



**Fakultät für Medizin  
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. K. Höfler)**

**Der Einfluss des PARP Inhibitors AZD2281 (Olaparib) auf das  
Wachstum von Mantelzelllymphomen in Abhängigkeit  
vom ATM und p53 Mutationsstatus**

**Teresa Bernadette Steinbichler**

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.**

**Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler  
2. Univ.-Prof. Dr. I. Esposito**

**Die Dissertation wurde am 04.03.2014 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.12.2014  
angenommen.**

**Der Einfluss des PARP Inhibitors  
AZD2281 (Olaparib) auf das  
Wachstum von Mantelzelllymphomen  
in Abhängigkeit vom ATM und p53  
Mutationsstatus**

**Meinem Vater gewidmet in Dankbarkeit  
und Respekt**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
1. Einleitung .....	8
1.1. Mantelzelllymphome .....	9
1.1.1. Epidemiologie .....	9
1.1.2. Ätiologie .....	9
1.1.2.1 Umweltfaktoren .....	9
1.1.2.2. genetische Grundlagen .....	10
1.1.3. Klassifikation .....	12
1.1.4. Pathologie .....	15
1.1.5. Klinik .....	16
1.1.6. Diagnose und Therapie .....	16
1.2 molekularpathologische Grundlagen .....	19
1.2.1 DNA-Reparaturmechanismen .....	19
1.2.2. Signalwege der Reparatur von DNA-DSB .....	20
1.2.3. Die Poly-(ADP-Ribose)Polymerase (PARP)-1 .....	22
2. Zielsetzung .....	23
3. Materialien und Methoden .....	24
3.1. Materialien .....	24
3.1.1. Geräte .....	24
3.1.2. Chemikalien .....	25
3.1.3. Antikörper zur Proteindetektion .....	26
3.1.4. Puffer und Lösungen .....	27
3.1.5 Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese .....	28
3.1.6. Zelllinien .....	29
3.2. Methoden .....	31
3.2.1. Zellkultur .....	31
3.2.2. Zell-Proliferationsassay .....	31
3.2.3. Proteinisolierung .....	31
3.2.4. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford .....	32
3.2.5. SDS-Gelelektrophorese .....	32
3.2.6. Western-Blot .....	32
3.2.7. Immundetektion .....	33
4. Ergebnisse .....	34
4.1. Zell-Proliferationsassay .....	34
4.1.1. Zell-Proliferationsassay mit Granta-519 .....	34
4.1.2. Zell-Proliferationsassay mit JeKo-1 .....	35
4.1.3. Zell-Proliferationsassay mit Mino .....	36

4.1.4. Zell-Proliferationsassay mit NCEB-1 .....	37
4.1.5. Zell-Proliferationsassay mit Z138 .....	38
4.2. Western Blot Analysen.....	39
4.2.1. Western Blots nach isolierter Behandlung mit AZD2281 .....	40
4.2.2 ATM Kinase- Sensor von DNA Schäden .....	42
4.2.3 NBS1/p95- DNA-Reparaturenzym und Regulator des Zellzyklus .....	45
4.2.4 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP).....	47
4.2.5 p53- “Wächter des Genoms” .....	48
4.2.6 p21 Waf1/Cip1- Tumorsuppressorgen .....	49
4.2. 7 Histone H2A.X – Baustein der Chromatin Struktur .....	50
4.2.8 $\alpha$ - Tubulin.....	51
5. Diskussion .....	52
5.1. Zellproliferationsassay .....	53
5.1.1. Zellproliferationsassay an Zelllinien mit mutiertem ATM Status .....	53
5.1.2. Zellproliferationsassay an Zelllinien ohne ATM Mutation.....	54
5.2. Western Blot Analysen.....	57
5.2.1 Western Blot Analysen an ATM .....	57
5.2.2. Western Blot Analysen von NBS-1/ p95 .....	58
5.2.3. Western Blot Analysen von PARP .....	59
5.2.4 Western Blot Analysen von Phospho-p53 (Ser15) .....	60
5.2.5 Western Blot Analysen von p21 .....	61
5.2.6 Western Blot Analysen von Phospho-Histone H2A.X (Ser139) .....	62
6. Zusammenfassung .....	63
7. Literaturverzeichnis.....	64

