurde nun mit einer Folie verschlossen und die Ränder festgewalzt. Daraufhin konnte mit der Messung im Thermocycler begonnen werden, der mit folgenden Einstellungen betrieben wurde:

Stufe 1: Bei 50 °C für 2 min (1 Zyklus)

Stufe 2: Bei 95 °C für 10 min (1 Zyklus)

Stufe 3: Bei 95 °C für 15 sec, anschließend bei 60 °C für 1 min (40 Zyklen)

4.2.12.6 Auswertung der PCR-Messung

Bei der Auswertung der PCR-Messung wurde zur Quantifizierung des Expressionsniveaus der untersuchten Zielgene ein Vergleich ihrer Expressionslevel mit dem des sogenannten *housekeeping gene* β_2 -Mikroglobulin gezogen.

Nach Ablauf der Messung zeigte sich ein Amplifikationsdiagramm mit dem Reaktionsverlauf, bei dem die ermittelten Reportersignale (ΔR_n -Werte) gegen die Zyklusanzahl aufgetragen wurden. Da eine verlässliche Aussage über die Quantifizierung der einzelnen Gene nur in der exponentiellen Phase des Anstiegs getroffen werden kann, weil hier eine Proportionalität zwischen Zunahme des Signals und Zunahme der amplifizierten Gene besteht, wird in diesem Bereich eine Schwelle gezogen, die als „Threshold“ bezeichnet wird und die bis dahin erfolgte exponentielle Anzahl der Zyklen als „Threshold Cycle“ (C_T - Wert) festlegt. Mit diesem kann die unterschiedliche Expression der Gene als das n-fache des $\Delta\Delta C_T$ -Werts und die einzelnen Unterschiede des Schwellenwertes relativ im Bezug zum Referenzgen bestimmt werden.

So wurde folgende Berechnung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte herangezogen:

$$\begin{aligned}\Delta C_T \text{ Zielsequenz (behandelt + Zielgen)} &= C_T \text{ Zielgen} - C_T \beta_2\text{-Mikroglobulin} \\ \Delta C_T \text{ Kontrolle (unbehandelt, Zielgen)} &= C_T \text{ Kontrolle} - C_T \beta_2\text{-Mikroglobulin} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T \text{ Zielsequenz} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}\end{aligned}$$

Der so erhaltene $\Delta\Delta C_T$ -Wert wird als negativer Exponent der Basis 2 eingesetzt und so ein relatives Verhältnis der Genexpression vom Zielgen im Vergleich zum Referenzgen errechnet, das als 1 gesetzt wird.

4.2.13 Western Blot

Western Blots wurden durchgeführt, um intrazelluläre Veränderungen des Proteinhaushalts durch die Wirkstoff- und Kombinationsbehandlung bei den beiden Zelllinien A673 und WE-68 zu detektieren.

4.2.13.1 Probenvorbereitung und Herstellung der Proteinlysate

Hierfür wurden für beide Zelllinien pro Probe je 1 Million Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen mit 6 ml des entsprechenden Mediums ausgesät und nach 24 h mit den unter Tab. 10 genannten Konzentrationen behandelt. Nach der Wirkstoffbehandlung wurden die Zellen in einem Zeitraum von 2 h bzw. 24 h zunächst bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium abpipettiert, die Kulturflaschen mit 2 ml PBS gewaschen, dieses in

15 ml-Röhrchen überführt und zur Ablösung der Zellen 1 ml Trypsin zu jeder Flasche hinzugegeben. Im Brutschrank wurde die jeweilige Trypsinierungszeit der beiden Zelllinien (s. Tab. 1) abgewartet und die Zellen nach Ablauf der Zeit zweifach mit je 2 ml PBS vereinzelt und in das entsprechende Röhrchen gegeben, bevor die Proben in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert wurden.

Tab. 10: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Western Blots

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (µM)	
		A673	WE-68
Olaparib	PARP-Inhibitor	5	0,5
VE-821	ATR-Inhibitor	2	0,4

Die verwendeten Konzentrationen wurden mithilfe der durchflusszytometrischen Versuche und als gleiche Werte wie bei der PCR-Messung (s. o.) und Zellzyklusanalyse (s. u.) ausgewählt. Olaparib wurden mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 mit DMSO. Es wurde eine Kontrolle ohne Wirkstoff, eine Einzelbehandlung mit Olaparib sowie mit VE-821 und eine Kombination der beiden Wirkstoffe angefertigt. Zum Ausgleich des zur Verdünnung von VE-821 benötigten zytotoxischen DMSO wurde die gleiche Menge zur Kontrolle und zur Einzelbehandlung mit Olaparib hinzugegeben.

Der Überstand der auf Eis gelagerten Proben wurde dekantiert, die Zellen zunächst mit 2 ml PBS resuspendiert, die Flaschen mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und die Zentrifugation mit den gleichen Einstellungen (s. o.) wiederholt. Der Überstand wurde abermals verworfen und die sich erneut am Röhrchenboden gesammelte Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis weitergeführt.

Das Zellpellet jeder Probe wurde mit 100 µl des vorher hergestellten RIPA-Puffers (Zusammensetzung: 150 mM Natriumchlorid (NaCl), 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 1 % Triton X-100, 40 mM Tris, pH 8,0 mit jeweils ¼ einer Tablette Phosphatase- und Proteaseinhibitor auf 2,5 ml RIPA-Puffer) resuspendiert und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Damit eine vollständige Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine erfolgen konnte, mussten die auf Eis gelagerten Proben nun für 20 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert und danach gründlich gevortext werden. Die Proben wurden zur vollständigen Lösung der Proteine von Membranen und Nukleinsäuren für 5 min bei 4 °C im Ultraschallbad behandelt und anschließend mit 13.000 U/min bei auf 4 °C gekühlter Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein kleines Eppendorf-Röhrchen gegeben und bis zum Erstellen der Western Blots bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert; das Pellet und Unterstands-röhrchen wurden verworfen.

4.2.13.2 Gelelektrophorese und Immundetektion von Proteinen

Die weiteren Schritte in Form der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunodetektion der Proteine wurden dankenswerterweise von Dr. rer. nat. Christian Marx vom Fritz-Lippmann-Institut in Jena übernommen.

4.2.14 Zellzyklusanalyse

Um mögliche Veränderungen des Zellzyklus der Zelllinien A673 und WE-68 bei der Behandlung mit Olaparib und VE-821 aufzudecken, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Beim Durchlaufen des Zellzyklus verändert sich der DNA-Gehalt einer Zelle je nach Zellzyklusphase. Der Zellzyklus ist charakterisiert durch die mitotische Teilung (M-Phase) der Zelle und anschließender Interphase, die sich in G1-, S- und G2-Phase unterteilen lassen kann. Nach der G1-Phase, die vor allem zur Proteinsynthese dient, beginnt die Zelle in der S-Phase, ihr Erbmateriale zu duplizieren. In der G2-Phase besitzt die Zelle daher die doppelte Menge von Erbmateriale wie in der G1-Phase, da sie kurz vor der Teilung steht. Durch einen in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff können diese Unterschiede im DNA-Gehalt quantifiziert werden, da die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge der DNA ist. Das schon zur Bestimmung des Zelltods verwendete PI (s. Kap. 4.2.8.1) ist ein solcher interkalierender DNA-Fluoreszenzfarbstoff. Da dieser allerdings die Zellmembranen vitaler Zellen nicht passieren kann, müssen die Zellen zunächst in Ethanol fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert werden. Um eine gleichzeitige Interkalierung der RNA und damit ein inkorrekt gemessenes Maß des DNA-Gehalts der Zelle zu vermeiden, muss die RNA außerdem durch den zusätzlichen Einsatz von Ribonuclease-A (RNase) abgebaut werden. Die Zellen der beiden Ewing-Sarkomzelllinien A673 und WE-68 wurden mit 100.000 Zellen/Well bei der A673- bzw. 150.000 Zellen/Well bei der WE-68-Zelllinie ausgesät und nach 24 h mit folgenden Wirkstoffen und Konzentrationen behandelt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Zellzyklusanalyse

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration (μM)	
		A673	WE-68
Olaparib	PARP-Inhibitor	5	0,5
VE-821	ATR-Inhibitor	2	0,4

Die verwendeten Konzentrationen wurden mithilfe der durchflusszytometrischen Versuche und als gleiche Werte wie bei der PCR-Messung und den Western Blots (s. o.) ausgewählt. Olaparib wurden mit den jeweilig benötigten Kulturmedien verdünnt, VE-821 mit DMSO. Es wurde eine Kontrolle ohne Wirkstoff, eine Einzelbehandlung mit Olaparib sowie mit VE-821 und eine Kombination der beiden Wirkstoffe angefertigt. Zum Ausgleich des zur Verdünnung von VE-821 benötigten zytotoxischen DMSO wurde die gleiche Menge zur Kontrolle und zur Einzelbehandlung mit Olaparib hinzugegeben.

Nach weiteren 48 h wurde nach dem im Kap. 4.2.7 beschriebenen Procedere in FACS-Röhrchen geerntet. Die Zellen wurden in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 1.800 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Zellen in der zurücklaufenden Flüssigkeit mit der Pipette vereinzelt. Pro Probe wurden jeweils 2 ml des bei -20 °C gelagertem kaltem 70 %igen Ethanol tropfenweise unter ständigem Vortexen hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei -20 °C im Tiefkühlschrank für mindestens 24 h fixiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen in der abermals vorgekühlten Zentrifuge bei 1.800 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Zellsediment tropfenweise und unter ständigem Vortexen in jeweils 500 µl Glucose/PI-Lösung (bestehend aus 50 µl 20 %iger Glucoselösung (= 1 %ige Glucose), 50 µl PI, 397,5 µM PBS und 2,5 µl RNase A) resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Pipette vereinzelt und 45 min bei 8 °C im Kühlschrank inkubiert.

Abschließend wurde die Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer FACSCanto II der Firma BD Biosciences durchgeführt. Bei der unter Lichtschutz und mit auf Eis gelagerten Zellen durchgeführten Messung wurde eine langsame Flussrate, 20.000 Ereignisse pro Test und eine lineare Bestimmung der PI-Fluoreszenz eingestellt. Durch eine Unterteilung der gemessenen Fluoreszenz mit einem Raster konnten nun die prozentualen Anteile der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus an der Gesamtpopulation bestimmt werden (s. Abb. 7).

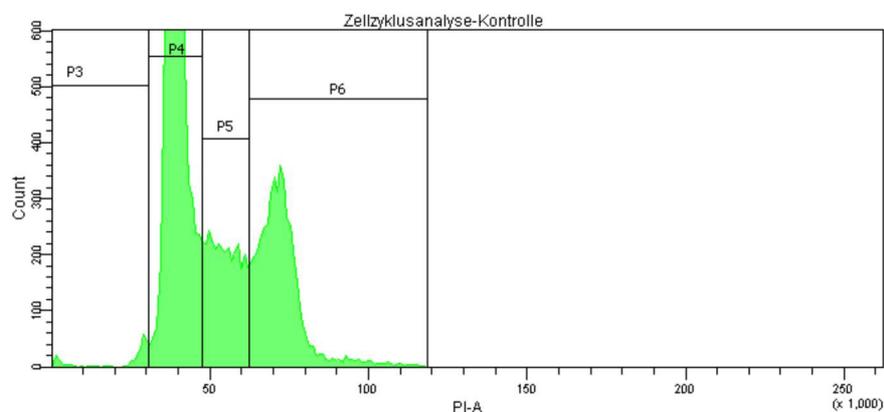


Abb. 7: Darstellung des Histogramms bei der Zellzyklusanalyse; beispielhaft an einer Probe der A673-Zelllinie abgebildet. Die Zellen wurden abhängig von ihrem jeweiligen Stadium des Zellzyklus in verschiedene Raster unterteilt; P3 zeigt den Anteil der sub-G1-Zellen, P4 den der Zellen in der G1-Phase, P5 den der Zellen der S-Phase und P6 bildet den Anteil der Zellen in der G2/M-Phase ab. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde PI verwendet.

4.2.15 Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Alle dargestellten Ergebnisse wurden mit $n = 3$ durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardmittelwertabweichungen dargestellt. Statistische p-Werte wurden mittels des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Durchflusszytometrische Messungen mit Bestimmung von Zelltod und $\Delta\Psi_m$

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnten bestimmte Auswirkungen der Kombinations- und Einzelbehandlung von PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren auf die verwendeten Zelllinien untersucht werden. In den folgenden Versuchen wurden der Zelltod sowie der Verlust von $\Delta\Psi_m$ in verschiedenen Wirkstoffkombinationen bestimmt.

5.1.1 A673-Zellen

In Abb. 8 sind die Auswirkungen der Kombinationsbehandlungen aus Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 sowie Olaparib und KU-55933 auf Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ in A673-Zellen graphisch dargestellt. Die auf Basis der PI-Messungen nach der Chou-Talalay-Methode errechneten CI-Werte sind nachfolgend in Tab. 12 aufgeführt.

Während die Wirkung des PARP-Inhibitors Olaparib in aufsteigender Dosierung in bis zu 28,2 % der A673-Zellen zum Zelltod führte und durch die alleinige Behandlung mit 2 μM bzw. 5 μM des ATR-Inhibitors VE-821 bis zu 19,5 % der Zellen abgetötet wurden, erbrachte die Kombination beider Wirkstoffe Werte von bis zu 55,3 %. Im Graphen konnte somit eine deutliche Divergenz der Kurven beobachtet werden. Bei Konzentrationen von $\geq 5 \mu\text{M}$ Olaparib erfolgte durch die Behandlung mit 5 μM VE-821 keine nennenswerte Steigerung des Zelltods gegenüber 2 μM VE-821, das in Einzelbehandlung allerdings eine wesentlich niedrigere Toxizität besaß. Durch Auswertung der Kombinationsindexanalyse wurden CI-Werte von 0,376 - 0,019 bzw. 0,291 - 0,043 errechnet, die einen starken bis sehr starken synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 bei A673-Zellen belegten. Der Verlust des $\Delta\Psi_m$ zeigte eine sogar noch deutlichere Darstellung der Kurve. Während durch die Einzelbehandlung mit Olaparib lediglich Werte bis zu 23,7 % erreicht wurden, betragen diese bei Kombination bis zu 67 %. Der Effekt der Kombinationsbehandlung war hier noch stärker ersichtlich.

Mit Veliparib wurde außerdem die Wirkung eines weiteren PARP-Inhibitors in Kombination mit VE-821 auf den Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ von Ewing-Sarkomzellen untersucht. Durch die Einzelbehandlung der A673-Zellen mit bis zu 100 μM Veliparib wurde der Zelltod in bis zu 19,8 % der Zellen ausgelöst. Durch zusätzliche Gabe von 2 μM bzw. 5 μM VE-821, die bei alleiniger Gabe um lediglich 0,7 % bzw. 1,7 % toxischer waren als der Kontrollwert, betragen die Werte allerdings bis zu 42,7 %.

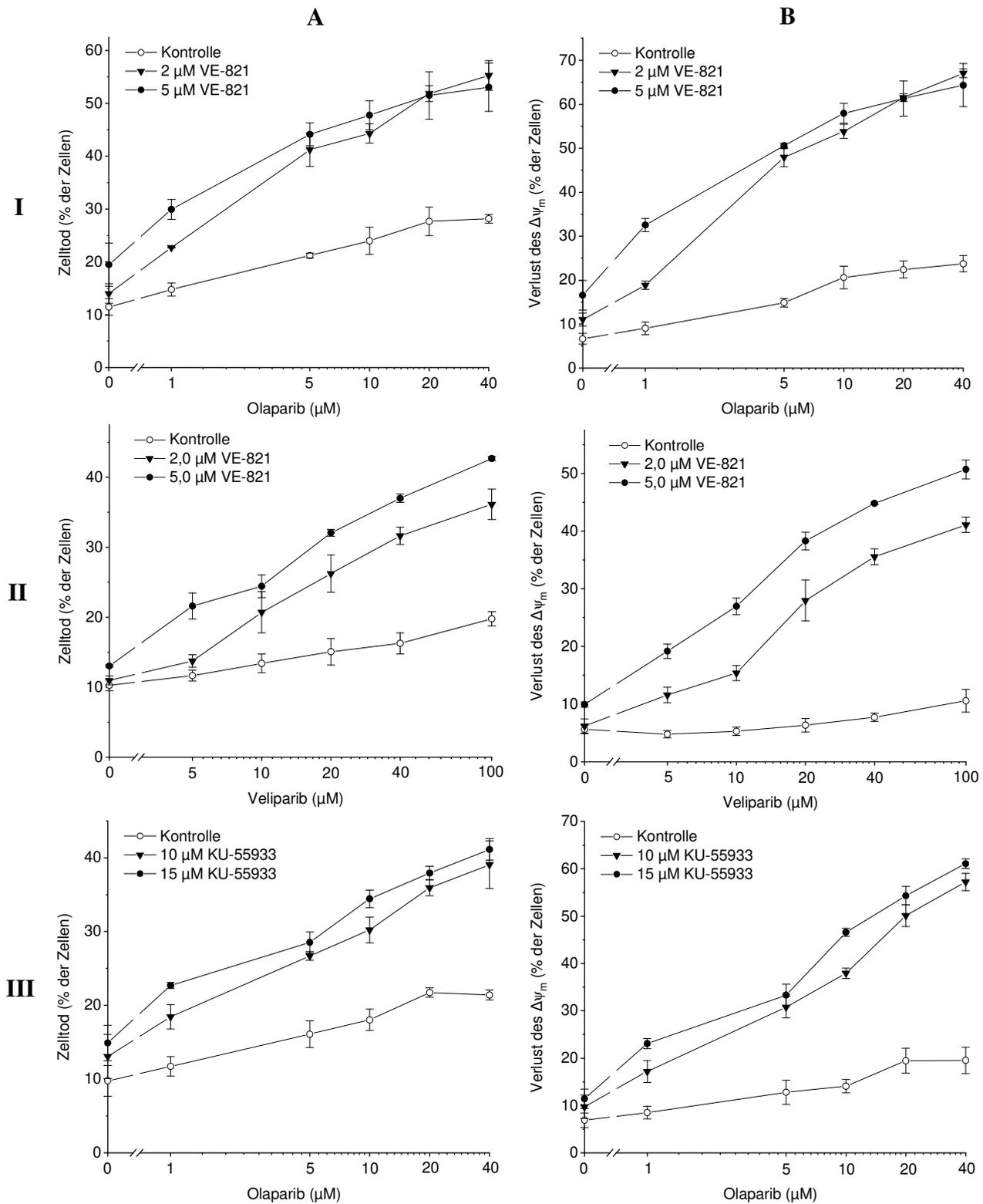


Abb. 8: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I), Veliparib + VE-821 (II) sowie Olaparib + KU-55933 (III) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in A673-Zellen. Die Zellen wurden je nach Kombination mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib, Veliparib, VE-821 und KU-55933 behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod durch Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels zellulärer Fluoreszenz von DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 12: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in A673-Zellen

VE-821 (μM)	2					5				
Olaparib (μM)	1	5	10	20	40	1	5	10	20	40
CI	0,376	0,048	0,042	0,021	0,019	0,291	0,073	0,055	0,042	0,043
VE-821 (μM)	2					5				
Veliparib (μM)	5	10	20	40	100	5	10	20	40	100
CI	0,705	0,099	0,037	0,018	0,016	0,085	0,051	0,012	0,007	0,004
KU-55933 (μM)	10					15				
Olaparib (μM)	1	5	10	20	40	1	5	10	20	40
CI	0,426	0,140	0,100	0,053	0,045	0,278	0,141	0,070	0,051	0,041

Die Werte wurden auf Basis der Messung der PI-Aufnahme (s. Abb. 8) nach der Chou-Talalay-Methode mithilfe der Software CompuSyn ermittelt.

In der Kombinationsindexanalyse zeigte sich mit Ausnahme des Werts von 0,705 bei 5 μM Veliparib und 2 μM VE-821, der einem moderaten synergistischen Effekt entspricht, bei beiden verwendeten VE-821-Konzentrationen Werte $< 0,1$, die einen sehr starken Synergismus beider Substanzen in A673-Zellen nachwiesen. Bei höheren Konzentrationen nahm dieser noch zu. Auch hier konnte bei der Darstellung des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ ein starker Effekt der Kombinationsbehandlung gezeigt werden, der wiederum sogar etwas deutlicher ausfiel als bei der Messung des Zelltods.

Auch die Kombination von Olaparib und dem ATM-Inhibitor KU-55933 erbrachte mit CI-Werten von 0,426 - 0,045 bei 10 μM KU-55933 bzw. 0,278 - 0,041 bei 15 μM KU-55933 fast in allen Kombinationen einen starken bis sehr starken Synergismus beider Substanzen in allen verwendeten Dosierungen. Bei Darstellung des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ zeigte sich ebenfalls eine deutliche Divergenz der Kurven mit einer maximalen Differenz von 41,6 % bei 40 μM Olaparib und zwischen Einzelbehandlung und zusätzlicher Behandlung mit 15 μM KU-55933.