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Akt1	akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APS	Ammonium Persulfate
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ATM	ataxia teleangiectasia mutated kinase
ATR	ATM-Rad3-related
AZD	AZD2281 (Olaparib)
bcl-6	B-cell lymphoma 6 protein
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BMI1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BRCA	breast cancer
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclin abhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Chk	human cell cycle checkpoint kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristine, Prednison
Cis	Cisplatin
Ctrl	Kontrolle (Control)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESB	Einzelstrangbrüche
FCS	fetales Kälberserum
FISH	fluorescent in situ hybridization
g	Gramm
G- Phase	„Gap“- Phase
h	Stunden
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobuline
IPI	International Prognostic Index
kb	Kilobasen
l	Liter
LDH	Laktat- Dehydrogenase
LK	Lymphknoten
M	Molar

MALT	mukosa associated lymphatic tissue
MCL	Mantelzelllymphome
mdm2	Mouse double minute 2 homolog
mre11	Meiotic recombination 11 homolog
m- RNA	messenger- RNA
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEJ	Non- Homologous Endjoining
NHL	Non Hodgkin Lymphom
p	Protein
PARG	Poly-(ADP-Ribose)Glykohydrolase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PIKK	phosphoinositide 3-kinase related kinases
PI3	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rb	Retinoblastom
REAL	Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
Ser	Serin
S- Phase	Synthese- Phase
SSA	Single strand annealing
t	Translokation
TTBS	Tris- gepufferte Saline und Tween 20
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
WHO	world health organization
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein

## 1. Einleitung

Maligne Tumore sind nach den Herz-Kreislauf Erkrankungen die häufigste Todesursache in Industrienationen. (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012)

Die Behandlung von malignen Tumoren ist in den meisten Fällen immer noch eine große Herausforderung und oft nicht erfolgreich.

Der Grundstein für die onkologische Forschung wurde bereits 1975 durch H.E. Varmus und J.M. Bishop in San Francisco, Kalifornien, mit der Entdeckung des *ras*-Sarcoma Protoonkogens gelegt (Bishop et al., 1975).

Seither wird intensiv auf diesem Gebiet geforscht und versucht, neue Therapiekonzepte zu entwickeln, die tumorspezifisch sind und weniger Nebenwirkungen für proliferierende Zellen, insbesondere die des Knochenmarks und Gastrointestinaltraktes haben.

Auch wenn dies in Einzelfällen gelungen ist, wie z.B. bei der Therapie von Mamma-Karzinomen mit Herceptin, ist man auch knapp 40 Jahre später noch weit davon entfernt, die Biologie und Entwicklung von Tumoren vollständig zu verstehen und spezifische Therapien entwickeln zu können.

Die Therapie von Mantelzelllymphomen ist äußerst schwierig, da eine Heilung mittels konventioneller Radiochemotherapie nicht möglich ist.

Die mediane Überlebenszeit liegt bei 3-4 Jahren. Damit haben Mantelzelllymphome die schlechteste Prognose von allen niedrigmalignen Lymphomen.

Trotz der geringen Mitoserate lässt sich bei diesem Tumor selten eine stabile Remission erreichen. Er neigt schon frühzeitig zur Metastasierung (*Pathologie*, Denk, Heitz, Böcker, 2008) (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012)

Zu diesem Zweck, werden in dieser Arbeit neue spezifische Therapiekonzepte in einem *in vitro* Zellkultur Modell untersucht. Es wird versucht, eine molekularbiologische Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen der verschiedenen Zelllinien zu geben.



## **1.1. Mantelzelllymphome**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Mantelzelllymphome (MCL) machen 5% aller Lymphome aus.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren, Kinder erkranken sehr selten.

75% der Patienten sind männlich (*Innere Medizin 2010*, Herold G., 2010).

Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich 80% in den fortgeschrittenen Stadien III und IV. Mehr als ein Viertel der Patienten haben B-Symptome, wie Nachtschweiß, Fieber und unerklärten Gewichtsverlust.

Die durchschnittliche 5- Jahres Überlebensrate beträgt 25%. Patienten mit Langzeitüberleben haben meist lokalisierte MCL (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012).

### **1.1.2. Ätiologie**

#### **1.1.2.1 Umweltfaktoren**

Generell sind einige Umweltfaktoren bekannt, die das Risiko an einem malignen Lymphom zu erkranken, erhöhen.

Dazu zählen erworbene Immundefekte wie HIV Infektionen, iatrogene Immunsuppression und sekundäre Hypogammaglobulinämien.