5.1.2 WE-68-Zellen

Zelltod und der Verlust von $\Delta\Psi_m$ durch die Kombinationsbehandlungen aus Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 sowie Olaparib und KU-55933 in den p53-Wildtyp-Ewing-Sarkomzellen WE-68 werden in Abb. 9 dargestellt, während die dazugehörigen CI-Werte in Tab. 13 abgebildet sind.

Bei Betrachtung der Werte in der WE-68-Zelllinie fiel zunächst auf, dass die Zellen in geringeren Dosen als A673-Zellen empfindlicher auf Olaparib reagierten und sich zudem in den verwendeten Dosierungen keine Sättigung wie in der A673-Zelllinie einstellte. Stattdessen trat bei 1,25 μM Olaparib in Einzelbehandlung schon in 59,4 % der Population der Zelltod ein.

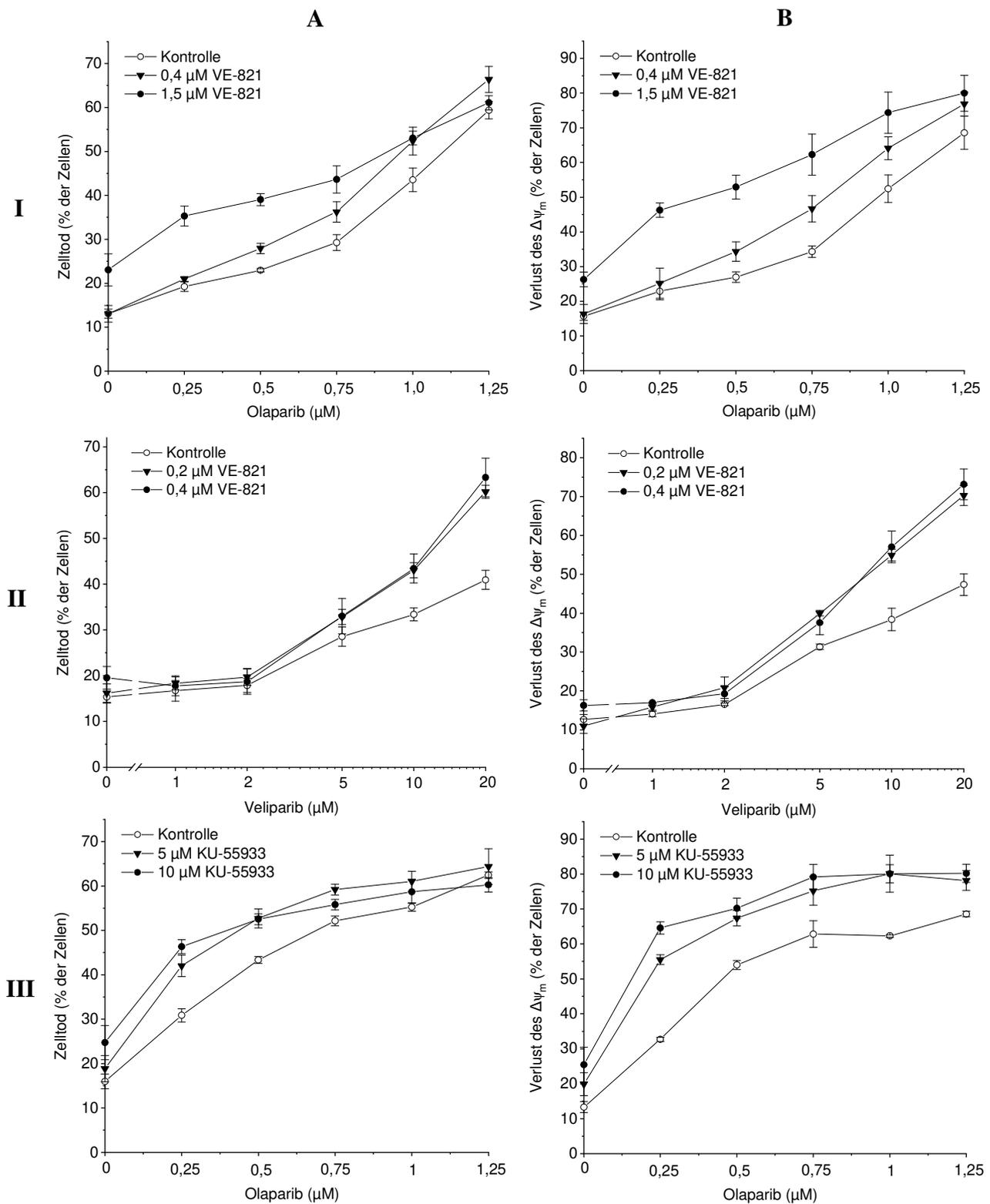


Abb. 9: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I), Veliparib + VE-821 (II) sowie Olaparib + KU-55933 (III) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in WE-68-Zellen. Die Zellen wurden je nach Kombination mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib, Veliparib, VE-821 und KU-55933 behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod durch Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels zellulärer Fluoreszenz von DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 13: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in WE-68-Zellen

VE-821 (μM)	0,4					1,5				
Olaparib (μM)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	0,25	0,5	0,75	1	1,25
CI	1,043	1,150	1,110	0,759	0,536	0,675	0,848	0,932	0,796	0,699
VE-821 (μM)	0,2					0,4				
Veliparib (μM)	1	2	5	10	20	1	2	5	10	20
CI	1,275	1,533	0,605	0,420	0,169	2,121	2,391	0,654	0,420	0,126
KU-55933 (μM)	5					10				
Olaparib (μM)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	0,25	0,5	0,75	1	1,25
CI	0,642	0,669	0,696	0,835	0,866	0,576	0,719	0,869	0,973	1,106

Die Werte wurden auf Basis der Messung der PI-Aufnahme (s. Abb. 9) nach der Chou-Talalay-Methode mithilfe der Software CompuSyn ermittelt.

Die Kombinationsbehandlungen von Olaparib mit 0,4 bzw. 1,5 μM VE-821 wiesen unterschiedliche Verläufe auf: Während bei der Kombinationsbehandlung mit 1,5 μM VE-821 der CI-Wert durchgängig in allen Messungen einen moderaten und leichten Synergismus erbrachte, zeigte die Kombination mit 0,4 μM VE-821 zunächst additive Wirkungen, bevor sich ab 1,0 μM Olaparib auch hier ein Synergismus einstellte. Im Graphen ist ersichtlich, dass bei hohen Olaparib-Konzentrationen ein stärkerer Effekt mit einer geringeren Konzentration an VE-821 erreicht werden konnte. Die Auswertung des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ erbrachte eine ähnliche Darstellung, bei der mit 1,5 μM VE-821 sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Olaparib-Konzentrationen mehr Zellen gegenüber 0,4 μM VE-821 das mitochondriale Membranpotential verloren.

Während durch die Einzelbehandlung mit 20 μM Veliparib bis zu 40,9 % der WE-68-Zellen abgetötet wurden, betrug dieser Wert bei Kombination mit 0,2 bzw. 0,4 μM VE-821 schon 60,2 % bzw. 63,3 %, wohingegen diese Konzentrationen in Einzelbehandlung keine wesentlichen Toxizitätsunterschiede zur Kontrollbehandlung aufwiesen. Sowohl im Graphen als auch in der Betrachtung der CI-Werte war ersichtlich, dass die Kombinationsbehandlung erst ab einer Veliparib-Konzentration ≥ 2 μM einen Vorteil gegenüber der Einzelbehandlung mit dem PARP-Inhibitor erbrachte. Ab 5 μM Veliparib zeigte sie aber mit CI-Werten von 0,605 - 0,169 bei 0,2 μM VE-821 und 0,654 - 0,126 bei 0,4 μM VE-821 einen synergistischen bis starken synergistischen Effekt beider Wirkstoffe auch bei WE-68-Zellen. Bei der Darstellung des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf. Auch hier stellte sich ein starker Effekt der Kombinationsbehandlung bei Veliparib-Konzentrationen ≥ 2 μM dar.

Durch die Kombinationsbehandlung von Olaparib und KU-55933 wurden mit 5 μM KU-55933 bei jeder verwendeten Olaparib-Konzentration bei CI-Werten von 0,642 - 0,866 synergistische bis moderat synergistische Effekte erzielt. In Kombination mit 10 μM KU-55933 bestand zunächst ein Synergismus, der bei steigenden Olaparib-Konzentrationen schwächer wurde und so schließlich ab 1 μM Olaparib etwa additive Ausmaße annahm. Sowohl bei der Darstellung des Zelltods als auch bei der des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ zeigte sich die zytotoxische Wirkung von Olaparib auf WE-68-Zellen. Die Auswirkung der Kombinationsbehandlung war auf den Verlust von $\Delta\Psi_m$ wieder etwas stärker darstellbar.

5.1.3 SK-ES-1-Zellen

Abb. 10 stellt den Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ durch die Kombination von Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 auf die p53-mutierte Ewing-Sarkomzelllinie SK-ES-1-Zellen dar, während die CI-Werte in Tab. 14 aufgelistet sind. Aufgrund der schwächeren Effekte wurde der Kombination mit KU-55933 im Folgenden nicht weiter nachgegangen. Im Gegensatz zu den A673- und WE-68-Zellen konnte in der SK-ES-1-Zelllinie eine weniger deutliche Wirkung der Kombinationsbehandlung mit Olaparib und VE-821 festgestellt werden. Die Einzelgabe von 5 μM bzw. 10 μM VE-821 wies mit PI-Werten von 18,5 % bzw. 21,2 % eine höhere Toxizität gegenüber der Kontrolle auf. Die zusätzliche Behandlung aufsteigender Olaparib-Konzentrationen führte jedoch nur zu einem schwachen zusätzlichen Effekt gegenüber der Einzelbehandlung mit Olaparib. Auffällig war zudem, dass bei einer Konzentration von 4 μM Olaparib die reine Einzelbehandlung mit Olaparib eine höhere Zelltodinduktion gegenüber der Kombinationsbehandlung erbrachte. Bei Betrachtung der dazugehörigen CI-Werte ließen sich die eben beschriebenen Beobachtungen bestätigen: Zwar zeigte die Kombination aus 5 μM VE-821 und 4 μM Olaparib mit einem CI-Wert von 0,663 einen synergistischen Effekt, alle anderen Kombinationen wiesen allerdings bei Werten knapp um 1 additive bis schwach antagonistische Effekte auf.

Auch die Kombinationsbehandlung aus Veliparib und VE-821 führte in SK-ES-1-Zellen zu schwächeren Effekten als in den anderen betrachteten Zelllinien. In der Konzentrationsreihe mit 5 μM VE-821 zeigten sich z. T. antagonistische Wirkungen, nur bei 20 μM Veliparib wurde mit einem CI-Wert von 0,792 ein schwacher Synergismus der Kombination beobachtet. Die Kombination aufsteigender Veliparib-Dosen mit 10 μM VE-821 ergab zunächst additive Effekte, dann ab 5 μM Veliparib eine schwach synergistische Wirkung.

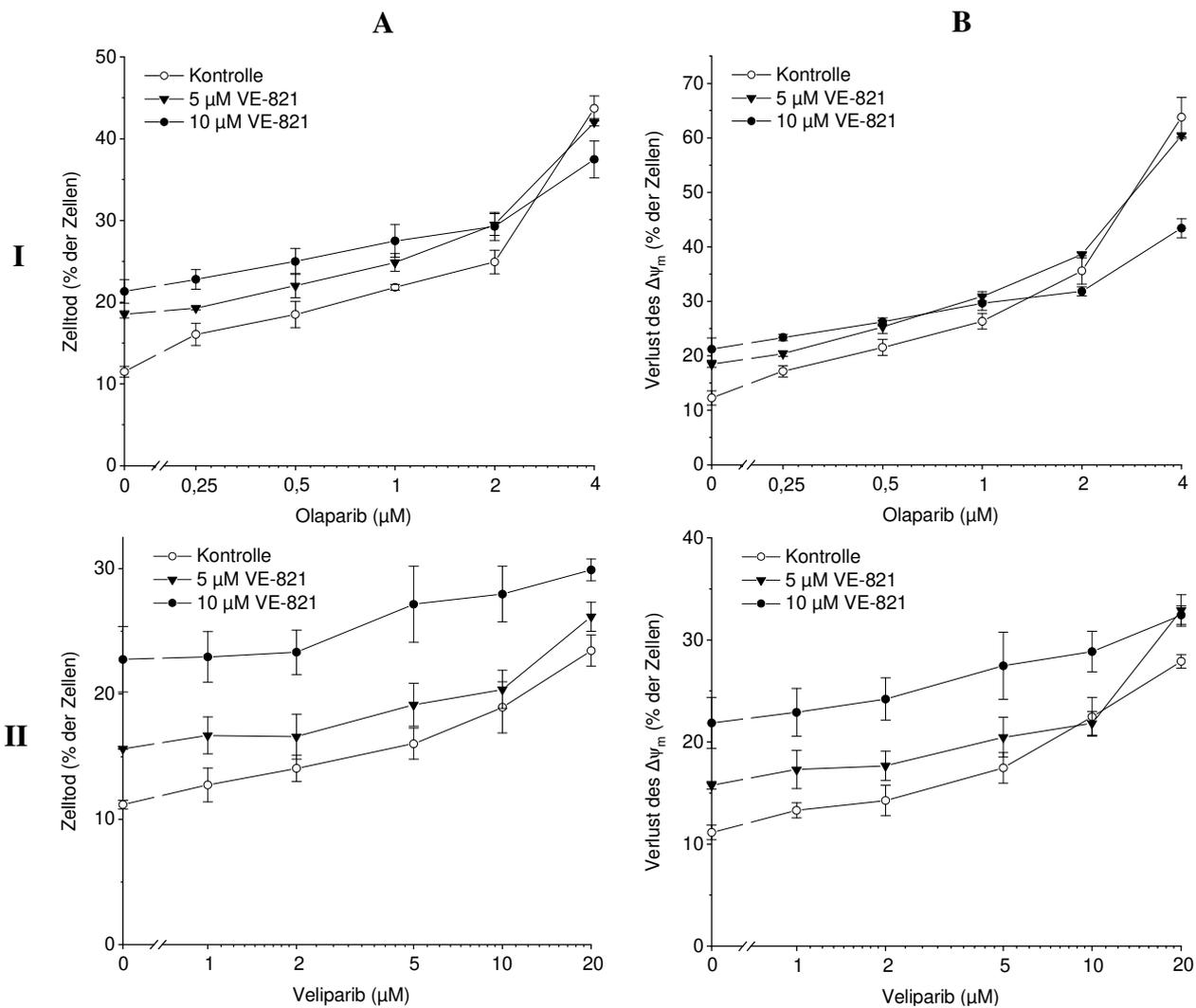


Abb. 10: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I) sowie Veliparib + VE-821 (II) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in SK-ES-1-Zellen. Die Zellen wurden je nach Kombination mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib bzw. Veliparib und VE-821 behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod durch Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels zellulärer Fluoreszenz von DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 14: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in SK-ES-1-Zellen

VE-821 (μM)	5					10				
Olaparib (μM)	0,25	0,5	1	2	4	0,25	0,5	1	2	4
CI	1.288	1.061	1.129	1.172	0.663	1.003	0.887	0.936	1.297	1.033
VE-821 (μM)	5					10				
Veliparib (μM)	1	2	5	10	20	1	2	5	10	20
CI	1.109	1.353	1.247	1.418	0.792	1.025	1.031	0.787	0.804	0.767

Die Werte wurden auf Basis der Messung der PI-Aufnahme (s. Abb. 10) nach der Chou-Talalay-Methode mithilfe der Software CompuSyn ermittelt.

5.1.4 SaOS-2-Zellen

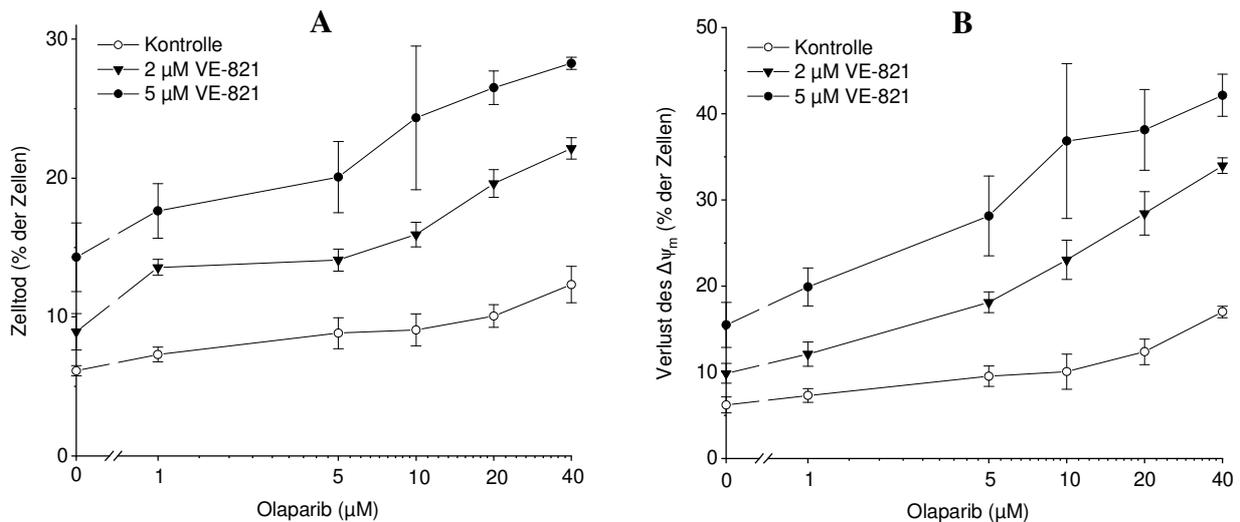


Abb. 11: Auswirkungen von Olaparib auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in SaOS-2-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib und VE-821 behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod durch Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels zellulärer Fluoreszenz von DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 15: CI-Werte der Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 in SaOS-2-Zellen

VE-821 (μM)	2					5				
Olaparib (μM)	1	5	10	20	40	1	5	10	20	40
CI	0.451	0.436	0.339	0.214	0.164	0.651	0.496	0.323	0.265	0.228

Die Werte wurden auf Basis der Messung der PI-Aufnahme (s. Abb. 11) nach der Chou-Talalay-Methode mithilfe der Software CompuSyn ermittelt.

Um den Effekt der Kombinationsbehandlung von dem PARP-Inhibitor Olaparib und dem ATR-Inhibitor VE-821 auch in einem anderen Knochentumor zu untersuchen, wurde als isolierter Versuch auch eine Kombinationsbehandlung an der p53-Null-Osteosarkomzelllinie SaOS-2 durchgeführt. Das Osteosarkom stellt den häufigsten malignen Knochentumor dar, der 3,4 % aller kindlichen Tumoren und 56 % der malignen Knochentumoren im Kindesalter ausmacht (Geller und Gorlick 2010). Wie in Abb. 11 und Tab. 15 zu ersehen ist, wurden interessanterweise auch in den SaOS-2-Zellen in zu den Versuchen mit den A673-Zellen identischen Konzentrationen mit CI-Werten von 0,451-0,164 bei 2 μM VE-821 und 0,651-0,228 bei 5 μM VE-821 synergistische bis starke synergistische Effekte durch die Kombinationsbehandlung mit Olaparib und VE-821 erzielt.

5.2 Zelltod und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk

Durch die Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk sollte untersucht werden, inwieweit sich bei den drei verschiedenen Ewing-Sarkomzelllinien A673, WE-68 und SK-ES-1 die PI- und DiOC₆(3)-Messungen durch Inhibierung der Apoptose veränderten.

5.2.1 A673-Zellen

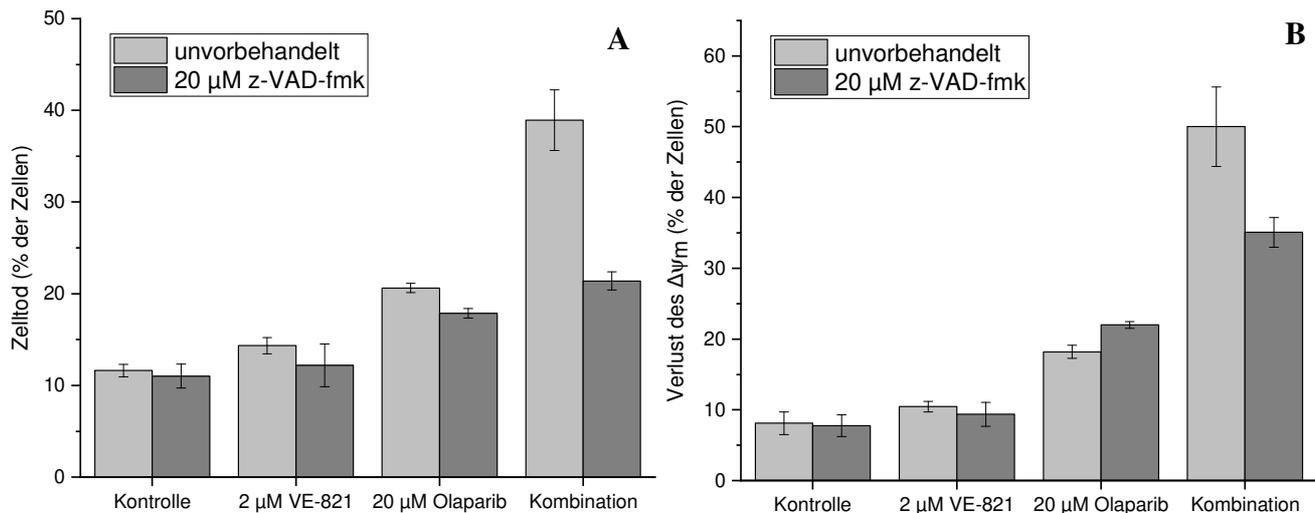


Abb. 12: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in A673-Zellen. Nachdem die eine Hälfte der Proben mit z-VAD-fmk vorinkubiert worden war, wurden die Zellen nach 2 h mit VE-821 und Olaparib je einzeln und in Kombination behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod mithilfe der Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels Anfärbung durch DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Im Einklang mit den Durchflusszytometrie-Messungen mit PI und DiOC₆(3) (s. Kap. 5.1.1) zeigte sich in Abb. 12 bei der Einzelbehandlung der A673-Zellen mit 2 μM VE-821 ein schwacher Anstieg des Zelltods und des Verlusts vom $\Delta\Psi_m$ gegenüber der Kontrolle. Durch die Einzelbehandlung mit 20 μM Olaparib fand eine deutlichere Verstärkung der beiden Messparameter auf 20,6 % bzw. 18,2 % und somit etwa jeweils die Verdopplung des Kontrollwerts statt. Bei der Kombination beider Wirkstoffe waren Zelltod und $\Delta\Psi_m$ entsprechend dem starken synergistischen Effekt der Substanzen bei dieser Zelllinie um ein 4- bis 5-faches gegenüber der Kontrolle erhöht.

Durch die Zugabe von 20 μM z-VAD-fmk kam es durch Blockade der Caspasen bei der Kombinationsbehandlung zu einer Verringerung des Zelltods auf etwa die Hälfte.

Gleichfalls führte die Gabe von z-VAD-fmk bei der Kombinationsbehandlung zu einer Verringerung des Verlusts von $\Delta\Psi_m$, obwohl das Ausmaß der Veränderung durch z-VAD-fmk hier schwächer ausgeprägt war als bei der Analyse des Zelltods.

5.2.2 WE-68-Zellen

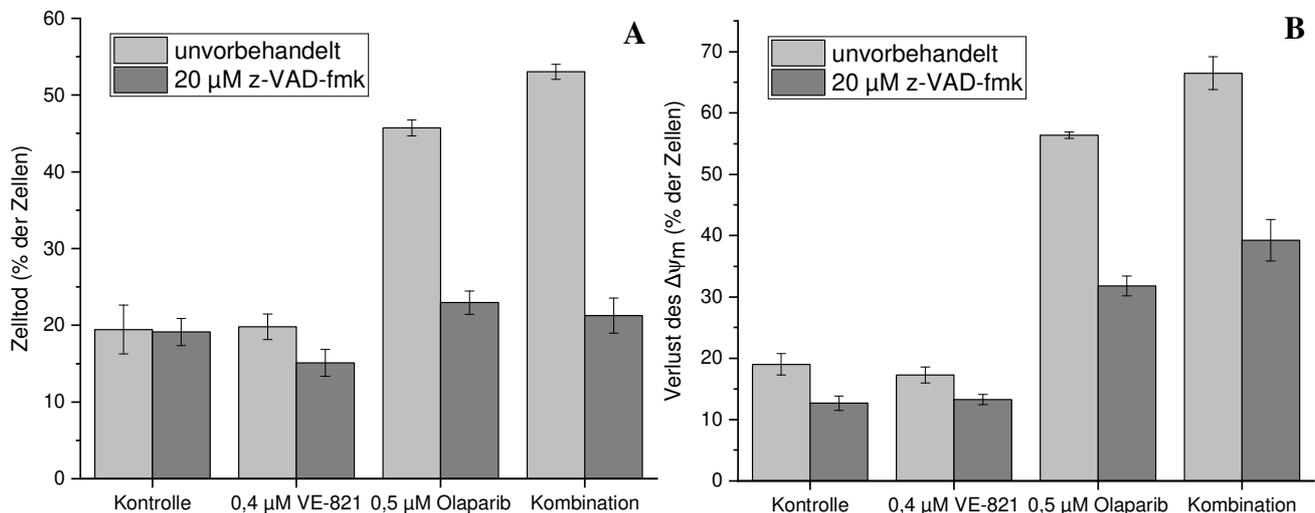


Abb. 13: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in WE-68-Zellen. Nachdem die eine Hälfte der Proben mit z-VAD-fmk vorinkubiert worden war, wurden die Zellen nach 2 h mit VE-821 und Olaparib je einzeln und in Kombination behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod mithilfe der Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels Anfärbung durch DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Auch bei der WE-68-Zelllinie bestätigten sich bei Betrachtung der Werte in Abb. 13 ohne Zugabe von zVAD-fmk die schon in den oben beschriebenen Versuchen ermittelten Effekte: Olaparib besaß bei einer Konzentration von 0,5 μM schon einen recht starken zytotoxischen Effekt, der durch die zusätzliche Gabe von 0,4 μM VE-821 nur leicht stieg. Beachtlich war allerdings das Ausmaß der Verringerung sowohl des Zelltods als auch des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ durch die Gabe von 20 μM z-VAD-fmk. Mit zugegebenem z-VAD-fmk sank der Anteil sowohl der mit PI als auch der mit DiOC₆(3) angefärbten Zellen bei der Olaparib-Einzeldosis und bei der Kombinationsbehandlung bei Betrachtung des Zelltods um mehr als die Hälfte. Auch der Verlust von $\Delta\Psi_m$ war ohne die zusätzliche Gabe von z-VAD-fmk in diesen beiden Behandlungen fast doppelt so hoch ausgeprägt.

5.2.3 SK-ES-1-Zellen

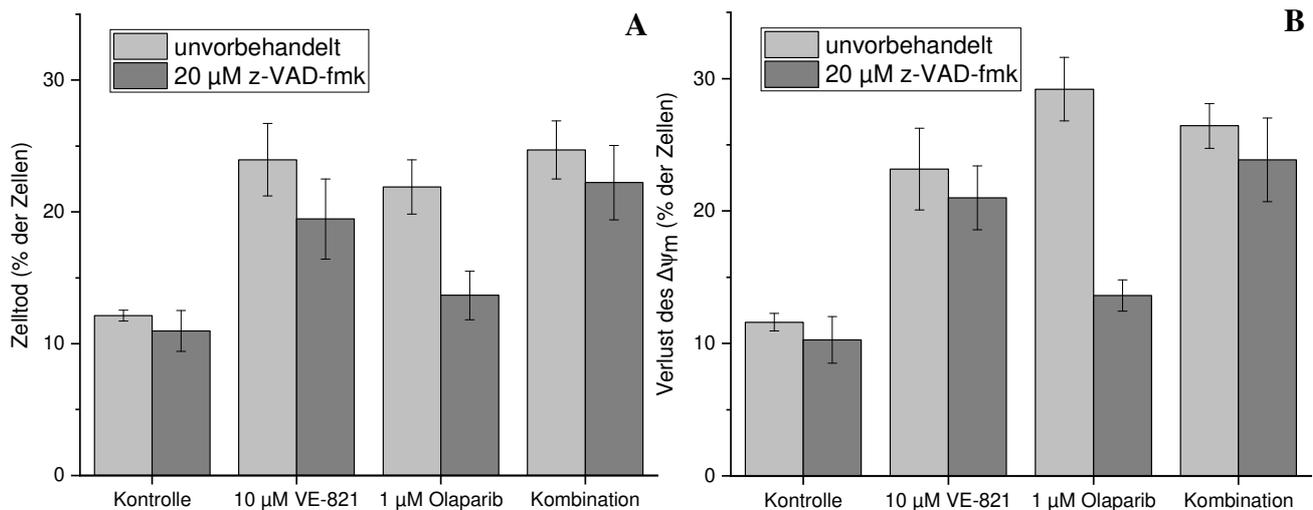


Abb. 14: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in SK-ES-1-Zellen. Nachdem die eine Hälfte der Proben mit z-VAD-fmk vorinkubiert worden war, wurden die Zellen nach 2 h mit VE-821 und Olaparib je einzeln und in Kombination behandelt. Nach 48 h wurden der Zelltod mithilfe der Analyse der PI-Aufnahme der Zellen und der Verlust des $\Delta\Psi_m$ mittels Anfärbung durch DiOC₆(3) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Analog zur Betrachtung der oben dargelegten Versuche stiegen bei der Zelllinie SK-ES-1 durch die Einzelbehandlung mit VE-821 und Olaparib Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ an, mit der Kombinationsbehandlung beider Wirkstoffe kam es allerdings zu keiner zusätzlichen Steigerung der einzelnen Parameter (s. Abb. 14). Eine Verringerung des Zelltods und $\Delta\Psi_m$ -Verlusts durch Gabe von 20 μM z-VAD-fmk ließ sich bei der Einzelbehandlung mit 1 μM Olaparib feststellen. Hier betrug die Werte durch Zugabe des Pancaspase-Inhibitors jeweils nur etwa die Hälfte. Auffällig war bei diesen Zellen allerdings das Ausbleiben einer durch z-VAD-fmk induzierten Abnahme von Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ bei der VE-821-Einzelbehandlung und Kombinationsbehandlung. Hier unterschieden sich die SK-ES-1-Zellen von den A673- und WE-68-Zellen, deren Zellen mit einer deutlichen Verringerung des Zelltods auf z-VAD-fmk reagierten.

5.3 Caspase-3-Aktivitätsmessung

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in den Versuchen mit z-VAD-fmk sollte mithilfe der Aktivitätsmessung der Caspase-3 eine mögliche Induktion der Apoptose durch die Behandlung mit Olaparib und der Kombination mit VE-821 überprüft werden.

Mit dieser Messung kann die in apoptotischen Zellen gesteigerte Aktivität der Caspase-3 relativ zur unbehandelten Kontrollprobe bestimmt und quantifiziert werden.

5.3.1 A673-Zellen

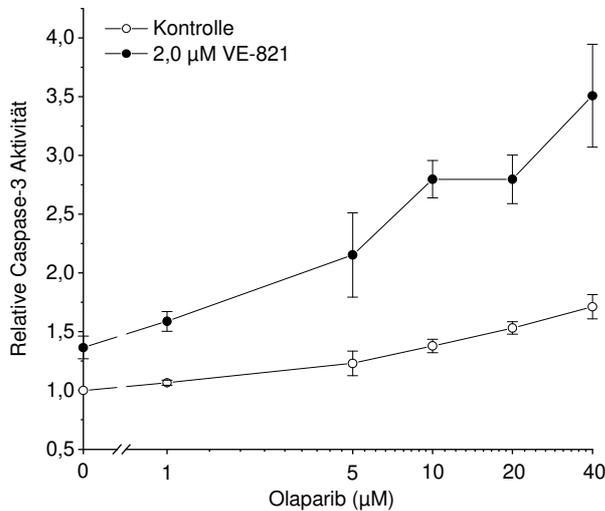


Abb. 15: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in A673-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib und VE-821 behandelt. Nach 24 h wurde die Caspase-3-Aktivität mithilfe des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC am Fluoreszenzphotometer ermittelt. Die relative Caspase-3-Aktivität stellt das Verhältnis von behandelten zu unbehandelten Zellen dar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

In A673-Zellen nahm die Aktivität der Caspase-3 mit aufsteigender Olaparib-Konzentration leicht zu und steigerte sich bei 40 μ M Olaparib bis auf die 1,6-fache Aktivität gegenüber derjenigen unbehandelter Zellen (s. Abb. 15). Bei der Einzelbehandlung mit 2,0 μ M VE-821 betrug die Aktivität das 1,4-fache der Kontrollaktivität. Die Kombinationsbehandlung beider Wirkstoffe zeigte bei steigenden Olaparib-Konzentrationen eine deutliche Divergenz der Kurve mit starker Zunahme der Aktivität der Caspase-3 bis auf das 3,5-fache des Ausgangswerts. Analog zur Betrachtung des synergistischen Effekts der Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 auf Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ bei A673-Zellen erfuhren diese Werte bei Kombination der Wirkstoffe eine überadditive Steigerung.

5.3.2 WE-68-Zellen

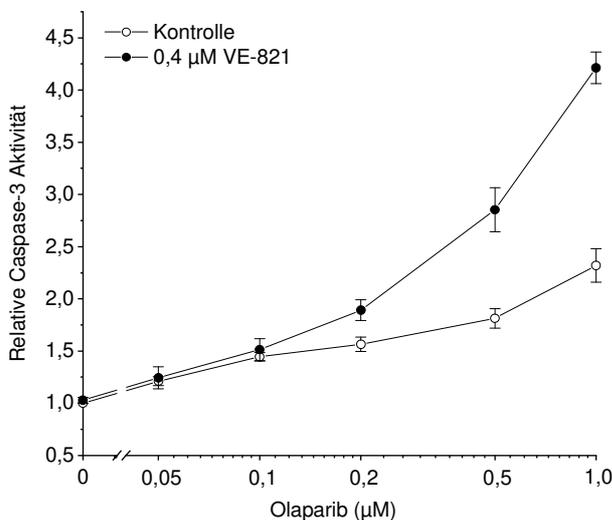


Abb. 16: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in WE-68-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib und VE-821 behandelt. Nach 24 h wurde die Caspase-3-Aktivität mithilfe des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC am Fluoreszenzphotometer ermittelt. Die relative Caspase-3-Aktivität stellt das Verhältnis von behandelten zu unbehandelten Zellen dar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

In den WE-68-Zellen zeigte sich mit zunehmenden Olaparib-Konzentrationen eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität bis auf das 2,3-fache im Vergleich zur Aktivität in der Nullprobe (s. Abb. 16). Während die Caspase-3-Aktivität bei Einzelgabe von VE-821 keine Unterschiede zur Kontrolle aufwies, kam es bei Kombination mit Olaparib zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung besonders bei höheren Konzentrationen von Olaparib gegenüber der Olaparib-Einzelbehandlung. Die Aktivität erhöhte sich bei 1,0 μM Olaparib durch zusätzliche Gabe von VE-821 so um etwa das Doppelte.

5.3.3 SK-ES-1-Zellen

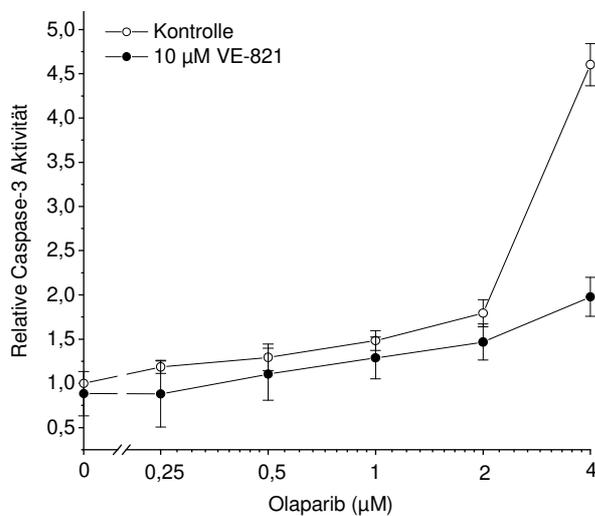


Abb. 17: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in SK-ES-1-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Olaparib und VE-821 behandelt. Nach 24 h wurde die Caspase-3-Aktivität mithilfe des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC am Fluoreszenzphotometer ermittelt. Die relative Caspase-3-Aktivität stellt das Verhältnis von behandelten zu unbehandelten Zellen dar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 17 dargestellt, führten zunehmende Konzentrationen von Olaparib in SK-ES-1-Zellen zunächst zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität auf das 1,8-fache bei 2 μM . Zwischen 2 μM und 4 μM Olaparib kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Caspase-3-Aktivität auf die 4,6-fache Aktivität gegenüber dem Ausgangswert. Während die Einzelbehandlung mit 10 μM VE-821 keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle erbrachte, führte die Kombinationsbehandlung beider Hemmstoffe zwar auch zur Steigerung der Caspase-3-Aktivität in aufsteigenden Olaparib-Konzentrationen, abweichend zu den beiden anderen untersuchten Ewing-Sarkomzelllinien A673 und WE-68 (s. o.) jedoch zu keiner Erhöhung gegenüber der Olaparib-Einzelbehandlung. Besonders bei der starken Zunahme der Caspase-3-Aktivität zwischen 2 und 4 μM Olaparib blieb die Aktivitätszunahme bei zusätzlicher Gabe von 10 μM VE-821 aus und die Aktivität signifikant unter derjenigen der Einzelbehandlung.

5.4 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die Effekte der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und VE-821 auf die Genexpression in A673- und WE-68-Zellen wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Für diese Versuchsreihe wurden die beiden Zelllinien mit bestimmten aus den durchflusszytometrischen Versuchen ermittelten Konzentrationen beider Wirkstoffe jeweils einzeln und in Kombination behandelt und nach 24 h auf quantitative Veränderungen der Genexpression verschiedener Gene untersucht, die mithilfe ihrer codierten Proteine u. a. in apoptotische Zellvorgänge und Zellzyklusarrest eingreifen. Im Folgenden sind diejenigen Ergebnisse aufgeführt, bei denen sich Differenzen $> \pm 0,5$ bei den einzelnen Zelllinien zeigten.

5.4.1 Gene für proapoptische Proteine

Im Zuge der PCR-Messungen wurden mögliche Veränderungen der Genexpression proapoptischer Proteine untersucht, die als Mitglieder der Bcl-2-Familie in die Regulation der Apoptose eingebunden sind. Proteine der Bcl-2-Familie formen Hetero- oder Homodimere und können als pro- oder antiapoptische Modulatoren innerhalb der Zelle agieren, wobei im Folgenden (s. Abb. 18) die proapoptischen Vertreter *PUMA (BBC3)*, *NOXA (PMAIP1)*, *BAX* und *BIM (BCL2L1)* untersucht wurden.

Das vom Gen *PUMA (BBC3)* codierte Protein führt bei Aktivierung unter Kooperation mit anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zum Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie zur Caspasenaktivierung und dadurch über den intrinsischen Weg zur Apoptose der Zelle (Singh et al. 2019). Durch die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und VE-821 zeigte sich in beiden Zelllinien eine deutliche Induktion der *PUMA*-Expression. So wiesen die A673-Zellen eine Steigerung auf über das 3,5-fache und die WE-68-Zellen auf das 4-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Auch die Einzelbehandlung mit Olaparib führte in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Zunahme, während dieser Effekt bei der Einzelbehandlung mit VE-821 besonders in den WE-68-Zellen deutlich geringer ausfiel.

NOXA (PMAIP1) wird durch p53, dsDNA und Viren induziert und fördert den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie den Efflux weiterer apoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium in das Zytosol (Singh et al. 2019). Interessanterweise führte bei den A673-Zellen (p53-Null) 0,4 μ M VE-821 zu einer ca. 1,5-fachen, 0,5 μ M Olaparib zu einer 2,3-fachen und die Kombinationsbehandlung sogar zu einer starken Expressionssteigerung auf das etwa 3,3-fache, während sich in den p53-Wildtyp-Zellen WE-68 keine wesentlichen Änderungen zeigten.