Auch Autoimmunerkrankungen wie z.B. das Sjörgen Syndrom und Umweltfaktoren wie Strahlung, Dioxin und Phenoxyherbizide sind Risikofaktoren für das Auftreten eines malignen Lymphoms (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012).

In der SCALE Studie konnte, im Gegensatz zur üblichen Annahme, gezeigt werden, dass eine negative Korrelation zwischen der Exposition gegenüber UV-Strahlung und dem Auftreten von Non Hodgkin Lymphomen (NHL) besteht (Ekström Smedby et al., 2005).

Ein spezifischer Risikofaktor für MCL sind klinisch auffällige und subklinische Infektionen mit *Borrelia burgdorferi*, die das Risiko für das Auftreten eines MCL um das 3-fache erhöhen. Der vermutete Mechanismus ist, ähnlich wie bei *Helicobacter pylori* assoziierten Magenkarzinomen, der einer chronischen, antigenabhängigen Immunstimulation. Diese unterhält die Proliferation von B-Lymphozyten (Schöllkopf et al., 2008).

Auch ein Zusammenhang mit Hepatitis C Virus (HCV) Infektionen wird diskutiert. Bei einem Patienten mit MCL kam es nach der Therapie der Hepatitis C Infektion zu einer Vollremission (Levine, Shimodaira, & Lai, 2003)(Zuckerman et al., 1997).

### 1.1.2.2. genetische Grundlagen

Charakteristisch für MCL ist die Translokation t(11; 14)(q13; q32). Dadurch gerät das Cyclin D1- Protoonkogen unter die translationale Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten Enhancers und wird überexprimiert.

Cyclin D1 führt in Kombination mit den Cyclin-abhängigen-Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), durch inaktivierende Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb), zu einer Progression des Zellzyklus in der G1/S-Phase. Dieser Übergang von der G1- in die S-Phase führt irreversibel zur Vollendung des Zellzyklus und damit zur Zellteilung (Bertoni, Rinaldi, Zucca, & Cavalli, 2006).

Diese Mutation allein ist nicht ausreichend für die maligne Transformation von B-Lymphozyten. Transgene Mäuse mit der Mutation t(11;14)(q13;q32) zeigen keine erhöhte Inzidenz an B-Zell-Lymphomen (Lovec, Grzeschiczek, Kowalski, & Möröy, 1994). Auch bei gesunden Probanden lassen sich in 1-2% der Fälle im peripheren Blut t(11;14) Translokationen nachweisen (Hirt, Schüler, Dölken, Schmidt, & Dölken, 2004).

Cyclin D1 wird von zwei verschiedenen messenger- RNA (mRNA) Sequenzen kodiert, die sich in der Länge des 3'-untranslatierten Bereichs (3'- UTR) unterscheiden. Das längere Transkript umfasst 4,5 Kilo- Basenpaare (kb), das Kürzere nur 1,5kb, und findet sich in 4-10% der MCL. Die 3'-UTR enthält destabilisierende Sequenzen wie AUUUA. In der kürzeren Variante fehlen diese oder sind vermindert. Daher ist die Halbwertszeit der mRNA größer und die Cyclin-D1 Konzentrationen in den Tumorzellen höher. Dies korreliert klinisch mit einer kürzeren medianen Überlebenszeit der Patienten und höheren Proliferationsindex der Lymphomzellen (Jares, Colomer, & Campo, 2007) (Kienle et al., 2007).

Die Tumorzellen zeigen Veränderungen in der späten G1-Phase bzw. dem G1/S-Phase Übergang. Die hohen Cyclin D1 Spiegel bilden in Kombination mit CDK4 und p27 Komplexe, was zur Folge hat, dass p27 den G1-Phase Arrest nicht induzieren kann (Quintanilla-Martinez et al., 2003).

Zur Veränderungen des Zellzyklus in dieser Phase führen auch Deletionen des CDKN2A Gens. Dieses Gen kodiert für p16, einem Inhibitor der CDK4 und 6, und für ARF, einem Protein, welches p53 stabilisiert. Diese Deletion tritt in 20-30% der schnell proliferierenden MCL auf (Jares et al., 2007)(Fernández, Hartmann, Ott, Campo, & Rosenwald, 2005).