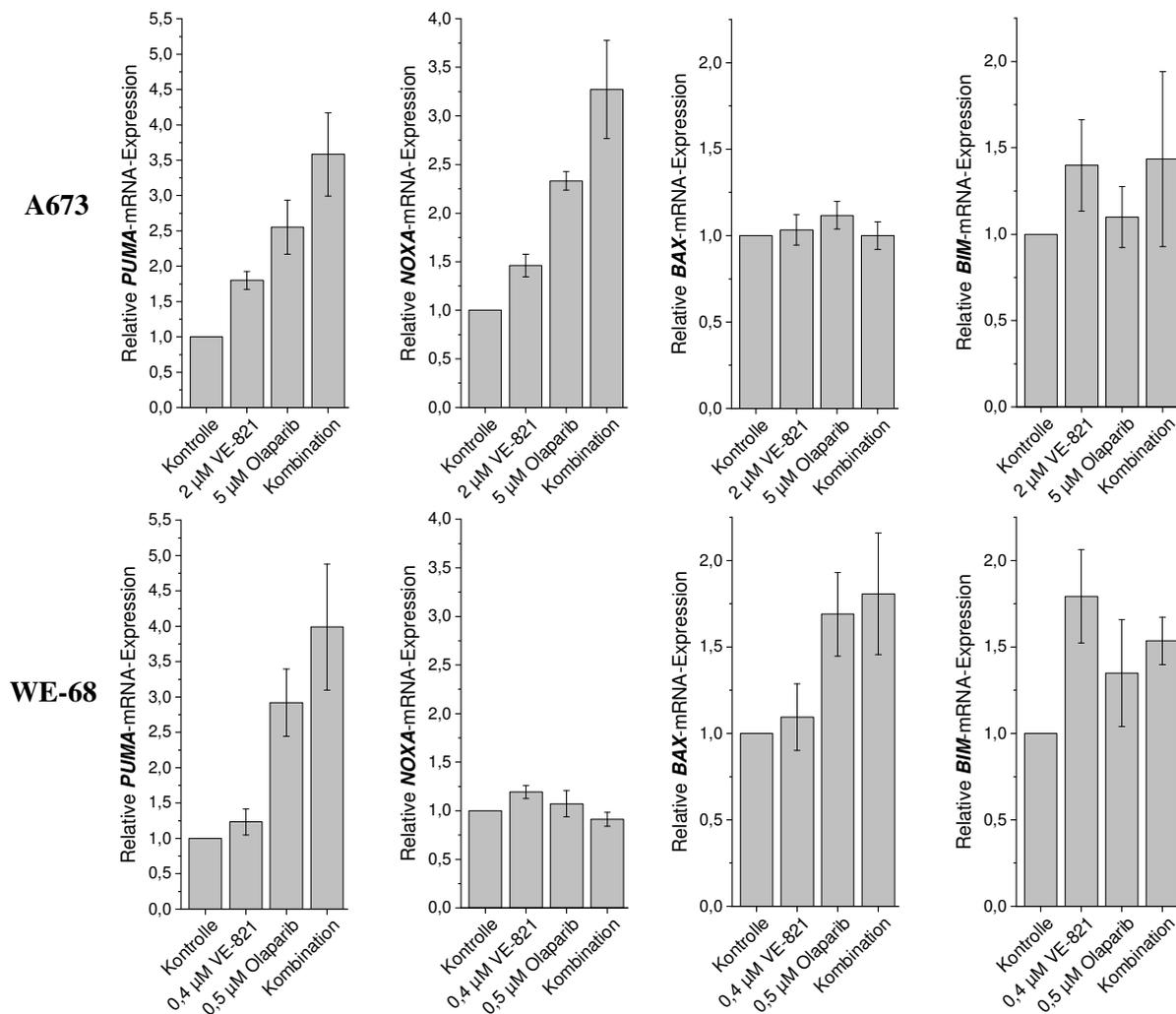


Abb. 18: Relative Änderungen der Genexpression von PUMA, NOXA, BAX und BIM durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68. Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen aus VE-821 und Olaparib in Einzel- und Kombinationsbehandlung inkubiert und nach 24 h die quantitative Genexpression von PUMA, NOXA, BAX und BIM per Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Auch das durch den Tumorsuppressor p53 in seiner Expression regulierte BAX codiert ein proapoptotisches Protein, das durch Interaktion mit dem mitochondrialen stromabhängigen Anionenkanal (VDAC) zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und damit zur Freisetzung von Cytochrom c führt (Singh et al. 2019). In den A673-Zellen zeigte sich in keiner Behandlung ein nennenswerter Effekt, die WE-68-Zelllinie wies jedoch insbesondere durch die Einzelbehandlung mit Olaparib und dessen Kombination mit VE-821 einen Anstieg der Genexpression bis um das 1,8-fache auf.

Die Auswertung der Ergebnisse des ebenfalls proapoptotischen Gens *BIM* (*BCL2L11*) innerhalb der einzelnen Behandlungen war nicht eindeutig, da hier der Standardfehler etwas größer ausfiel und so eine exakte Interpretation der Daten erschwerte. Es ließ sich allerdings

festhalten, dass insbesondere die Einzelbehandlung mit den verwendeten Konzentrationen an VE-821 in beiden Zelllinien zu einer Verstärkung der Expression von BIM führte, die bei den WE-68-Zellen das 1,8-fache betrug.

5.4.2 Gene für DNA-Schadensantwort-Proteine

Zusätzlich wurde in den RT-PCR-Messungen die Expression dreier Gene untersucht, deren Proteine bei DNA-Schäden funktionell eng miteinander interagieren und deren Reparatur bzw. die Zellzykluskontrolle einleiten. Bestimmt wurden die Expressionen der Gene *CDKN1A*, das für p21 codiert, *MDM2* sowie in den WE-68-Zellen zusätzlich *TP53* für p53 (s. Abb. 19). Die Funktionen der von diesen Genen codierten Proteine werden ausführlich im Kap. 2.2.3 erläutert.

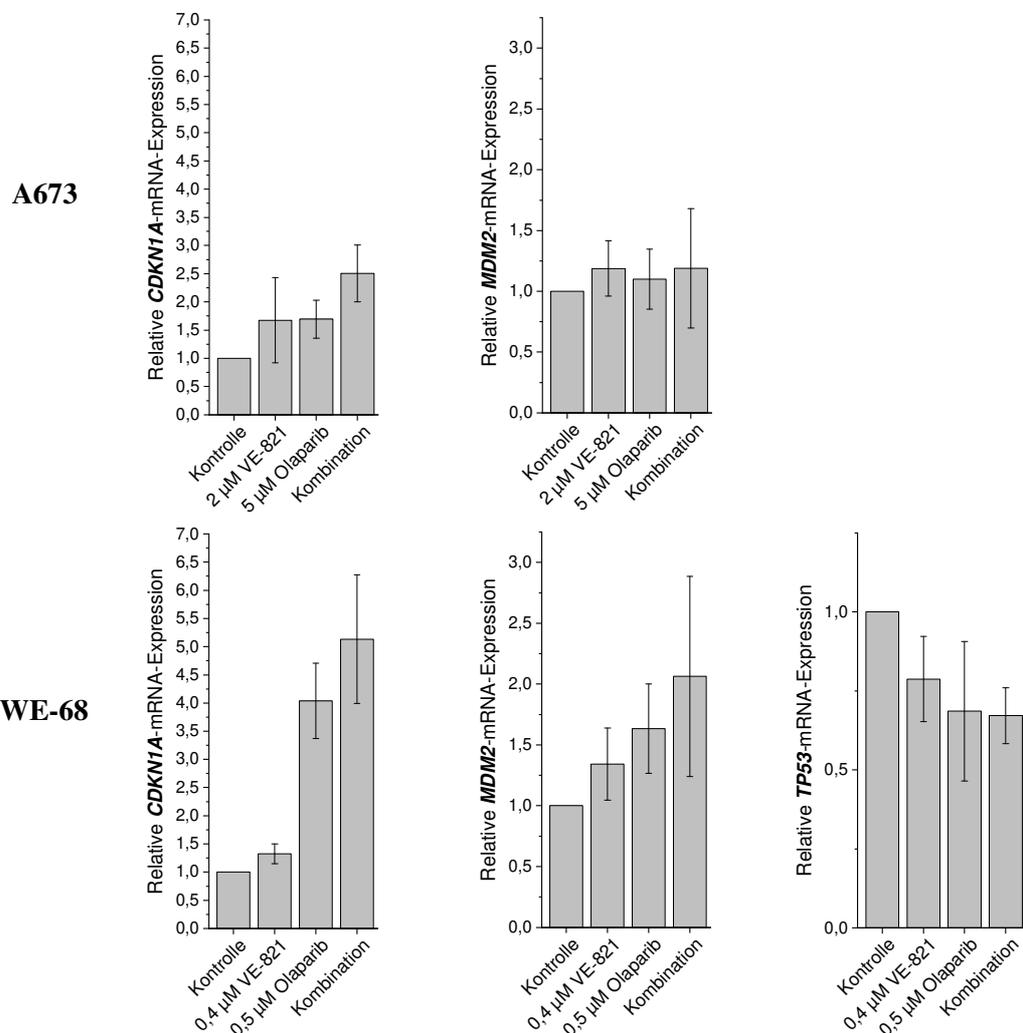


Abb. 19: Relative Änderungen der Genexpression von *CDKN1A*, *MDM2* und *TP53* durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68. Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen aus VE-821 und Olaparib in Einzel- und Kombinationsbehandlung inkubiert und nach 24 h die quantitative Genexpression von *CDKN1A*, *MDM2* und *TP53* (nur WE-68-Zellen) per Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Bei Betrachtung des für p21 codierenden *CDKN1A* zeigte sich in den A673-Zellen durch die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und VE-821 eine Steigerung der Geneexpression um das 2,5-fache gegenüber dem Ausgangswert der Kontrolle. Auch die Einzelbehandlungen mit den beiden Wirkstoffen erfuhren jeweils etwa eine Induktion mit Verstärkung auf die etwa 1,7-fache Expression.

In den WE-68-Zellen war sogar ein noch wesentlich stärkerer Effekt darstellbar: Durch die Einzelbehandlung mit 0,5 μM Olaparib stieg die Genexpression von *CDKN1A* um das 4-fache, in Kombination mit zusätzlich 0,4 μM VE-821 wurde diese auf das 5,1-fache gegenüber der Kontrolle verstärkt.

Die *MDM2*-Expression stellte sich in A673-Zellen ohne Unterschiede dar. In WE-68-Zellen waren die Ergebnisse der *MDM2*-Expression zwar durch höhere Standardfehler geprägt, legten aber nahe, dass die Kombinationsbehandlung wie auch durch die Einzelbehandlung mit 0,5 μM Olaparib zu einer schwachen Induktion von *MDM2* führte.

Interessanterweise kam es in den WE-68-Zellen durch die Behandlung mit den einzelnen Wirkstoffen VE-821 und Olaparib und besonders deren Kombination zu einer Verringerung der Genexpression von *TP53* auf bis zu 0,67 des Ausgangswerts.

5.4.3 Andere untersuchte Gene

In den drei untersuchten Genen *ATR*, *BRCA-1* und *EWS-FLI1* zeigten sich in beiden Zelllinien nur schwache Effekte durch die Einzel- und Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821. Zum Vergleich mit den folgenden Ergebnissen der Western Blots bzw. aufgrund der genomischen Ähnlichkeit von Ewing-Sarkomzellen zu *BRCA-1*-mutierten Zellen sind sie allerdings in der Gesamtschau in Abb. 20 mit aufgeführt.

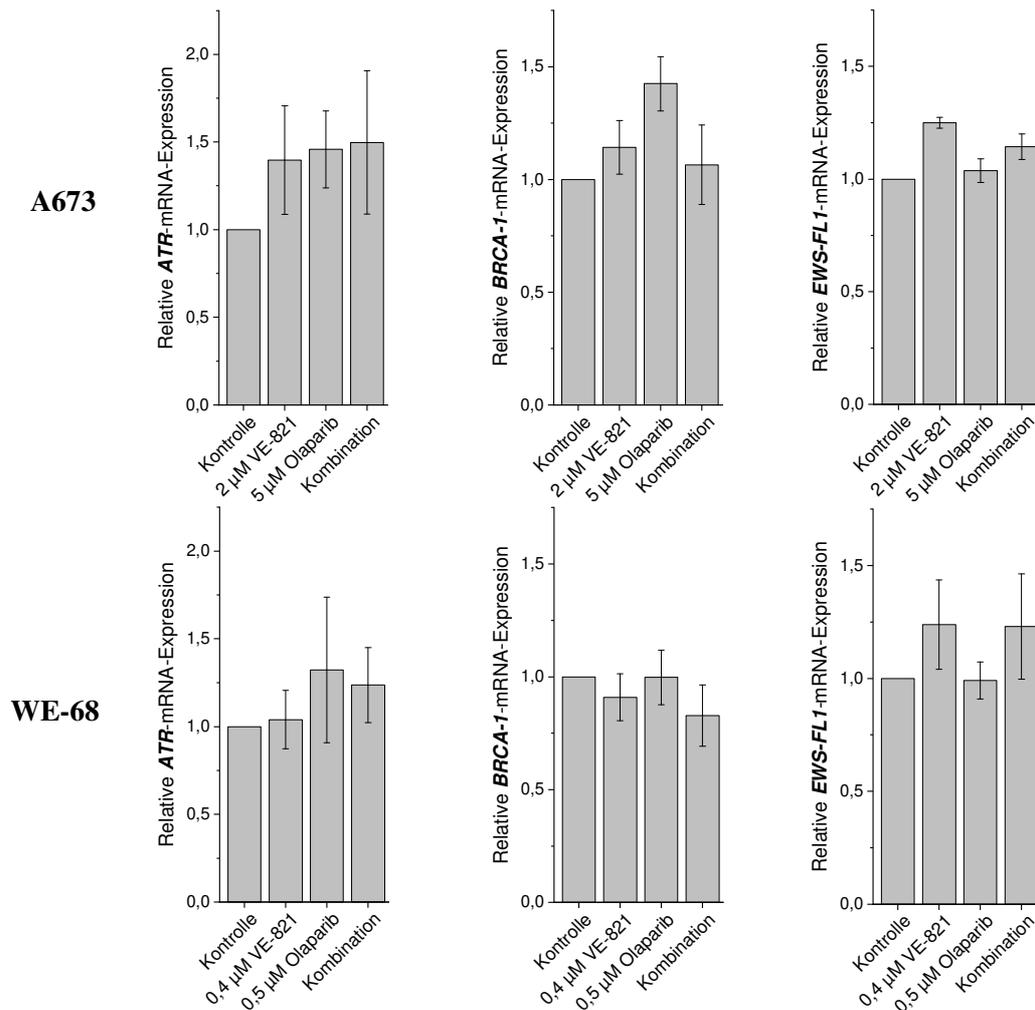


Abb. 20: Relative Änderungen der Genexpression von ATR, BRCA-1 und EWS-FL1 durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68. Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen aus VE-821 und Olaparib in Einzel- und Kombinationsbehandlung inkubiert und nach 24 h die quantitative Genexpression von ATR, BRCA-1 und EWS-FL1 per Echtzeit-RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

5.5 Western Blots

Mithilfe von Western Blots wurde untersucht, inwieweit sich die Behandlung mit Olaparib und VE-821 sowie deren Kombination auf bestimmte Proteinlevel in den Zelllinien A673 und WE-68 auswirkte. Für eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente wurden die jeweils gleichen Konzentrationen wie bei der RT-PCR verwendet. Dabei wurden die Zellen sowohl nach 2 h als auch nach 24 h lysiert. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt und im Folgenden je ein Western Blot für eine der beiden Zelllinien exemplarisch für die Versuchsergebnisse (Abb. 21 und Abb. 22) abgebildet. Als Ladekontrollen und Vergleich gleichmäßiger Proteinmengen innerhalb der Gelelektrophoresetaschen wurden die ubiquitär und konstitutiv exprimierten Proteine Vinculin und α -Tubulin bei jedem Versuch mitbestimmt.

5.5.1 A673-Zellen

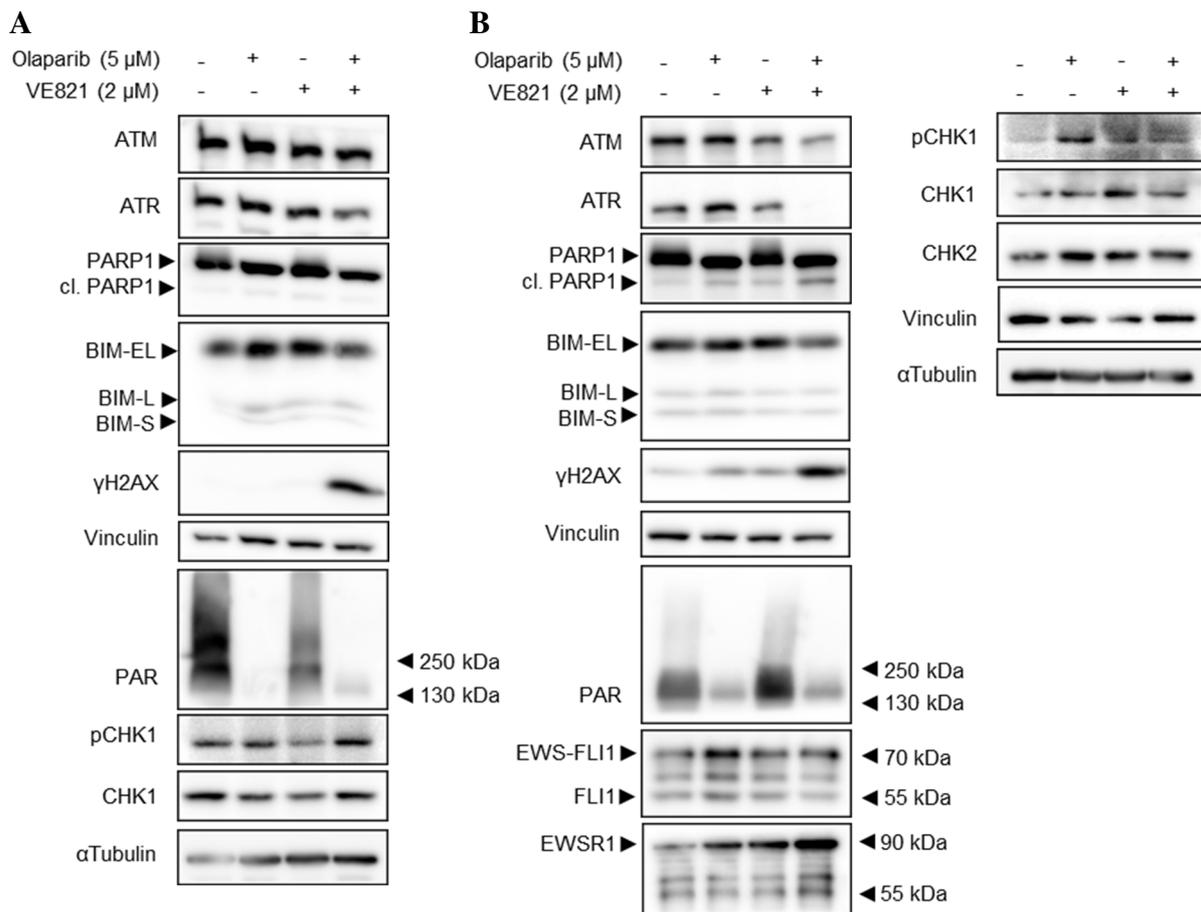


Abb. 21: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen durch Olaparib und VE-821 in A673-Zellen nach 2 h (A) und 24 h (B). Die Zellen wurden mit 5 μ M Olaparib und 2 μ M VE-821 behandelt. Nach 2 h und 24 h wurden Proteinlysate erstellt und die Veränderungen der Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen anschließend per Western Blot dargestellt.

In den A673-Zellen induzierte die Kombination aus 5 μ M Olaparib und 2 μ M VE-821 schon nach 2 h einen starken Anstieg der Konzentration an γ H2AX, dessen Akkumulation als indirektes Maß für DNA-Schäden gelten kann. Die hohe Konzentration von γ H2AX blieb auch nach 24 h bestehen. Auch die jeweilige Einzelbehandlung mit Olaparib und VE-821 führte zu einem schwachen Konzentrationsanstieg gegenüber der Kontrolle, allerdings in einem deutlich schwächeren Ausmaß als die Kombination beider Wirkstoffe. Die Kombinationsbehandlung bewirkte außerdem nach 24 h die Verringerung der Level an ATR und, etwas schwächer ausgeprägt, der Konzentration an ATM innerhalb der Zellen. Die Konzentration des in der Kontrolle deutlich ausgeprägt vorhandenen PAR war bei jeder Behandlung, in der Olaparib enthalten war, deutlich niedriger als in den beiden Behandlungen ohne den PARP-Inhibitor.

Die Einzelbehandlung mit 5 μ M Olaparib führte nach 24 h zu einer leichten Induktion des für das Ewing-Sarkom charakteristischen Fusionsproteins EWS-FLI1 und seiner Komponente

EWSR1, dessen Konzentration besonders durch die Kombinationsbehandlung anstieg. EWSR1 reguliert die RNA-Polymerase II und das Splicing der DNA und sorgt so u. a. für genomische Stabilität. Die Konzentrationen von CHK1, dessen phosphorylierte und damit aktivierte Form pCHK1 u. a. entscheidend zur Initiierung des Zellzyklusarrestes beiträgt, und pCHK1 schienen nach 2 h bei der Einzelgabe von VE-821 leicht vermindert zu sein. Nach 24 h waren die Effekte allerdings nicht deutlich ausgeprägt: Hier fand sich eine leichte Induktion bei allen Behandlungen gegenüber der Kontrolle. Die Proteinkonzentrationen von BIM, PARP1 und CHK2 unterschieden sich nicht wesentlich zur Kontrolle.

5.5.2 WE-68-Zellen

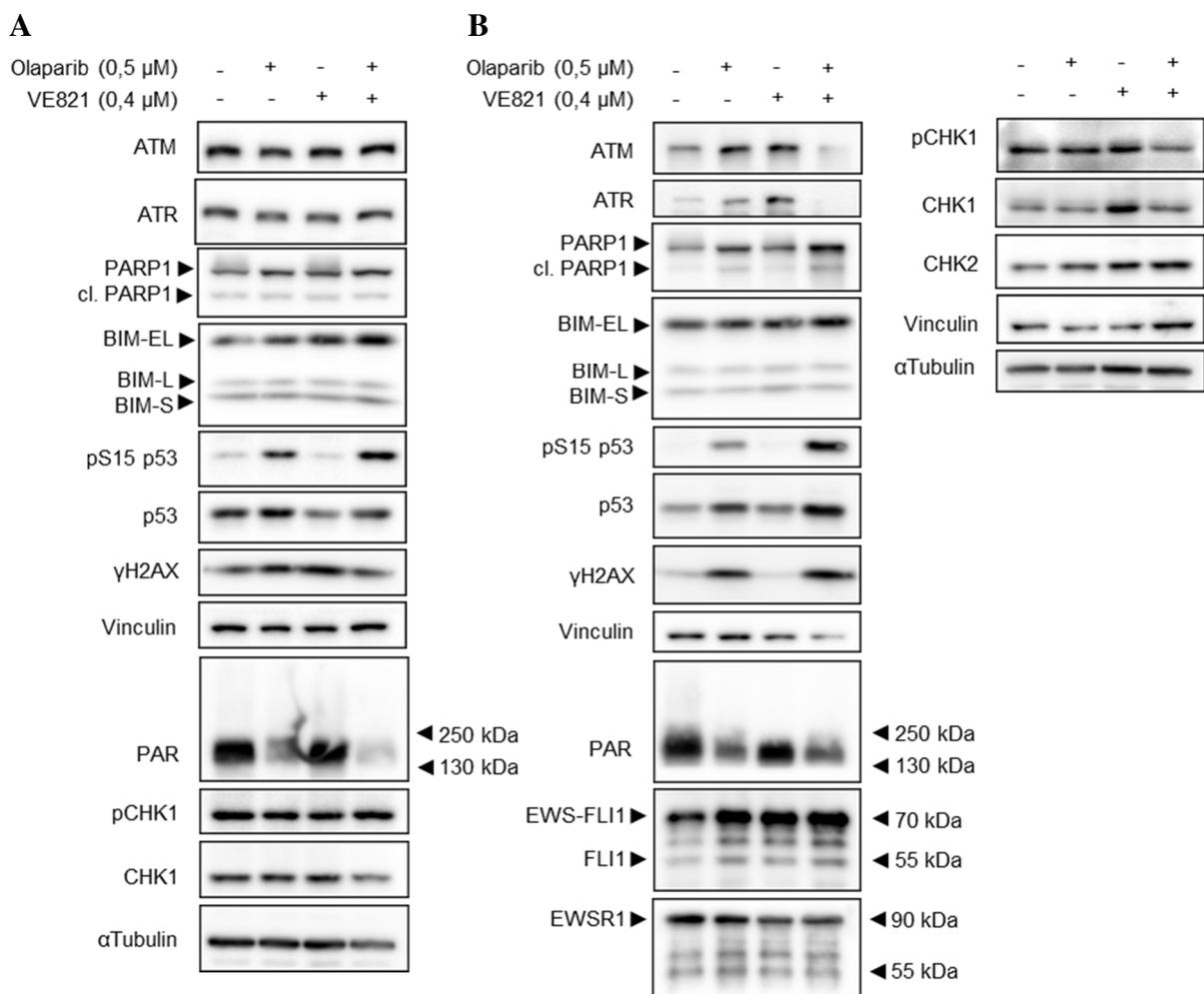


Abb. 22: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen durch Olaparib und VE-821 in WE-68-Zellen nach 2 h (A) und 24 h (B). Die Zellen wurden mit 0,5 μ M Olaparib und 0,4 μ M VE-821 behandelt. Nach 2 h und 24 h wurden Proteinlysate erstellt und die Veränderungen der Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen anschließend per Western Blot dargestellt.

Auch in den WE-68-Zellen fand nach 24 h durch die Kombination aus 0,5 μM Olaparib und 0,4 μM VE-821 eine deutliche Induktion von γH2AX statt, die ein hohes Ausmaß an DNA-Schäden verdeutlichte. Ähnlich zu den durchflusszytometrischen Versuchen sprach die prominente Bande bei der Einzelbehandlung mit Olaparib nach 24 h dafür, dass diese Zellen allerdings auch schon durch 0,5 μM Olaparib stark geschädigt wurden. Der gemeinsame Effekt der Kombination schien dadurch im Gegensatz zu den A673-Zellen etwas schwächer auszufallen. Nach 2 h waren die DNA-Schäden allerdings noch nicht stark ausgeprägt, hier fanden sich nur unwesentliche Änderungen der γH2AX -Konzentrationen gegenüber der Kontrolle.

Die Untersuchung der in den p53-Null-Zellen der A673 nicht beobachtbaren intrazellulären Proteinlevel an p53 zeigte eine deutliche Zunahme von p53 ziemlich analog zum Ausmaß der Konzentrationen an γH2AX . Bei DNA-Schäden wird p53 durch Kinasen u. a. an der Stelle Ser15 phosphoryliert und damit aktiviert. In den Versuchen wurde eine deutliche Induktion von pS15-p53 durch die Kombinationsbehandlung und im schwächeren Ausmaß auch durch die Einzelbehandlung mit 0,5 μM Olaparib festgestellt.

Die Konzentrationsverminderungen von ATM und ATR durch die Kombinationsbehandlung erschienen ähnlich zu den gleichartigen Veränderungen, die in den A673-Zellen beobachtet wurden. Ebenso verminderte sich die Konzentration von PAR bei Gabe des PARP-Inhibitors Olaparib. Im Gegensatz zu den A673-Zellen führte die Kombination allerdings nach 24 h zu einer leichten Induktion von PARP1.

Nach 24 h zeigte sich analog zu den A673-Zellen eine leichte Induktion von CHK1 in der Einzelbehandlung mit VE-821. Bei den restlichen untersuchten Proteinen kam es allerdings zu keiner wesentlichen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

5.6 Zellzyklusanalyse

Um zu untersuchen, ob sich durch die Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 bei den Ewing-Sarkomzelllinien A673 und WE-68 quantitative Änderungen in der Anzahl von Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus ergeben, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit beiden Wirkstoffen in den gleichen Konzentrationen wie bei der RT-PCR und Western Blot je als Einzelgabe und in Kombination behandelt und in jeweils drei Versuchen per Durchflusszytometrie die Quantität der Zellen in einzelnen Stadien des Zellzyklus bestimmt und prozentual dargestellt (s. Abb. 23).

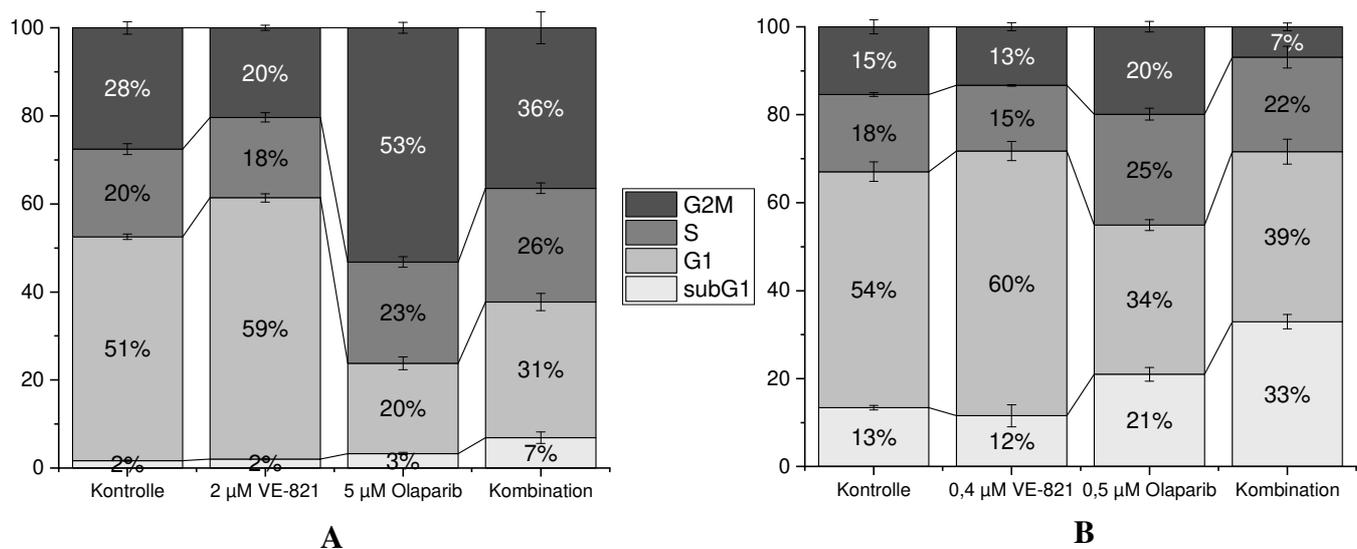


Abb. 23: Zellzyklusanalyse bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B). Die Zellen beider Zelllinien wurden mit VE-821 und Olaparib in Einzel- und in Kombinationsbehandlung behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen in Ethanol fixiert und der Zellzyklus durchflusszytometrisch nach PI-Aufnahme durch prozentualen Anteil der Zellen mit entsprechendem DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklus-Phasen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Schon in der Kontrolle beider Zelllinien zeigten sich leichte Unterschiede: Während sich in der WE-68-Zelllinie bereits 13 % der Zellen in der sub-G1-Phase befanden, betrug dieser Wert bei den A673-Zellen lediglich 2 %. Dafür lag in dieser Zelllinie gegenüber den WE-68-Zellen fast der doppelte Anteil von Zellen in der G2M-Phase vor. Die sub-G1-Phase ist typischerweise durch degradierte DNA charakterisiert, wie sie fragmentierte, apoptotische Zellen aufweisen. Analog zu den vorherigen durchflusszytometrischen Versuchen, die den synergistischen zytotoxischen Effekt von Olaparib und VE-821 auf A673-Zellen aufzeigten, nahm die sub-G1-Phase bei der Kombination der beiden Wirkstoffe gegenüber den jeweiligen Einzelbehandlungen zu. Bei den insgesamt deutlich empfindlicher auf die Behandlung mit Olaparib und die Kombination reagierenden WE-68-Zellen war der Anteil von Zellen in der sub-G1-Phase dementsprechend auch bei jeder Messung deutlich stärker ausgeprägt als bei den A673-Zellen. Entsprechend den PI-Aufnahme-Versuchen ließ sich auch hier durch die Kombination von Olaparib und VE-821 ein Anstieg der Zellen in der sub-G1-Phase beobachten.

Besonders auffällig war in beiden Zelllinien die Zunahme der Anzahl von Zellen in der G2-M-Phase durch die Einzelbehandlung mit Olaparib, die besonders bei den A673-Zellen mit 53 % sehr stark ausgeprägt war und mit einer deutlichen Verringerung von Zellen in der G1-Phase

auf 20 % einherging. Bei zusätzlicher oder einzelner Behandlung mit VE-821 sank dieser Anteil jedoch wieder und der G2-M-Arrest wurde aufgehoben. In den WE-68-Zellen waren diese Veränderungen durch die Olaparib-Einzelgabe und in Kombination mit VE-821 ebenfalls vorhanden, wenngleich ein wenig schwächer ausgeprägt.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Kombinationsbehandlung aus einem PARP-Inhibitor mit einem ATR- oder ATM-Inhibitor an drei verschiedenen Ewing-Sarkomzelllinien, die sich in ihrem p53-Status unterscheiden, untersucht und beschrieben. In den Versuchen zeigten sich für die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 oder KU-55933 in p53-Null-Zellen der A673 einen starken synergistischen Effekt aufwies, der in der synthetischen Letalität der Wirkstoffe begründet liegen kann. In den beiden anderen untersuchten Zelllinien fiel die Wirkung etwas weniger deutlich aus. So zeigte sich in den p53-Wildtyp-Zellen WE-68 ein heterogener Effekt mit meist nur schwachem bis mittelstarkem, z. T. aber auch starkem Synergismus der Wirkstoffe. In den p53-mutierten Zellen SK-ES-1 führte die Kombinationsbehandlung aus Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 allerdings lediglich zu einer additiven bis leicht antagonistischen Wirkung.

6.1 Thematischer Hintergrund

Obwohl in der Therapie des Ewing-Sarkoms durch die Etablierung von Therapieschemata mit mehreren Zytostatika (s. Kap. 2.1.5) in spezialisierten Zentren bereits signifikante Erfolge erzielt wurden, bleibt die Prognose insbesondere beim Vorliegen von Fernmetastasen (5-Jahres-Überlebensrate < 30 %) oder Auftreten von Rezidiven (< 20 %) weiterhin schlecht (Gaspar et al. 2015, Stahl et al. 2011). Durch die multimodale Therapie ist für die Patienten zudem mit erheblichen Nebenwirkungen zu rechnen (Marina et al. 2017), sodass weiterhin ein großer Bedarf und die dringliche Notwendigkeit bestehen, schonendere und zugleich effektivere Therapiestrategien für die Behandlung des Knochentumors zu entwickeln.

Das Ewing-Sarkom weist neben seinem onkogenetischen Charakteristikum, einer balancierten Translokation mit Beteiligung des *EWSRI*-Gens unter Bildung eines aberrierenden Transkriptionsfaktors, gegenüber anderen Tumoren ein vergleichsweise stabiles und gering verändertes Genom auf, das die gezielte Krebstherapie (engl. *targeted therapy*) gegen diese Tumorzellen erschwert (Crompton et al. 2014, Tirode et al. 2014). Versuche der gezielten Therapie mit Beeinflussung bzw. Inhibition von EWS-FLI1 haben sich bis jetzt als wirkungslos erwiesen (Casey et al. 2019, Gaspar et al. 2015).

Durch die Inhibition von PARP-1 verliert die Zelle nicht nur die Fähigkeit, mögliche Einzelstrangbrüche suffizient zu reparieren, es treten zusätzlich auch replikations-assoziierte

Doppelstrangbrüche auf (s. Kap. 2.4). Für ihr Überleben ist die Zelle daher auf intakte Mechanismen der DNA-Doppelstrang-Reparatur wie der HR angewiesen, die in Ewing-Sarkomzellen und BRCA-1-mutierten Tumorzellen häufig Defekte aufweisen (Deeks 2015). Außerdem weisen Ewing-Sarkomzellen aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften mit der Expression des aberrierenden Transkriptionsfaktors EWS-FLI1 ein hohes Ausmaß an replikativem Stress auf, der sie besonders abhängig von u. a. durch ATR und ATM initiierten Reparaturmechanismen macht (Nieto-Soler et al. 2016). Da diese auch an der Reparatur von DSBs beteiligt sind, die unter der Therapie mit PARP-Inhibitoren auftreten können, besteht die realistische Möglichkeit, durch eine Kombination aus PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren eine Wirkungsmaximierung im Sinne einer synthetischen Letalität in Ewing-Sarkomzellen zu erzielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Olaparib in Kombination mit dem in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten ATM-Inhibitor KU-55933 in p53-defizienten kolorektalen Tumorzellen synergistische Effekte aufweist; ähnliche vielversprechende Ergebnisse wurden auch in Kombination mit einem ATR-Inhibitor in BRCA-1-mutierten Ovarialkarzinomzellen und in Kombination mit dem ATR-Inhibitor Ceralasertib in verschiedenen ATM-defizienten Tumorzellen erbracht (Wang et al. 2017, Burgess et al. 2020, Lloyd et al. 2020).

6.2 Bewertung des p53-Status der verwendeten Zelllinien

Die Verwendung dreier unterschiedlicher Zelllinien mit je unterschiedlichem p53-Status wurde vorgenommen, da p53-mutierte Ewing-Sarkome im Patientenkollektiv, wenngleich in nur 10 % der Fälle weniger häufig vorkommend, mit einer deutlich höheren Metastasierungsrate und Prognoseverschlechterung einhergehen (s. Kap. 2.1.7) (Tirode et al. 2014, Huang et al. 2005). Aus dieser Mutation resultieren allerdings unterschiedliche zelluläre Eigenschaften, die mit einem veränderten Verhalten gegenüber der Behandlung einhergehen und in manchen Fällen sogar zu einer Chemoresistenz gegenüber Zytostatika beitragen können (Parrales und Iwakuma 2015). Um den Einfluss von mutiertem p53 auch bei der Wirkstoffbehandlung mit PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren identifizieren zu können, wurden die Ergebnisse dreier verschiedener Ewing-Sarkomzelllinien (p53-Wildtyp, -Null und -mutiert) untereinander verglichen. Diese Herangehensweise ist ein möglicher Weg der Entschlüsselung eines unterschiedlichen Verhaltens von Zellen mit verschiedenen p53-Modifikationen. Dabei sollte allerdings bedacht werden, dass ein abweichendes Verhalten der Zelllinien auf die Behandlungen nicht notwendigerweise auf deren p53-Status beruhen muss, sondern sich auch

aufgrund von anderen interindividuellen molekularen Eigenschaften der verwendeten Tumorzelllinien ergeben kann. Die Interpretation der Daten auf der Grundlage des jeweiligen p53-Status wird dadurch deutlich erschwert.

6.3 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen

PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren wirken stark synergistisch in A673-Zellen

In den durchflusszytometrischen Versuchen mit der Messung des Zelltods und des Verlusts von $\Delta\Psi_m$ zeigte die Kombinationsbehandlung aus den PARP-Inhibitor Olaparib sowohl mit dem ATR-Inhibitor VE-821 und dem ATM-Inhibitor KU-55933 in den p53-Null-Ewing-Sarkomzellen A673 einen starken bis sehr starken synergistischen Effekt, der sich vergleichbar ausgeprägt bei der Kombination aus dem ebenfalls untersuchten Veliparib und VE-821 fand. Dieser Synergismus trat sowohl in der Untersuchung des Zelltods als auch in der Messung von $\Delta\Psi_m$ auf und wurde mithilfe des Kombinationsindex („*combination index*“, CI) nach Chou und Talalay quantifiziert.

Durch die Depletion von p53 kommt es zu einer Beeinträchtigung des ATM-Signalweges, der die Zelle abhängiger von einer intakten Funktionsweise von ATR macht. Ebenso führt die ATR-Inhibition zu einer Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen, für deren Reparatur das von p53 mitabhängige funktionsfähige ATM eine zentrale Rolle einnimmt (Reaper et al. 2011). Da durch die Blockierung von Replikationsgabeln durch PARP-Inhibitoren ebenfalls DSBs generiert werden (s. Kap. 2.4), kann diese Abhängigkeit ATMs von p53 durchaus eine Erklärung für die Stärke des synergistischen Effekts von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren in A673-Zellen bieten (Lord und Ashworth 2017). Es konnte gezeigt werden, dass durch Knockdown des *TP53*-Gens ein synergistischer Effekt des ATR-Inhibitors VE-821 und Cisplatin deutlich verstärkt werden konnte (Reaper et al. 2011, Sangster-Guity et al. 2011). Wurde in ATR-defizienten Zellen allerdings p53 funktionell wiederhergestellt, sank die Anzahl der apoptotischen Zellen, während die Chemoresistenz gegenüber Cisplatin wieder anstieg (Sangster-Guity et al. 2011). Zwar konnten p53 und ATR unabhängig voneinander zellulär intakte Funktionen ausüben, bei gleichzeitigem Ausfall ergaben sich allerdings eklatante Störungen im Zellablauf (Nghiem et al. 2002).

Nieto-Soler et al. konnten zudem zeigen, dass die A673-Zellen vergleichsweise hohe endogene Level an replikativem Stress aufweisen, der sie anfälliger für die Inhibition von ATR oder ATM macht. So erklärt sich der Synergismus möglicherweise nicht nur aus dem Zusammenwirken

von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren, sondern die synthetische Letalität wird zusätzlich durch die funktionelle Abwesenheit von p53 und die damit einhergehende Beeinträchtigung der DNA-Schadensantwort, insbesondere durch negative Beeinflussung von ATM und ATR, bei zusätzlich erhöhtem replikativen Stress der A673-Zellen verstärkt.

Auffällig ist, dass die Konzentrationen zum Erreichen einer zytotoxischeren Wirkung durch die Einzelbehandlung mit Olaparib mit bis zu 40 μM wesentlich höher ausfielen als bei den anderen beiden Zelllinien. Diese Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt und deckten sich mit denjenigen, die innerhalb der Arbeitsgruppe zum Erreichen signifikanter Wirkungen verwendet wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich durch die Defizienz von p53 und dessen vermittelte Signalwege die Einleitung der Apoptose verzögert und größere Mengen an DNA-Schäden auftreten müssen, bevor die Zelle in den Zelltod gezwungen wird. Zudem weisen A673-Zellen neben der *TP53*-Mutation eine *loss-of-function*-Mutation im *CDKN2A*-Gen auf, deren alleinige Ausprägung bereits durch eine deutlich erhöhte Chemoresistenz gekennzeichnet ist (Tirode et al. 2014, Huang et al. 2005). In den A673-Zellen sind sogar beide Gene mutiert, sodass die Kombination beider Mutationen zu einer besonders hohen Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen beiträgt. Die Mutation im *CDKN2A*-Gen definiert allerdings auch einen klinisch besonders aggressiven Subtyp von Ewing-Sarkomen, der durch den additiven funktionellen Verlust von p53 in den A673-Zellen noch zusätzlich verstärkt wird (Huang et al. 2005). Die Prognoseverschlechterung durch die beiden genannten Faktoren verdeutlicht zusammen mit der deutlich gesteigerten Chemoresistenz den Erfolg des synergistischen Effekts der eingesetzten Kombinationsbehandlung in dieser Zelllinie.

PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren weisen in WE-68- und SK-ES-1-Zellen unterschiedlich starke Effekte auf

Bei der Betrachtung der gleichen Versuchsreihe mit den p53-Wildtyp-Ewing-Sarkomzellen WE-68 zeigte sich ebenfalls ein Synergismus, der allerdings schwächer ausfiel als in den A673-Zellen. Am stärksten trat die synergistische Wirkung bei der Kombination aus Veliparib und VE-821 hervor, während besonders die simultane Gabe von Olaparib mit dem ATM-Inhibitor KU-55933 nur schwach synergistische Effekte bewirkte. Die Zellen wiesen im Vergleich zu den A673-Zellen dafür eine deutlich höhere Sensitivität für Olaparib auf: Beispielsweise führte die Behandlung von 1 μM Olaparib bereits in 44 % der WE-68-Zellen zum Tod, wohingegen die gleiche Konzentration in der A673-Zellpopulation diesen Effekt in lediglich 15 % der

Population erbrachte. Dieses verstärkte Ansprechen könnte durch die intakte p53-Funktion mit Einleitung von Zellzyklusarrest und Apoptose bei aufgetretenen DNA-Schäden erklärt werden.

In der p53-mutierten Ewing-Sarkomzelllinie SK-ES-1 bewirkte die Kombinationsbehandlung aus Olaparib bzw. Veliparib mit VE-821 allerdings meist additive bis leicht antagonistische Effekte. Nur höhere Dosen von Veliparib mit 10 μ M VE-821 erbrachten leicht synergistische Werte dieser Kombination. Bei reiner Einzelbehandlung mit Olaparib oder Veliparib kam es in steigenden Konzentrationen auch hier zur Zunahme des Zelltods. Durch die zusätzliche Behandlung mit VE-821 wurde der zytotoxische Effekt jedoch nicht übermäßig verstärkt und fiel besonders in hohen Konzentrationen beider Wirkstoffe sogar gegenüber der reinen Olaparib-Behandlung schwächer aus.

Das mutierte *TP53* stellt einen entscheidenden Prognosefaktor vieler Tumoren dar. In vielen Fällen tritt eine *gain-of-function*-Mutation auf, die als Onkogen zur Bildung, Invasion oder Metastasierung der Tumorzellen beiträgt (s. Kap. 2.2.3) (Muller und Vousden 2013). Zusätzlich wird durch diese Mutation eine Chemoresistenz begünstigt (Parrales und Iwakuma 2015, Brosh und Rotter 2009). Auch in Ewing-Sarkomzellen stellt die *TP53*-Mutation ein ungünstiges Ereignis dar, das zwar nur in etwa 10 % der Tumoren auftritt, meist aber mit einer signifikanten Prognoseverschlechterung und schlechterem Ansprechen auf die Chemotherapie einhergeht (Neilsen et al. 2011, Huang et al. 2005). Falls es gelänge, mit einer zielgerichteten Therapie die zellulären und genomischen Eigenschaften der Ewing-Sarkome mit p53-Mutation zu erfassen und diese Tumoren wirkungsvoll zu bekämpfen, würden speziell diese Patienten besonders profitieren.

In vielen Fällen stellt die vorherrschende genomische Veränderung eine sogenannte *Missense*-Mutation dar, die zwar die funktionell elementare Transkriptionsdomäne von p53 verändert, die sonstige Struktur des Proteins allerdings weitestgehend unberührt lässt, sodass es weiterhin durch verschiedene Signalmoleküle (wie z. B. auch MDM2) gebunden werden kann und daher trotz inadäquater Funktion weiterhin in zelluläre Regulationsmechanismen eingebunden ist (Goh et al. 2011). Die SK-ES-1-Zellen weisen eine solche *Missense*-Mutation (C176F) im *TP53*-Gen auf, während gleichzeitig hohe intrazelluläre Level an mutiertem p53-Protein vorliegen (Tirode et al. 2014, Ottaviano et al. 2010). Da diese Zellen zusätzlich eine *Nonsense*-Mutation im *STAG2*-Gen (p.Q735) besitzen und die Kombination beider Mutationen mit einer deutlich schlechteren Prognose, vor allem aber auch einer höheren Chemoresistenz einhergeht (Tirode et al. 2014), ist anzunehmen, dass die Kombination beider Mutationen zum

schlechteren Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung in dieser Arbeit beiträgt. In der p53-Null-Zelllinie A673 ist das *STAG2*-Gen im Gegensatz zu den SK-ES-1-Zellen funktionell intakt (Tirode et al. 2014).

Eine entferntere Erklärung für das Nichtansprechen der Kombinationstherapie aus Olaparib/Veliparib mit VE-821 könnte darin begründet liegen, dass der molekular für das Ewing-Sarkom charakteristische Transkriptionsfaktor EWS-FLI1 durch direkte Bindung mit p53 einen Proteinkomplex im Zellkern eingeht, wie Li et al. zeigen konnten. Außerdem führt EWS-FLI1 auch zur indirekten Beeinflussung von p53-Signalwegen (Li et al. 2010). Falls EWS-FLI1 durch diese Proteinkomplexbildung seine Eigenschaften als aberrierender Transkriptionsfaktor verliert, würde in diesen Zellen aus der deutlichen Verringerung des replikativen Stresses auch eine verminderte Wirksamkeit von ATR- und ATM-Inhibitoren resultieren (Nieto-Soler et al. 2016). Außerdem besteht bei Ewing-Sarkomzellen ein Zusammenhang zwischen der Expression von EWS-FLI1 und dem Ansprechen auf PARP-Inhibitoren (Garnett et al. 2012). Möglicherweise ist das verminderte Ansprechen auf die Kombinationstherapie allerdings auch in einem veränderten Weg des Zelluntergangs in den SK-ES-1-Zellen begründet (s. nächstes Kapitel).

In der p53-Null-Osteosarkomzelllinie SaOS-2 wurde synergistische bis starke synergistische Wirkungen durch Olaparib und VE-821 erzielt, die auf einen ähnlichen Effekt auch abseits von Ewing-Sarkomen hoffen lassen. Weitere Untersuchungen in diesen Zellen könnten dabei helfen, die molekulare Wirkungsweise besser zu verstehen und auch in der Behandlung dieses Tumors alternative Therapiestrategien zu etablieren.

Olaparib und VE-821 bewirken in A673- und WE-68-Zellen die Einleitung der Apoptose

Durch Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk zu der jeweiligen Einzel- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und VE-821 zeigte sich in den Zelllinien A673 und WE-68 eine signifikante Verringerung des Zelltods und des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, der umso größer ausfiel, je höher der Anteil PI-positiver Zellen ohne Zugabe von z-VAD-fmk war: Große Unterschiede der jeweiligen Werte fanden sich hier insbesondere bei der Kombination beider Wirkstoffe in A673-Zellen sowie in der Kombinations- bzw. Olaparib-Einzelbehandlung in WE-68-Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass ein großer Teil der zytotoxischen Wirkung von Olaparib und VE-821 in diesen Zellen darin zu resultieren scheint, dass die Zellen in die Apoptose eintreten.

Interessanterweise unterschieden sich diese Werte in den SK-ES-1-Zellen bei der Behandlung mit VE-821 und zusätzlich dessen Kombination mit Olaparib trotz höherer Zelltodraten durch die einzelnen Wirkstoffe nicht wesentlich von denjenigen, die mit der Vorbehandlung mit z-VAD-fmk gemessen wurde. In diesen Zellen scheint die Zytotoxizität des ATR-Inhibitors mithin nicht durch die Einleitung der Apoptose vermittelt zu werden. Je nach zellulärer Situation stehen der Zelle auch andere Wege des Zelltods als die Apoptose zur Verfügung. Bei persistierenden DNA-Schäden kann es bei Insuffizienz benötigter Caspasen auch zur regulierten Nekrose der Zelle kommen, dazu gehören die beiden Wege der Nekroptosis oder Parthanatos (s. Kap. 2.3). Außerdem ist z. B. auch die Autophagie in den Zelltod eingebunden. ATR und ATM nehmen in der Initiierung des Zelltods eine zentrale Rolle ein, die ganz wesentlich durch die intakte Funktion von p53 vermittelt wird (Roos et al. 2016). Es ist daher anzunehmen, dass es in den SK-ES-1-Zellen bei der ATR-Blockade durch VE-821 zu einer Störung der Interaktion dieses Enzyms mit dem mutierten p53 kommt, welche die Beschreitung alternativer Methoden des Zelltods bewirkt. Da funktionell intaktes p53 ein wichtiges Protein bei Initiierung der Apoptose darstellt, ist dessen funktionelle Defizienz eine mögliche Ursache für das Ausbleiben der apoptotischen Antwort auf die Behandlung. Allerdings traten auch die p53-Null-Zellen A673 in die Apoptose ein. Wie später noch näher erläutert, kann diese in jenen Zellen jedoch möglicherweise ebenso durch die p53-unabhängige Aktivierung proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt werden (s. Kap. 6.4). Eventuell ist auch der schwächere bzw. fehlende synergistische Effekt der Kombination aus PARP- und ATR-Inhibitor, der in den PI/DiOC₆(3)-Versuchen beschrieben wurde, darauf zurückzuführen.

Um die Ergebnisse dieser Versuchsreihe weiter zu konsolidieren, wurde eine mögliche Induktion der Apoptose durch Olaparib und VE-821 durch die Aktivitätsmessung der Caspase-3 überprüft. Die Ergebnisse dieser Messungen stimmten gut mit denen der Versuchsreihe mit z-VAD-fmk überein. Unter aufsteigender Dosis von Olaparib kam es in allen Zelllinien zu einer Steigerung der Caspase-3-Aktivität, die in A673- und WE-68-Zellen mit simultaner Behandlung mit VE-821 außerdem noch überadditiv zunahm. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Applikation der o. g. Wirkstoffe in diesen Zellen mit einer Induktion der Apoptose einhergeht.

In den SK-ES-1-Zellen zeigte sich bei diesen Versuchen allerdings ein unterschiedliches Ergebnis. Zwischen 2 μ M und 4 μ M Olaparib kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Caspase-3-Aktivität bis zum 4,6-fachen des Ausgangswerts, der bei zusätzlicher Applikation

von 10 μ M VE-821 ausblieb. Außerdem lagen die Werte der Kombinationsbehandlung stets leicht unter denen der reinen Olaparib-Konzentrationen.

Schon früh konnte festgestellt werden, dass das mutierte p53 durch Deaktivierung verschiedener Signalwege, die den Zelltod und die Apoptose einleiten können, auch an einer möglichen Chemoresistenz beteiligt sein kann (Sigal und Rotter 2000, Liu et al. 2010). Beispielsweise kann das mutierte p53 mit dem MRN-Komplex interagieren und die Aktivierung von ATM verhindern, was letztendlich zu einer eingeschränkten Homologen Rekombination (HR) mit insuffizienter Aktivierung weiterer Signalwege wie der Apoptose beiträgt (Song et al. 2007). Es bleibt allerdings fraglich, ob dies wirklich der Mechanismus ist, der für den o. g. Effekt verantwortlich ist.

6.4 Intrazelluläre Veränderungen durch die Wirkstoffkombination

Mithilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR und Western Blots wurden die relative Veränderung der Expression verschiedener Gene sowie die Unterschiede der intrazellulären Level einiger Proteine untersucht, die sich jeweils durch die Einzel- und Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 innerhalb der A673- und WE-68-Zellen ergaben.

Olaparib und VE-821 induzieren auch p53-unabhängig die Genexpression proapoptotischer Gene der Bcl-2-Familie

So führten Olaparib und VE-821 sowohl in alleiniger als auch kombinierter Gabe zur Induktion der proapoptotischen Gene *PUMA* und *NOXA* in A673-Zellen. Diese beiden Gene gehören zur Bcl-2-Familie und führen unter Kooperation mit deren anderen Mitgliedern zum Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials, darauffolgender Caspasenaktivierung und dadurch zur intrinsischen Auslösung der Apoptose. Obwohl die beiden zu den bekanntesten Genen gehören, die durch p53 hochreguliert und aktiviert werden, ist bei *PUMA* und *NOXA* auch die p53-unabhängige Induktion beschrieben geworden (Zhang et al. 2013, Nakano und Vousden 2001). In der p53-Null-Zelllinie scheinen daher die p53-unabhängigen Mechanismen diese Induktion zu bewirken: Es konnte z. B. gezeigt werden, dass das p53-Homologon p73 ebenfalls die Transkription von *PUMA* mithilfe verschiedener Transkriptionsfaktoren regulieren kann (Zhang et al. 2013). Auch *NOXA*, das im Gegensatz zu *PUMA* etwas schwächer zur Initiierung der Apoptose beiträgt, kann z. B. durch p73 oder E2F1 unabhängig von p53 aktiviert werden. Es wurde vermutet, dass das etwas ineffektivere *NOXA* ein zusätzliches Ziel von p73 ist, um in

p53-defizienten Zellen die Apoptose einleiten zu können (Flinterman et al. 2005, Zhang et al. 2013). Außerdem führen verschiedene zelluläre Stressfaktoren, die u. a. durch metabolische oder replikative Stimuli zustande kommen und in A673-Zellen vergleichsweise stark ausgeprägt sind, zur Aktivierung von *NOXA* (Guikema et al. 2017, Nieto-Soler et al. 2016).

Auch in den WE-68-Zellen zeigte sich durch die Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 eine Induktion von *PUMA*. Bei der Untersuchung der relativen quantitativen Änderung der mRNA-Expression von *NOXA* erbrachten jedoch weder die jeweiligen Einzelbehandlungen noch deren Kombination signifikante Änderungen.

Bei der Betrachtung der beiden anderen untersuchten proapoptotischen Gene *BAX* und *BIM* ließ sich zwar in beiden Zelllinien durch einige Behandlungen eine leichte Induktion feststellen, die allerdings zur Präzisierung der Wirkungsweise von Olaparib und VE-821 in diesen Zellen keine spezifischen Aussagen zulässt. Insgesamt kamen hier in den WE-68-Zellen leicht stärkere Effekte als in den A673-Zellen zustande.

Auffällig bei den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse war vor allem die starke Induktion des für das Protein p21 codierenden Gens *CDKN1A*, das in beiden Zelllinien durch die Kombination aus Olaparib und VE-821 eine Verstärkung um ein Vielfaches erfuhr. In den WE-68-Zellen zeigte sich außerdem ebenso eine starke Induktion durch die Einzelbehandlung mit Olaparib. Da p21 durch das funktionell intakte p53 stark mitbeeinflusst und aktiviert wird, ist dessen schwächerer Anstieg in den A673-Zellen gut erklärbar. Diese Expressionssteigerung legt gemeinsam mit der beobachteten Akkumulation von γ H2AX und pS15 p53 (vgl. Abb. 22) eine DNA-schädigende Wirkung der Wirkstoffe nahe, die besonders durch Olaparib auftrat und durch die Kombination mit VE-821 weiter verstärkt wurde. Mutmaßlich kommt die Zunahme von DNA-Schäden neben der Inhibition einer adäquaten Schadensreparatur durch die Blockierung von Replikationsgabeln unter Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen zustande, die PARP-Inhibitoren durch das „Festhalten“ von PARP auf der DNA verursachen können (Lord und Ashworth 2017).

Wie aus der Zellzyklusanalyse ersichtlich war, führte die hohe Induktion von *CDKN1A* durch Olaparib in beiden Zelllinien interessanterweise trotzdem nicht zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1-Phase, deren Übergang in die S-Phase durch eine Konzentrationserhöhung von p21 inhibiert werden würde (s. Abb. 23). Offenbar spielen hier auch andere Faktoren eine Rolle; der G1/S-Kontrollpunkt wird z. B. auch durch ATM beeinflusst, während ATR besonders die Intra-S-Phase- und G2/M-Kontrollpunkte reguliert (Weber und Ryan 2015).

Die übermäßige Verstärkung der *CDKN1A*-Expression, die insbesondere in den WE-68-Zellen auf das 5,1-fache gegenüber der Kontrolle erhöht war, kann allerdings auch zu einer Inhibition der Apoptose beitragen (s. Kap. 2.2.3), die den schwächeren synergistischen Effekt insbesondere bei niedrigeren Konzentration der beiden verwendeten Wirkstoffe in dieser Zelllinie erklären könnte (Abbas und Dutta 2009). Die Aktivität der Caspase-3 stieg in diesen Zellen bei steigender Olaparib-Konzentration zunächst erst langsam an, bevor sich durch die zusätzliche Behandlung mit VE-821 eine starke Divergenz der Kurve ergab (vgl. Abb. 16).

Die leichte Verringerung der Genexpression von *TP53* in den WE-68-Zellen war auf den ersten Blick auffallend, insbesondere bei der Beachtung der Western Blots, die eine deutliche Konzentrationssteigerung von p53 und pS15-p53 durch die verschiedenen Behandlungen zeigten. Das Protein pS15-p53 stellt die aktivierte Form von p53 mit der Phosphorylierung am Serin 15 dar. Yan et al. konnten allerdings verdeutlichen, dass p53 mithilfe eines autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus die Transkription seines eigenen Gens *TP53* hemmt (Yan et al. 2007). So wäre die mögliche Aktivierung von p53 durch die induzierten DNA-Schädigungen eine mögliche Erklärung für die leichte Expressionsminderung des *TP53*-Gens. Mithilfe des negativen Rückkopplungsmechanismus wird durch das aktivierte p53 allerdings die Expression seines regulatorischen Gens MDM2 in den WE-68-Zellen leicht verstärkt (Haupt et al. 1997).

Olaparib in Einzelbehandlung sowie dessen Kombination mit VE-821 führen in A673- und WE-68-Zellen zur Akkumulation von DNA-Schäden

Die Akkumulation von γ H2AX gilt als sensibles Maß auftretender DNA-Schäden, insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) (Bonner et al. 2008). Bei der Bildung des DNA-Reparaturkomplexes (DDR – *DNA damage response*) dient die Phosphorylierung des Histons H2AX durch PI3-Kinasen wie ATM oder ATR der Rekrutierung verschiedenster DNA-Reparaturproteine an den Ort der Schädigung sowie zur Aktivierung einiger Checkpointkinasen, wodurch die Einleitung des Zellzyklusarrests vermittelt wird (Podhorecka et al. 2010). In Zellen mit dysfunktionaler Reparaturfunktion bleibt γ H2AX phosphoryliert, während die Zelle mit ihrer weiteren Replikation ohne adäquate Reparatur des DNA-Schadens fortfährt. Hält diese Aktivierung für einen Zeitraum über 24 Stunden an, führt dieser irreparable Schaden meist zum unaufhaltbaren Zelltod (Wilson et al. 2011, Cook et al. 2009, Banath et al. 2010).

In beiden Zelllinien induzierte die Kombinationsbehandlung beider Wirkstoffe einen deutlichen Anstieg der γ H2AX-Konzentration, in den WE-68-Zellen zeigte sich zusätzlich auch durch Olaparib ein Konzentrationsanstieg. Es ist anzunehmen, dass diese genomische Instabilität zumindest zum Teil durch den PARP-Inhibitor Olaparib unter dessen Ausbildung blockierter Replikationsgabeln mit Induktion von DSBs mitverursacht wird, aufgrund der Inhibition der Reparaturproteine PARP und ATR nicht mehr suffizient behoben werden kann und schließlich zur Apoptose der Zelle führt (s. o.). Interessant war, dass es bereits 2 h nach der Behandlung mit Olaparib und VE-821 zu einem Konzentrationsanstieg von γ H2AX in A673-Zellen kam. In den WE-68-Zellen herrschten nach 2 h erhöhte Level an γ H2AX in jeder Probe vor, die für einen erhöhten basalen Replikationsstress in diesen Zellen sprechen könnten.

Bei der Betrachtung des p53 und pS15-p53 zeigte sich ein Konzentrationsanstieg in den WE-68-Zellen, der analog zu der γ H2AX-Bestimmung besonders bei der Kombinationsbehandlung und Olaparib auftrat. In Zusammenschau der Messungen spricht dieser für die Aktivierung von p53 durch die von Olaparib verursachten DNA-Schäden.

PAR (*poly-ADP-ribose*) sind polymere Ketten aus ADP-Ribose, die durch PARP bei DNA-Schäden gebildet werden und zur Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen dienen (s. Kap. 2.3). Erwartungsgemäß konnte PAR in beiden Zelllinien nicht nachgewiesen werden, sobald PARP-1 und -2 durch Olaparib gehemmt wurden. Allerdings fand nach 24 h bei der Einzelbehandlung mit VE-821 in den A673-Zellen eine Konzentrationssteigerung gegenüber der Kontrolle statt, die eine mögliche Akkumulation von DNA-Schäden bei Inaktivierung des ATR-Signalwegs bestätigte.

VE-821 hebt den durch Olaparib induzierten G2-M-Zellzyklusarrest in A673- und WE-68-Zellen auf

Veränderungen im Zellzyklus der Ewing-Sarkomzelllinien A673 und WE-68 durch die Einzel- und Kombinationsbehandlung wurden mithilfe der Zellzyklusanalyse detektiert.