Weitere Mutationen, wie Amplifikationen des CDK4 Locus, inaktivierende Mikrodeletionen von Rb1 und Amplifikationen von BMI1, führen ebenfalls zur Alteration dieser Phase des Zellzyklus. Sie treten vor allem in MCL auf, die keine Mutation des CDKN2A Gens besitzen (Jares et al., 2007).

MCL besitzen auch Veränderungen antiapoptotisch wirkender Signalwege, wie zum Beispiel eine konstitutive Aktivierung von NFκB und des PI3K/Akt Überlebenssignalwegs, vor allem in blastoiden Varianten von MCL (Pham et al., 2003) (Rudelius et al., 2006).

Ungefähr ein Drittel aller MCL haben zusätzlich Mutationen des TP53 Tumorsuppressorgens (Beà et al., 2013). P53 wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet, da p53 im Rahmen von DNA Schädigungen einen Zellzyklusarrest auslösen kann. Dies ist ein wichtiger Schutzmechanismus, welcher der Tumorgenese entgegenwirkt. P53 Mutationen finden sich in bis zu 50% aller soliden und hämatologischen Neoplasien (Williamson et al., 2012).

Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese von MCL sind auch Defekte in den DNA-Reparaturmechanismen.

20% - 50% der MCL weisen ATM (ataxia teleangiectasia mutated kinase) Mutationen auf. Damit haben sie die höchste Rate an ATM Mutationen aller NHL. ATM ist eine Serin-/Threonin Proteinkinase, die eine wichtige Rolle in der Induktion einer zellulären Antwort auf DNA-Schäden, insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), spielt (Williamson et al., 2010). Der Name ATM resultiert aus der Erstbeschreibung dieses Enzyms im Zusammenhang mit der hereditären, neurodegenerativen Erkrankungen Ataxia teleangiectasia, die durch ATM Mutationen verursacht wird. Diese Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und ist gekennzeichnet durch progrediente Kleinhirnatrophie, okulokutane Teleangiektasien, Immundefekte und Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Hickson et al., 2004).

Neben der ATM Mutation können auch weitere an der DNA-Reparatur beteiligte Gene verändert sein. Teilweise finden sich reduzierte Expressionslevel von CHK1/2 in MCL, zweier Serin-/ Threonin Proteinkinasen, die an der Induktion eines Zellzyklus-Arrest als Antwort auf eine ATM Aktivierung beteiligt sind.

MCL, die eine ATM Mutation aufweisen, haben ein höheres Maß an chromosomaler Instabilität, die zu weiteren Verlusten an Tumorsuppressorgenen führen kann. Bei MCL ist hierbei insbesondere der Verlust von p53 von Bedeutung (Bertoni et al., 2006). 10% aller MCL besitzen sowohl ATM als auch p53 Mutationen (Williamson et al., 2012).

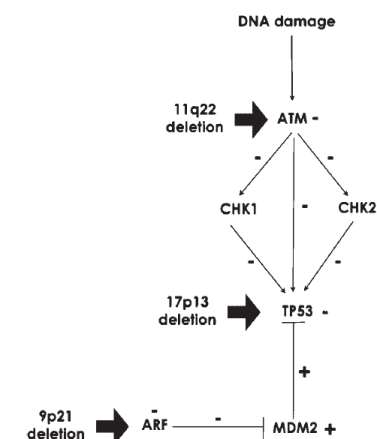


Abbildung 1.1.2.2. 1 (Bertoni et al., 2006)

Generell gehören MCL zu den NHL mit dem höchsten Maß an genomischer Instabilität. Dies äußert sich auch durch das gehäufte Auftreten von Tetraploidien, insbesondere in pleomorphen (80%) und blastoiden (36%) Varianten (Ott et al., 1997).

### 1.1.3. Klassifikation

Im Allgemeinen teilt man Lymphome in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome ein. Non-Hodgkin-Lymphomen werden in B- Zell- Lymphome und in die selteneren T- Zell- Lymphome eingeteilt. Mantelzell-Lymphome sind Non-Hodgkin-Lymphome die von B- Lymphozyten abstammen (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012).

Die Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome war im 20. Jahrhundert ständigen Veränderungen unterworfen und ist zum Teil sehr unübersichtlich.

Die erste Klassifikation, die sich als valide in der Praxis erwiesen hat, war die „REAL-Klassifikation“ (Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms) der „International Lymphoma Study Group“. Sie berücksichtigt Morphologie, Geno- und Phänotyp und klinische Aspekte. Die Relevanz der einzelnen Kriterien variiert je nach Subtyp, so dass es keinen Goldstandard zur Differenzierung der einzelnen Lymphom Subtypen gibt. Seit 2001 gilt nun die Klassifikation der WHO für maligne Lymphome, welche eine Aktualisierung der REAL Klassifikation von 1994 darstellt (Cogliatti & Schmid, 2001).

<b>REAL 1994</b>	<b>WHO 2001</b>
<b>B- Zell- Neoplasien</b>	<b>B- Zell- Neoplasien</b>
<b>Vorläufer B-Zell- Neoplasien</b> Vorläufer B- lymphoblastische Leukämie/ Lymphom	<b>Vorläufer B-Zell- Neoplasien</b> Vorläufer B- Zell lymphoblastische Leukämie/ Lymphom
<b>Periphere B- Zell- Neoplasien</b>  B-Zell chronische lymphatische Leukämie/ Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom/ B-Zell prolymphozytische Leukämie Lymphoplasmazytisches Lymphom/ Immunozytom  Marginalzonen B-Zell Lymphom der Milz Haarzellenleukämie  Plasmozytom/ Plasmazellmyelom  Nodales/ extranodales Marginalzonen-B-Zell- Lymphom  Follikuläres Lymphom Varianten: Grad 1, 2 und 3, follikuläres Keimzentrumslymphom  Mantelzelllymphom  Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom Varianten: Primär mediastinales diffus großzelliges B-Zell- Lymphom Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Hochgradiges B-Zell-Lymphom, Burkitt- ähnlich, Burkitt Lymphom, Burkitt-Leukämie	<b>Reife B- Zell- Neoplasien</b>  chronische lymphatische Leukämie/ Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom B-Zell prolymphozytische Leukämie Lymphoplasmazytisches Lymphom/ Marginalzonen B-Zell Lymphom der Milz Haarzellenleukämie  Plasmazelluläre Neoplasien: Plasmazellmyelom Ossäres Plasmozytom Extraossäres Plasmozytom  Extranodales Marginalzonen B-Zell- Lymphom des MALT Nodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom  Follikuläres Lymphom Varianten: Grad 1, 2 und 3a und b Diffuses follikuläres Keimzentrumslymphom  Mantelzelllymphom  Diffus großzelliges B-Zell Lymphom Varianten: zentroblastisch, immunoblastisch, T-Zell oder histiozyten reich, plasmablastisch, mit Expression vollständiger ALK (IgA) Mediastinales diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Intravaskuläres diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Primäres Ergusslymphom  Burkitt Lymphom Atypisches (pleomorphes Burkitt-Lymphom) Burkitt Leukämie

	<b>B-Zell-Neoplasien mit unklarem malignem Potential:</b>  Lymphomatoide Granulomatose Posttransplantations lymphoproliferative Erkrankung
--	---

**Tabelle 1.1.3. 1** (Cogliatti & Schmid, 2001)

Die Stadieneinteilung von MCL erfolgt, wie die der Hodgkin-Lymphome, nach der Ann Arbor-Klassifikation.

<b>Ann Arbor Klassifikation für maligne Lymphome</b>	
Stadium I	Befall einer einzelnen Lymphknotenregion oder lymphatischen Struktur
Stadium II	Befall von zwei oder mehreren Lymphknotenregionen auf derselben Seite des Zwerchfells (mediastinale und hiläre Lymphknoten jeweils eine Region), die Zahl der Regionen ist anzugeben
Stadium III	Befall von Lymphknotenregionen oder lymphatischen Strukturen auf beiden Seiten des Zwerchfells III <sub>1</sub> ggf. mit LK am Milzstiel, Leberstiel, Truncus coeliacus III <sub>2</sub> mit paraaortalen, inguinalen oder iliakalen Lymphknoten
Stadium IV	Befall von extranodalen Regionen, der über die Bezeichnung „E“ hinausgeht
	A: keine Symptome B: Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust über 10% des Körpergewichts X: Bulky Disease, > 1/3 der Thoraxapertur, > 10cm max. Durchmesser von Lymphknotenaggregaten E: fokaler Befall einer extranodalen Region, im Anschluss an/ nahe eine/r bekannte/n befallene Lymphknotenregion

**Tabelle 1.1.3.2** (*Harrisons Innere Medizin, Suttrop & Dietel, 2012*)

Darüber hinaus spielt auch der „International Prognostic Index“ eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen, da er eine prognostische Einschätzung der Erkrankung erlaubt und damit eine Therapie Entscheidung erleichtern kann.