Die auf die Behandlung wesentlich empfindlicher reagierenden WE-68-Zellen lagen zu einem deutlich höheren Prozentsatz als sub-G1-Zellen vor, also als Zellen mit degradiertem DNA, die für die Apoptose kennzeichnend ist. Durch die Kombinationsbehandlung stieg dieser Prozentsatz der Zellen in der sub-G1-Phase zusätzlich; analog zu den anderen Versuchsreihen erfuhren die WE-68-Zellen zusätzlich durch die Einzelbehandlung mit Olaparib eine Verstärkung. Die Zunahme dieses Anteils der Zellen spricht zusätzlich zu den anderen

Versuchsreihen für den zytotoxischen Effekt der Wirkstoffe, der in Kombination jeweils deutlich stärker als in der reinen Einzelbehandlung ausfiel und die Zellen in die Apoptose trieb.

Einige Studien zeigten bereits, dass die Behandlung mit Olaparib über 24 h in verschiedenen Zelllinien zu einer Akkumulation von Zellen in der G2-M-Phase führt, die durch die zusätzliche Behandlung mit einem ATR-Inhibitor (in den jeweiligen Studien VE-821 bzw. Ceralasertib/AZD6738) aufgehoben wird (Schoonen et al. 2019, Lloyd et al. 2020, Kim et al. 2017). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit sowohl in den A673- als auch WE-68-Zellen bestätigt werden.

Die durch Olaparib induzierten DNA-Schäden resultierten offenbar über den ATR-CHK1-Signalweg in einer G2-M-Checkpoint-Inhibition, die die Zellen im G2-M-Zellzyklusarrest hält, um die DNA-Integrität wiederherzustellen (Blackford und Jackson 2017, Lloyd et al. 2020). Durch die zusätzliche Inhibition von ATR wurde dieser Arrest aufgehoben und die Zellen trotz der vorherrschenden DNA-Schäden in den weiteren Zellzyklus entlassen, was zur weiteren genomischen Instabilität und letztendlich zum Untergang der Zelle führte (Lloyd et al. 2020, Schoonen et al. 2019). Der Synergismus beider Substanzen liegt offenbar auch zusätzlich in dieser Wirkung begründet (Kim et al. 2017). Michelena et al. konnten zeigen, dass die PARP-Inhibitor-induzierten DNA-Schäden vornehmlich in der S-Phase, also während der Replikation der DNA, durch Ausbildung blockierter Replikationsgabeln auftreten (Michelena et al. 2018). Bei der Aufhebung des G2-M-Zellzyklus-Kontrollpunkts durch die ATR-Blockade kann die ungehinderte weitere Zellteilung in der Mitose geradewegs in die mitotische Katastrophe führen (Schoonen et al. 2019). Analog zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Versuche mit der Bestimmung von Zelltod und $\Delta\Psi_m$ -Verlust fiel dieser Effekt in den WE-68-Zellen weniger stark aus als in den A673-Zellen, was weiterhin dazu beitragen könnte, den schwächeren synergistischen Effekt von Olaparib und VE-821 gegenüber der A673-Zelllinie in diesen Zellen zu erklären.

Abb. 24 zeigt eine vereinfachte Darstellung der zellulären Wirkungsweise von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren in Ewing-Sarkomzellen mit Wildtyp-p53.

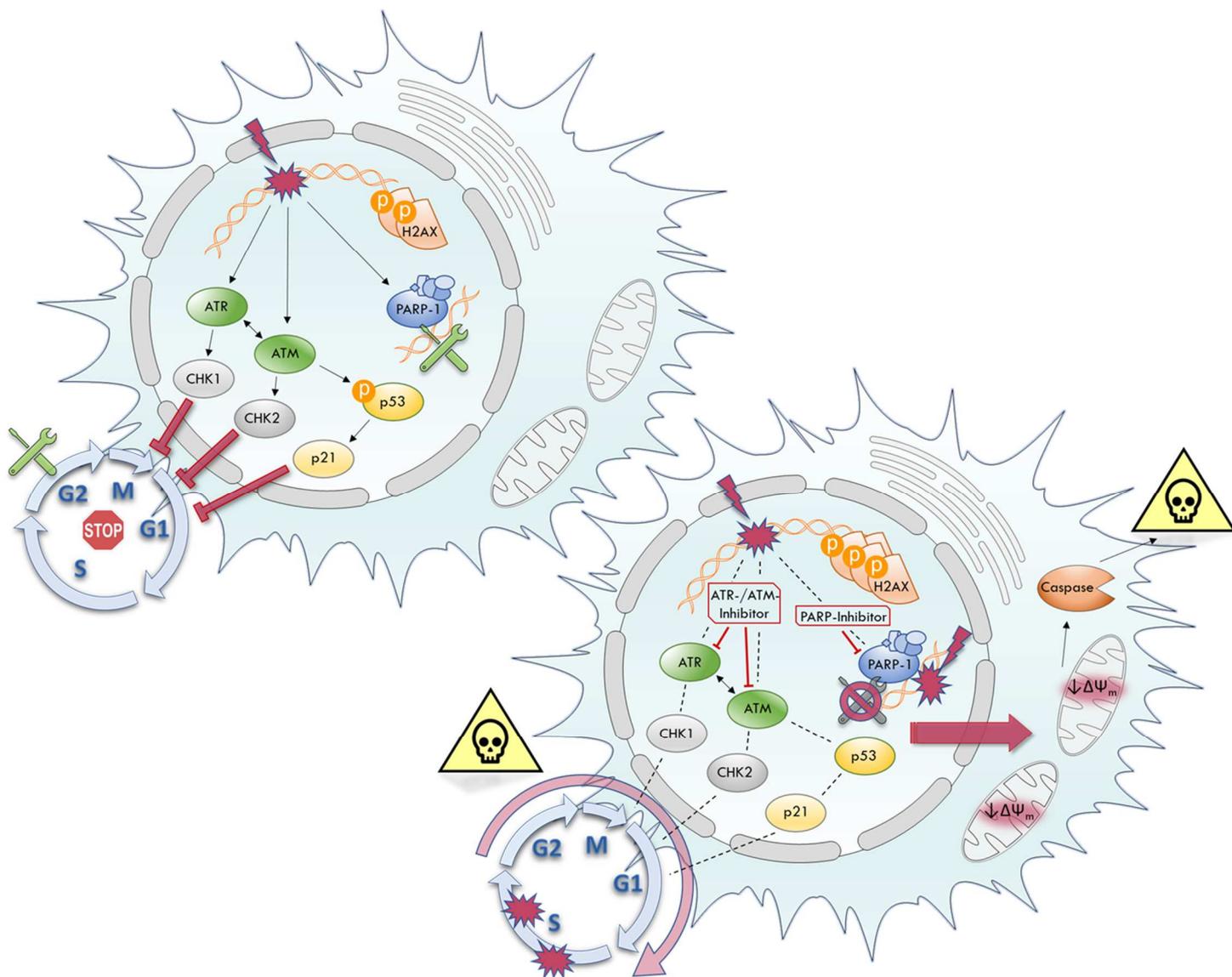


Abb. 24: Vereinfachte Darstellung der zellulären Wirkungsweise der Kombinationsbehandlung aus PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren in Ewing-Sarkomzellen. Bei auftretenden DNA-Schäden leiten intakte DNA-Reparaturmechanismen der Zelle die Reparatur des Schadens ein und führen bei größerem Ausmaß zum Zellzyklusarrest, der der Zelle die Zeit gibt, DNA-Schäden zu beheben, was eine weitere Vervielfältigung der genomischen Schäden verhindert. PARP-1 bindet bei DNA-Einzelstrangbrüchen an den Ort der Schädigung und initiiert die Bindung weiterer rekrutierter Reparaturenzyme, die zur Wiederherstellung intakter DNA beitragen können. ATR und ATM leiten Signalkaskaden sowohl zur Schadensreparatur als auch zur Aktivierung des Zellzyklusarrests ein. Bei Inhibition von PARP-1 wird nicht nur die suffiziente Behebung auftretender DNA-Schäden eingeschränkt, sondern auch gleichzeitig die Lösung des Enzyms von der DNA verhindert, sodass durch blockierte Replikationsgabeln weitere DNA-Doppelstrangbrüche entstehen können. Zudem sorgt die Inhibition von ATR oder ATM zu einer Aufhebung des Zellzyklusarrests und damit zur ungehinderten Replikation mit der Vermehrung genomischer Schäden. Die Persistenz von DNA-Schäden, die zu einer Akkumulation von γ H2AX im Zellkern führen, mündet in den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und darauffolgender Aktivierung von Caspasen, die letztendlich im Zelltod der Zelle resultieren.

7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde das Verhalten von drei verschiedenen Ewing-Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status auf die Kombinationsbehandlung von PARP-Inhibitoren wie Olaparib und Veliparib mit ATR-/ATM-Inhibitoren analysiert, mit dem Ziel, einen möglichen Synergismus im Sinne einer synthetischen Letalität beider Substanzen aufzudecken.

In der p53-Null-Zelllinie A673 zeigte die Kombination von Olaparib/Veliparib mit VE-821 oder KU-55933 einen starken synergistischen Effekt. In diesen Zellen kam es zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, die mithilfe der p53-unabhängigen Expressionssteigerung proapoptotischer Gene wie *PUMA* oder *NOXA* letztendlich zur Aktivierung der Caspase-3 und Einleitung der Apoptose dieser Zellen führten. Außerdem sorgte VE-821 für die Aufhebung des aufgrund der Olaparib-induzierten DNA-Schäden eingeleiteten und mithilfe von ATR initiierten G2-M-Zellzyklusarrests, sodass die Zellen trotz DNA-Schäden weiterhin den Zellzyklus durchliefen und das Ausmaß der genomischen Instabilität schließlich so stark zunahm, dass die Zellen in den Untergang getrieben wurden. Durch den unterschiedlichen Wirkmechanismus der Wirkstoffe kann in diesen Zellen somit von einer synthetischen Letalität ausgegangen werden, die für die deutlich gesteigerte Effektivität ihrer Kombination gegenüber der Einzelbehandlung sorgt.

Der funktionelle Verlust von p53 geht mit einer Prognoseverschlechterung des Tumors einher (Nielsen et al. 2011). Die Zellen mit Mutation von *TP53* oder *CDKN2A* weisen häufig ein deutlich aggressiveres klinisches Verhalten sowie eine ausgeprägte Chemoresistenz auf (Huang et al. 2005). Da die A673-Zellen überdies Mutationen in beiden Genen aufweisen, stellt der synergistische Effekt der Behandlung mit PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren eine aussichtsreiche Möglichkeit dar, bei entsprechenden Eigenschaften in der genomischen Analyse des Primärtumors einen signifikanten antineoplastischen Effekt zu erzielen.

In den p53-Wildtyp-Ewing-Sarkomzellen WE-68 wurde ein mäßiger Synergismus beobachtet. In dieser Zelllinie kam es durch persistierende DNA-Schäden, die zum großen Teil durch die Behandlung mit Olaparib hervorgerufen wurden, zu einer starken Induktion von *CDKN1A* und *PUMA* sowie zur Aktivitätssteigerung der Caspase-3 und Initiierung der Apoptose. Mögliche Erklärungen für den etwas schwächeren Effekt der Kombinationsbehandlung könnten das geringere Ausmaß der Aufhebung des Olaparib-vermittelten G2-M-Zellzyklusarrests durch VE-821 oder die erst in höheren verwendeten Konzentrationen verstärkte Aktivierung der

Caspase-3 bieten. Diese Zelllinie zeigte eine besondere Sensitivität gegenüber der Olaparib-Behandlung.

Olaparib bzw. Veliparib in Kombination mit VE-821 erbrachten in der p53-mutierten Zelllinie SK-ES-1 nur additive bis leicht antagonistische Effekte. Diese Zellen weisen zusätzlich zu der *Missense*-Mutation im *TP53*-Gen eine *Nonsense*-Mutation im *STAG2*-Gen auf, deren Kombination mit einer deutlich erhöhten Chemoresistenz einhergeht und daher eine mögliche Erklärung für das schlechtere Ansprechen gegenüber der Behandlung mit PARP- und ATR-Inhibitoren bietet. Im Gegensatz zu den A673- und WE-68-Zellen schien die Kombinationsbehandlung in dieser Zelllinie trotz leichter Zytotoxizität nicht zur Apoptose der Zellen zu führen: Weder in den Versuchen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk noch in der Aktivitätsmessung der Caspase-3 zeigten sich hier wesentliche Effekte. Es ist anzunehmen, dass die Blockade von ATR mit VE-821 zu einer Störung dessen Interaktion mit dem mutierten p53 und durch den zusätzlichen funktionellen Ausfall von p53 zur Beschreitung alternativer Zelltodmethoden abseits der Apoptose führt, die zur Effektivitätsminderung der eingesetzten Kombinationsbehandlung beiträgt. Eine mögliche weitere Erforschung der zugrundeliegenden zellulären Resistenzmechanismen bietet mit einiger Sicherheit zusätzliche Erkenntnisse bezüglich der z. T. immer noch nicht vollständig verstandenen Prognoseverschlechterung einiger Tumorzellen bei *TP53*-Mutation.

Zusätzlich wurde zum Vergleich der Wirkung von Olaparib und VE-821 auf einen anderen Knochentumor außerdem die p53-Null-Osteosarkomzelllinie SaOS-2 auf den zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlung untersucht. Diese zeigte ebenfalls einen starken Synergismus, sodass weiterführende Untersuchungen möglicherweise auch bei der Behandlung des Osteosarkoms therapeutische Ansätze bieten können.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass die Kombination aus PARP-Inhibitoren und ATR-/ATM-Inhibitoren eine vielversprechende neue therapeutische Strategie bei der Behandlung des Ewing-Sarkoms darstellen kann. In einzelnen Studien wurden bereits Nachweise einer Sensitivität gegenüber der jeweiligen Einzelbehandlung erbracht, die allerdings noch nicht die benötigte Wirksamkeit für eine alleinige Therapie besaßen. Im Sinne der synthetischen Letalität besteht die Möglichkeit, dass eine Kombination beider Wirkstoffe auch *in vivo* antineoplastische Wirkungen an Ewing-Sarkomen erzielen kann, sodass neue, schonendere und zugleich effektivere Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung des Ewing-Sarkoms etabliert werden können, die weiterhin so dringend benötigt werden.

8 Anhang

Literaturverzeichnis

- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9 (6):400-414.
- Alkan O, Schoeberl B, Shah M, Koshkaryev A, Heinemann T, Drummond DC, Yaffe MB, Raue A. 2018. Modeling chemotherapy-induced stress to identify rational combination therapies in the DNA damage response pathway. *Sci Signal*, 11 (540).
- Bai P. 2015. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell*, 58 (6):947-958.
- Bailey K, Cost C, Davis I, Glade-Bender J, Grohar P, Houghton P, Isakoff M, Stewart E, Laack N, Yustein J, Reed D, Janeway K, Gorlick R, Lessnick S, DuBois S, Hingorani P. 2019. Emerging novel agents for patients with advanced Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group (COG) New Agents for Ewing Sarcoma Task Force. *F1000Res*, 8.
- Balamuth NJ, Womer RB. 2010. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol*, 11 (2):184-192.
- Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, Schwentner R, Smrzka O, Muehlbacher K, Aryee DN, Kovar H. 2008. EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 68 (17):7100-7109.
- Banath JP, Klovov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. 2010. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 10:4.
- Batey MA, Zhao Y, Kyle S, Richardson C, Slade A, Martin NM, Lau A, Newell DR, Curtin NJ. 2013. Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol Cancer Ther*, 12 (6):959-967.
- Bienemann K, Burkhardt B, Modlich S, Meyer U, Moricke A, Bienemann K, Mauz-Korholz C, Escherich G, Zimmermann M, Korholz D, Janka-Schaub G, Schrappe M, Reiter A, Borkhardt A. 2011. Promising therapy results for lymphoid malignancies in children with chromosomal breakage syndromes (Ataxia teleangiectasia or Nijmegen-breakage syndrome): a retrospective survey. *Br J Haematol*, 155 (4):468-476.
- Blackford AN, Jackson SP. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*, 66 (6):801-817.
- Bolling T, Harges J, Dirksen U. 2013. Management of bone tumours in paediatric oncology. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 25 (1):19-26.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8 (12):957-967.
- Bosma SE, Ayu O, Fiocco M, Gelderblom H, Dijkstra PDS. 2018. Prognostic factors for survival in Ewing sarcoma: A systematic review. *Surg Oncol*, 27 (4):603-610.
- Brenner JC, Feng FY, Han S, Patel S, Goyal SV, Bou-Maroun LM, Liu M, Lonigro R, Prensner JR, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. 2012. PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 72 (7):1608-1613.

- Brosh R, Rotter V. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*, 9 (10):701-713.
- Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. 2017. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*, 7 (1):20-37.
- Burgess BT, Anderson AM, McCorkle JR, Wu J, Ueland FR, Kolesar JM. 2020. Olaparib Combined with an ATR or Chk1 Inhibitor as a Treatment Strategy for Acquired Olaparib-Resistant BRCA1 Mutant Ovarian Cells. *Diagnostics (Basel)*, 10 (2).
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*, 9 (12):M57-60.
- Casey DL, Lin TY, Cheung NV. 2019. Exploiting Signaling Pathways and Immune Targets Beyond the Standard of Care for Ewing Sarcoma. *Front Oncol*, 9:537.
- Charrier JD, Durrant SJ, Golec JM, Kay DP, Knegetel RM, MacCormick S, Mortimore M, O'Donnell ME, Pinder JL, Reaper PM, Rutherford AP, Wang PS, Young SC, Pollard JR. 2011. Discovery of potent and selective inhibitors of ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase as potential anticancer agents. *J Med Chem*, 54 (7):2320-2330.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58 (3):621-681.
- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22:27-55.
- Choy E, Butrynski JE, Harmon DC, Morgan JA, George S, Wagner AJ, D'Adamo D, Cote GM, Flamand Y, Benes CH, Haber DA, Baselga JM, Demetri GD. 2014. Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy. *BMC Cancer*, 14:813.
- Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. 2009. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458 (7238):591-596.
- Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, Kiezun A, Carter SL, Shukla SA, Mehta SS, Thorner AR, de Torres C, Lavarino C, Sunol M, McKenna A, Sivachenko A, Cibulskis K, Lawrence MS, Stojanov P, Rosenberg M, Ambrogio L, Auclair D, Seepo S, Blumenstiel B, DeFelice M, Imaz-Rosshandler I, Schwarz-Cruz YCA, Rivera MN, Rodriguez-Galindo C, Fleming MD, Golub TR, Getz G, Mora J, Stegmaier K. 2014. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov*, 4 (11):1326-1341.
- Curtin NJ, Szabo C. 2013. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med*, 34 (6):1217-1256.
- Daniels CM, Ong SE, Leung AK. 2015. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation. *Mol Cell*, 58 (6):911-924.
- Darzynkiewicz Z. 2011. Redundancy in response to DNA damage: the key to protection of genome integrity. *Cell Cycle*, 10 (20):3425.

- de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Healey JH, Ladanyi M. 2000. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*, 89 (4):783-792.
- De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. 2012. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol*, 84 (2):137-146.
- Deeks ED. 2015. Olaparib: first global approval. *Drugs*, 75 (2):231-240.
- Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, Bontcheva-Diaz VD, Cox BF, DeWeese TL, Dillehay LE, Ferguson DC, Ghoreishi-Haack NS, Grimm DR, Guan R, Han EK, Holley-Shanks RR, Hristov B, Idler KB, Jarvis K, Johnson EF, Kleinberg LR, Klinghofer V, Lasko LM, Liu X, Marsh KC, McGonigal TP, Meulbroek JA, Olson AM, Palma JP, Rodriguez LE, Shi Y, Stavropoulos JA, Tsurutani AC, Zhu GD, Rosenberg SH, Giranda VL, Frost DJ. 2007. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res*, 13 (9):2728-2737.
- Engert F, Schneider C, Weibeta LM, Probst M, Fulda S. 2015. PARP Inhibitors Sensitize Ewing Sarcoma Cells to Temozolomide-Induced Apoptosis via the Mitochondrial Pathway. *Mol Cancer Ther*, 14 (12):2818-2830.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434 (7035):917-921.
- Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. 2014. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171 (8):2000-2016.
- Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, Mymryk JS, Gaken J, Tavassoli M. 2005. E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 280 (7):5945-5959.
- Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 361 (2):123-134.
- Freed-Pastor WA, Prives C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 26 (12):1268-1286.
- Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. 2015. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer*, 15 (5):276-289.
- Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, Greenman CD, Dastur A, Lau KW, Greninger P, Thompson IR, Luo X, Soares J, Liu Q, Iorio F, Surdez D, Chen L, Milano RJ, Bignell GR, Tam AT, Davies H, Stevenson JA, Barthorpe S, Lutz SR, Kogera F, Lawrence K, McLaren-Douglas A, Mitropoulos X, Mironenko T, Thi H, Richardson L, Zhou W, Jewitt F, Zhang T, O'Brien P, Boisvert JL, Price S, Hur W, Yang W, Deng X, Butler A, Choi HG, Chang JW, Baselga J, Stamenkovic I, Engelman JA, Sharma SV, Delattre O, Saez-Rodriguez J, Gray NS, Settleman J, Futreal PA, Haber DA, Stratton MR, Ramaswamy S, McDermott U, Benes CH. 2012. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483 (7391):570-575.

- Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Berard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. 2015. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*, 33 (27):3036-3046.
- Geller DS, Gorlick R. 2010. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*, 8 (10):705-718.
- Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. 2011. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (1):a000745.
- Girardini JE, Marotta C, Del Sal G. 2014. Disarming mutant p53 oncogenic function. *Pharmacol Res*, 79:75-87.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*, 223 (2):116-126.
- Gorthi A, Romero JC, Loranc E, Cao L, Lawrence LA, Goodale E, Iniguez AB, Bernard X, Masamsetti VP, Roston S, Lawlor ER, Toretsky JA, Stegmaier K, Lessnick SL, Chen Y, Bishop AJR. 2018. EWS-FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma. *Nature*, 555 (7696):387-391.
- Granowetter L, Womer R, Devidas M, Krailo M, Wang C, Bernstein M, Marina N, Leavey P, Gebhardt M, Healey J, Shamberger RC, Goorin A, Miser J, Meyer J, Arndt CA, Sailer S, Marcus K, Perlman E, Dickman P, Grier HE. 2009. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 27 (15):2536-2541.
- Greene J, Nguyen A, Bagby SM, Jones GN, Tai WM, Quackenbush KS, Schreiber A, Messersmith WA, Devaraj KM, Blatchford P, Eckhardt SG, Cadogan EB, Hughes GD, Smith A, Pitts TM, Arcaroli JJ. 2017. The novel ATM inhibitor (AZ31) enhances antitumor activity in patient derived xenografts that are resistant to irinotecan monotherapy. *Oncotarget*, 8 (67):110904-110913.
- Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS. 2003. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med*, 348 (8):694-701.
- Grunewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Alava E, Kovar H, Sorensen PH, Delattre O, Dirksen U. 2018. Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, 4 (1):5.
- Guikema JE, Amiot M, Eldering E. 2017. Exploiting the pro-apoptotic function of NOXA as a therapeutic modality in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 21 (8):767-779.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387 (6630):296-299.
- Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*, 18 (1):27-47.

- Heisey DAR, Lochmann TL, Floros KV, Coon CM, Powell KM, Jacob S, Calbert ML, Ghotra MS, Stein GT, Maves YK, Smith SC, Benes CH, Levenson JD, Souers AJ, Boikos SA, Faber AC. 2019. The Ewing Family of Tumors Relies on BCL-2 and BCL-XL to Escape PARP Inhibitor Toxicity. *Clin Cancer Res*, 25 (5):1664-1675.
- Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC. 2004. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, 64 (24):9152-9159.
- Hodgson DR, Dougherty BA, Lai Z, Fielding A, Grinsted L, Spencer S, O'Connor MJ, Ho TW, Robertson JD, Lanchbury JS, Timms KM, Gutin A, Orr M, Jones H, Gilks B, Womack C, Gourley C, Ledermann J, Barrett JC. 2018. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. *Br J Cancer*, 119 (11):1401-1409.
- Hogendoorn PC, Group EEW, Athanasou N, Bielack S, De Alava E, Dei Tos AP, Ferrari S, Gelderblom H, Grimer R, Hall KS, Hassan B, Hogendoorn PC, Jurgens H, Paulussen M, Rozeman L, Taminiau AH, Whelan J, Vanel D. 2010. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5:v204-213.
- Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, Wexler LH, Gorlick R, Meyers P, Ladanyi M. 2005. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol*, 23 (3):548-558.
- Huntoon CJ, Flatten KS, Wahner Hendrickson AE, Huehls AM, Sutor SL, Kaufmann SH, Karnitz LM. 2013. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res*, 73 (12):3683-3691.
- Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461 (7267):1071-1078.
- Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, Barnes CS, Jones J, Charlton P, Pollard JR, Morris J, Doroshow JH, Pommier Y. 2014. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res*, 74 (23):6968-6979.
- Jurgens H, Dirksen U. 2011. Ewing sarcoma treatment. *Eur J Cancer*, 47 Suppl 3:S366-367.
- Kim H, George E, Ragland R, Rafail S, Zhang R, Krepler C, Morgan M, Herlyn M, Brown E, Simpkins F. 2017. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin Cancer Res*, 23 (12):3097-3108.
- Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ. 2001. Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res*, 61 (2):659-665.
- Kovar H, Pospisilova S, Jug G, Printz D, Gardner H. 2003. Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression. *Oncogene*, 22 (21):3193-3204.

- Kovar H, Auinger A, Jug G, Aryee D, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M, Gadner H. 1993. Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene*, 8 (10):2683-2690.
- Ladenstein R, Potschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, van den Berg H, Dirksen U, Hjorth L, Michon J, Lewis I, Craft A, Jurgens H. 2010. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol*, 28 (20):3284-3291.
- Lecona E, Fernandez-Capetillo O. 2018. Targeting ATR in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18 (9):586-595.
- Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E, Watkins C, Carmichael J, Matulonis U. 2012. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med*, 366 (15):1382-1392.
- Lempiainen H, Halazonetis TD. 2009. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*, 28 (20):3067-3073.
- Lessnick SL, Ladanyi M. 2012. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol*, 7:145-159.
- Li D, Bi FF, Cao JM, Cao C, Li CY, Liu B, Yang Q. 2014. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 transcriptional regulation: a novel crosstalk between histone modification H3K9ac and ETS1 motif hypomethylation in BRCA1-mutated ovarian cancer. *Oncotarget*, 5 (1):291-297.
- Li Y, Tanaka K, Fan X, Nakatani F, Li X, Nakamura T, Takasaki M, Yamamoto S, Iwamoto Y. 2010. Inhibition of the transcriptional function of p53 by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing Family Tumors. *Cancer Lett*, 294 (1):57-65.
- Liu DP, Song H, Xu Y. 2010. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene*, 29 (7):949-956.
- Lloyd RL, Wijnhoven PWG, Ramos-Montoya A, Wilson Z, Illuzzi G, Falenta K, Jones GN, James N, Chabbert CD, Stott J, Dean E, Lau A, Young LA. 2020. Combined PARP and ATR inhibition potentiates genome instability and cell death in ATM-deficient cancer cells. *Oncogene*, 39 (25):4869-4883.
- Lok BH, Gardner EE, Schneeberger VE, Ni A, Desmeules P, Rekhman N, de Stanchina E, Teicher BA, Riaz N, Powell SN, Poirier JT, Rudin CM. 2017. PARP Inhibitor Activity Correlates with SLFN11 Expression and Demonstrates Synergy with Temozolomide in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 23 (2):523-535.
- Lord CJ, Ashworth A. 2017. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355 (6330):1152-1158.
- Lynch AD, Gani F, Meyer CF, Morris CD, Ahuja N, Johnston FM. 2018. Extraskeletal versus Skeletal Ewing Sarcoma in the adult population: Controversies in care. *Surg Oncol*, 27 (3):373-379.
- Marina NM, Liu Q, Donaldson SS, Sklar CA, Armstrong GT, Oeffinger KC, Leisenring WM, Ginsberg JP, Henderson TO, Neglia JP, Stovall MA, Yasui Y, Randall RL, Geller DS, Robison LL, Ness KK. 2017. Longitudinal follow-up of adult survivors of Ewing

- sarcoma: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer*, 123 (13):2551-2560.
- Marine JC, Lozano G. 2010. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ*, 17 (1):93-102.
- Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, Nava Rodrigues D, Robinson D, Omlin A, Tunariu N, Boysen G, Porta N, Flohr P, Gillman A, Figueiredo I, Paulding C, Seed G, Jain S, Ralph C, Protheroe A, Hussain S, Jones R, Elliott T, McGovern U, Bianchini D, Goodall J, Zafeiriou Z, Williamson CT, Ferraldeschi R, Riisnaes R, Ebbs B, Fowler G, Roda D, Yuan W, Wu YM, Cao X, Brough R, Pemberton H, A'Hern R, Swain A, Kunju LP, Eeles R, Attard G, Lord CJ, Ashworth A, Rubin MA, Knudsen KE, Feng FY, Chinnaiyan AM, Hall E, de Bono JS. 2015. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 373 (18):1697-1708.
- Michelena J, Lezaja A, Teloni F, Schmid T, Imhof R, Altmeyer M. 2018. Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. *Nat Commun*, 9 (1):2678.
- Mody RJ, Prensner JR, Everett J, Parsons DW, Chinnaiyan AM. 2017. Precision medicine in pediatric oncology: Lessons learned and next steps. *Pediatr Blood Cancer*, 64 (3).
- Moll UM, Petrenko O. 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*, 1 (14):1001-1008.
- Muller PA, Vousden KH. 2013. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*, 15 (1):2-8.
- Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S, Pommier Y. 2012. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*, 72 (21):5588-5599.
- Nakano K, Vousden KH. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7 (3):683-694.
- Neilsen PM, Pishas KI, Callen DF, Thomas DM. 2011. Targeting the p53 Pathway in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*, 2011:746939.
- Newman RE, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Notario V. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase turnover alterations do not contribute to PARP overexpression in Ewing's sarcoma cells. *Oncol Rep*, 9 (3):529-532.
- Nghiem P, Park PK, Kim Ys YS, Desai BN, Schreiber SL. 2002. ATR is not required for p53 activation but synergizes with p53 in the replication checkpoint. *J Biol Chem*, 277 (6):4428-4434.
- Nieto-Soler M, Morgado-Palacin I, Lafarga V, Lecona E, Murga M, Callen E, Azorin D, Alonso J, Lopez-Contreras AJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. 2016. Efficacy of ATR inhibitors as single agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*, 7 (37):58759-58767.
- Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, Mackintosh C, de Alava E, Myklebost O, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Serra M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Buerger H, Aigner T, Gabbert HE, Poremba C. 2010. Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer*, 49 (1):40-51.

- Ozaki T. 2015. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J Orthop Sci*, 20 (2):250-263.
- Pappo AS, Dirksen U. 2018. Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma, and Other Round Cell Sarcomas. *J Clin Oncol*, 36 (2):168-179.
- Paronetto MP. 2013. Ewing sarcoma protein: a key player in human cancer. *Int J Cell Biol*, 2013:642853.
- Parrales A, Iwakuma T. 2015. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol*, 5:288.
- Paulussen M, Bielack S, Jurgens H, Casali PG, Group EGW. 2009. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 20 Suppl 4:140-142.
- Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. 2019. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 16 (2):81-104.
- Pires IM, Olcina MM, Anbalagan S, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, McKenna WG, Hammond EM. 2012. Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *Br J Cancer*, 107 (2):291-299.
- Pishas KI, Lessnick SL. 2016. Recent advances in targeted therapy for Ewing sarcoma. *F1000Res*, 5.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*, 2010.
- Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. 2016. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*, 8 (362):362ps317.
- Reaper PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier JD, Maccormick S, Charlton PA, Golec JM, Pollard JR. 2011. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol*, 7 (7):428-430.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature*, 407 (6805):777-783.
- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I. 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*, 65 (24):11459-11468.
- Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, Conte P. 2017. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*, 377 (6):523-533.
- Rolfo C, de Vos-Geelen J, Isambert N, Molife LR, Schellens JHM, De Greve J, Dirix L, Grundtvig-Sorensen P, Jerusalem G, Leunen K, Mau-Sorensen M, Plummer R, Learoyd M, Bannister W, Fielding A, Ravaud A. 2019. Pharmacokinetics and Safety of Olaparib in Patients with Advanced Solid Tumours and Renal Impairment. *Clin Pharmacokinet*, 58 (9):1165-1174.
- Roos WP, Thomas AD, Kaina B. 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 16 (1):20-33.

- Salah S, Abuhijla F, Ismail T, Yaser S, Sultan I, Halalsheh H, Shehadeh A, Abdelal S, Almousa A, Jaber O, Abu-Hijlih R. 2019. Outcomes of extraskelatal vs. skeletal Ewing sarcoma patients treated with standard chemotherapy protocol. *Clin Transl Oncol*.
- Sallmyr A, Tomkinson AE. 2018. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *J Biol Chem*, 293 (27):10536-10546.
- Salovska B, Fabrik I, Durisova K, Link M, Vavrova J, Rezacova M, Tichy A. 2014. Radiosensitization of human leukemic HL-60 cells by ATR kinase inhibitor (VE-821): phosphoproteomic analysis. *Int J Mol Sci*, 15 (7):12007-12026.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73:39-85.
- Sangster-Guity N, Conrad BH, Papadopoulos N, Bunz F. 2011. ATR mediates cisplatin resistance in a p53 genotype-specific manner. *Oncogene*, 30 (22):2526-2533.
- Schipler A, Iliakis G. 2013. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res*, 41 (16):7589-7605.
- Schoonen PM, Kok YP, Wierenga E, Bakker B, Fojjer F, Spierings DCJ, van Vugt M. 2019. Premature mitotic entry induced by ATR inhibition potentiates olaparib inhibition-mediated genomic instability, inflammatory signaling, and cytotoxicity in BRCA2-deficient cancer cells. *Mol Oncol*, 13 (11):2422-2440.
- Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20 (11):698-714.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, 18 (1):134-147.
- Sigal A, Rotter V. 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, 60 (24):6788-6793.
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20 (3):175-193.
- Slade D. 2020. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev*, 34 (5-6):360-394.
- Sobhani N, D'Angelo A, Wang X, Young KH, Generali D, Li Y. 2020. Mutant p53 as an Antigen in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 21 (11).
- Somasundaram K. 2000. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci*, 5:D424-437.
- Song H, Hollstein M, Xu Y. 2007. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol*, 9 (5):573-580.
- Sonnemann J, Grauel D, Blumel L, Hentschel J, Marx C, Blumrich A, Focke K, Becker S, Wittig S, Schinkel S, Kramer OH, Beck JF. 2015. RETRA exerts anticancer activity in Ewing's sarcoma cells independent of their TP53 status. *Eur J Cancer*, 51 (7):841-851.

- Stahl M, Ranft A, Paulussen M, Bolling T, Vieth V, Bielack S, Gortitz I, Braun-Munzinger G, Harges J, Jurgens H, Dirksen U. 2011. Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 57 (4):549-553.
- Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. 2007. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 26 (15):2212-2219.
- Sullivan KD, Gallant-Behm CL, Henry RE, Fraikin JL, Espinosa JM. 2012. The p53 circuit board. *Biochim Biophys Acta*, 1825 (2):229-244.
- Sung P, Klein H. 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (10):739-750.
- Thomas A, Redon CE, Sciuto L, Padiernos E, Ji J, Lee MJ, Yuno A, Lee S, Zhang Y, Tran L, Yutzy W, Rajan A, Guha U, Chen H, Hassan R, Alewine CC, Szabo E, Bates SE, Kinders RJ, Steinberg SM, Doroshow JH, Aladjem MI, Trepel JB, Pommier Y. 2018. Phase I Study of ATR Inhibitor M6620 in Combination With Topotecan in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*, 36 (16):1594-1602.
- Thorsell AG, Ekblad T, Karlberg T, Low M, Pinto AF, Tresaugues L, Moche M, Cohen MS, Schuler H. 2017. Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *J Med Chem*, 60 (4):1262-1271.
- Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, Zhang Z, Lapouble E, Grossetete-Lalami S, Rusch M, Reynaud S, Rio-Frio T, Hedlund E, Wu G, Chen X, Pierron G, Oberlin O, Zaidi S, Lemmon G, Gupta P, Vadodaria B, Easton J, Gut M, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Shurtleff S, Laurence V, Michon J, Marec-Berard P, Gut I, Downing J, Dyer M, Zhang J, Delattre O, St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome P, the International Cancer Genome C. 2014. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov*, 4 (11):1342-1353.
- Tu J, Huo Z, Gingold J, Zhao R, Shen J, Lee DF. 2017. The Histogenesis of Ewing Sarcoma. *Cancer Rep Rev*, 1 (2).
- Virag L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM, Oliver FJ. 2013. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med*, 34 (6):1153-1167.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10 (8):789-799.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408 (6810):307-310.
- Wagner LM. 2015. Profile of veliparib and its potential in the treatment of solid tumors. *Oncotargets Ther*, 8:1931-1939.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412 (6847):607-614.
- Wang C, Jette N, Moussienko D, Bebb DG, Lees-Miller SP. 2017. ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib. *Transl Oncol*, 10 (2):190-196.

- Weber AM, Ryan AJ. 2015. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*, 149:124-138.
- Weterings E, Chen DJ. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*, 18 (1):114-124.
- Widhe B, Widhe T. 2000. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am*, 82 (5):667-674.
- Wilson AJ, Holson E, Wagner F, Zhang YL, Fass DM, Haggarty SJ, Bhaskara S, Hiebert SW, Schreiber SL, Khabele D. 2011. The DNA damage mark pH2AX differentiates the cytotoxic effects of small molecule HDAC inhibitors in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 12 (6):484-493.
- Worch J, Cyrus J, Goldsby R, Matthay KK, Neuhaus J, DuBois SG. 2011. Racial differences in the incidence of mesenchymal tumors associated with EWSR1 translocation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20 (3):449-453.
- Yan J, Jiang J, Lim CA, Wu Q, Ng HH, Chin KC. 2007. BLIMP1 regulates cell growth through repression of p53 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (6):1841-1846.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297 (5579):259-263.
- Zhang LN, Li JY, Xu W. 2013. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther*, 20 (1):1-7.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Zelllinien mit den jeweiligen Eigenschaften	34
Tab. 2: Verwendete Geräte und Materialien	35
Tab. 3: Verwendete Reagenzien, Kits, Medien, Puffer und Software	36
Tab. 4: Verwendete Primer-Sonden für die RT-PCR	37
Tab. 5: Verwendete Zellzahlen für die Aussaat in 75 cm ² -Kulturflaschen bei der Zellpassage	40
Tab. 6: Verwendete Konzentrationen der Wirkstoffe bei den durchflusszytometrischen Messungen	45
Tab. 7: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe unter Zugabe von z-VAD-fmk	47
Tab. 8: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Caspase-3-Aktivitätsmessung	49
Tab. 9: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die PCR-Messung	50
Tab. 10: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Western Blots	56
Tab. 11: Verwendete Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe für die Zellzyklusanalyse	57
Tab. 12: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in A673-Zellen	61
Tab. 13: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in WE-68-Zellen	63
Tab. 14: CI-Werte der Kombinationsbehandlungen in SK-ES-1-Zellen	65
Tab. 15: CI-Werte der Kombinationsbehandlung von Olaparib und VE-821 in SaOS-2-Zellen	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der selektiven Toxizität der Kombination von PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren auf Ewing-Sarkomzellen	21
Abb. 2: Strukturformel von Olaparib	26
Abb. 3: Strukturformel von Veliparib	27
Abb. 4: Strukturformel von VE-821	31
Abb. 5: Strukturformel von KU-55933	32
Abb. 6: Dotplots zur Auswertung der FACS-Messungen, beispielhaft an einer Probe der Zelllinie A673 abgebildet	44
Abb. 7: Darstellung des Histogramms bei der Zellzyklusanalyse; beispielhaft an einer Probe der A673-Zelllinie abgebildet	58
Abb. 8: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I), Veliparib + VE-821 (II) sowie Olaparib + KU-55933 (III) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in A673-Zellen	60
Abb. 9: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I), Veliparib + VE-821 (II) sowie Olaparib + KU-55933 (III) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in WE-68-Zellen	62
Abb. 10: Auswirkungen der Kombinationsbehandlung aus Olaparib + VE-821 (I) sowie Veliparib + VE-821 (II) auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in SK-ES-1-Zellen	65
Abb. 11: Auswirkungen von Olaparib auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in SaOS-2-Zellen	66
Abb. 12: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in A673-Zellen	67
Abb. 13: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in WE-68-Zellen	68
Abb. 14: Auswirkung der Zugabe von z-VAD-fmk auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in SK-ES-1-Zellen	69
Abb. 15: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in A673-Zellen	70
Abb. 16: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in WE-68-Zellen	70
Abb. 17: Wirkung von Olaparib auf die Caspase-3-Aktivität in Kombinationsbehandlung mit VE-821 in SK-ES-1-Zellen	71

Abb. 18: Relative Änderungen der Genexpression von PUMA, NOXA, BAX und BIM durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68	73
Abb. 19: Relative Änderungen der Genexpression von CDKN1A, MDM2 und TP53 durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68	74
Abb. 20: Relative Änderungen der Genexpression von ATR, BRCA-1 und EWS-FL1 durch VE-821 und Olaparib in A673 und WE-68	76
Abb. 21: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen durch Olaparib und VE-821 in A673-Zellen nach 2 h (A) und 24 h (B)	77
Abb. 22: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen durch Olaparib und VE-821 in WE-68-Zellen nach 2 h (A) und 24 h (B)	78
Abb. 23: Zellzyklusanalyse bei Einzel- und Kombinationsbehandlung von VE-821 und Olaparib in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)	80
Abb. 24: Vereinfachte Darstellung der zellulären Wirkungsweise der Kombinationsbehandlung aus PARP- und ATR-/ATM-Inhibitoren in Ewing-Sarkomzellen	94

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. James Beck, Dr. rer. nat. Jürgen Sonnemann, Sabine Becker, Dr. rer. nat. Christian Marx und Lisa Marx-Blümel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 18.11.2020

Hauke Matthias Schadwinkel