Dieser Index berücksichtigt fünf klinische Faktoren, wie erhöhte Werte der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Serum oder auch extranodale Manifestationen, jeweils danach, ob sie vorhanden sind (1 Punkt) oder nicht (0 Punkte).

<b>International Prognostic Index (IPI) bei NHL</b>
Alter ≥ 60 Jahre
LDH > normal
Performance Status ≥ 2 (ECOG) oder ≤ 70 (KarnofskyIndex)
Ann Arbor Stadium III/ IV
> 1 extranodale Struktur befallen

**Tabelle 1.1.3. 3** (*Harrisons Innere Medizin, Suttrop & Dietel, 2012*)

Obwohl sich der „International Prognostic Index“ bei vielen Lymphomen als hilfreich erwiesen hat, ist dessen Bedeutung bei MCL umstritten.

Für MCL wurde ein eigener IPI entwickelt, der sogenannte MIPI. Dieser erlaubt eine deutlich bessere prognostische Einschätzung als der IPI. In diesen Score fließen die Anzahl der Leukozyten, Alter des Patienten, LDH Spiegel und der Performance Status nach der „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG) mit ein (Geisler et al., 2010) (Hoster et al., 2008).

Außerdem erlaubt der Proliferationsindex, ermittelt durch quantitative Bildanalysen von Gewebeschnitten, die in Paraffin eingebettet sind, eine gute prognostische Einordnung. Die histologischen Schnitte werden dafür mit Ki-67-Antikörpern mittels Immunhistochemie gefärbt (Geisler et al., 2010).

Dieser Proliferationsindex kann eine Entscheidung zwischen intensivierter (RIT-CHOP, (R)ICE, autologe Stammzelltransplantation) und konventioneller (RIT-CHOP) Therapie ermöglichen, wobei als Grenze die 30% Marke gewählt wurde (Schaffel et al., 2010).

Die Genexpressionen von Rb1, p27, mdm2, mcl1 und ATM haben eine signifikant negative Auswirkung auf den ki67- Proliferationsindex (Kienle et al., 2003).

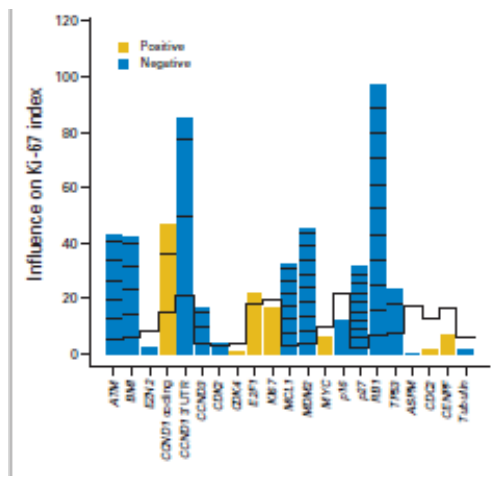


Abb. 1.13 (Kienle et al., 2003)

#### 1.1.4. Pathologie

Der zelluläre Ursprung der MCL Zellen ist immer noch weitestgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass die Lymphomzellen von reifen B-Zellen abstammen, die eine extrazelluläre, T-Zell-unabhängigen Reifung durchgemacht haben (Bertoni et al., 2006).

Früher nahm man an, dass die Tumorzellen von unreifen B-Zellen abstammen, die noch keinen Antigen-Kontakt und Reifung in den Keimzentren der Lymphfollikel durchgemacht haben. Circa 80% der Tumorzellen besitzen keine mutierten Ig-Schwerketten (IgH), die restlichen 20% der Tumorzellen haben mutierte IgH (Walsh & Rosenquist, 2005).

In MCL Zellen finden keine weiteren somatischen Hypermutationen statt. Das spricht für postfollikuläre B-Zellen, die nicht länger einer Antigen-Stimulation unterliegen (Walsh & Rosenquist, 2005).

Es konnten weder ein Wechsel des Isotyps der IgH noch bcl-6 -ein Marker der Zentrocyten nachgewiesen werden, was gegen die Hypothese spricht, dass MCL Zellen sich unter dem Einfluss des Keimzentrums der Lymphfollikel entwickeln (Kienle et al., 2007).

Allerdings fanden sich sowohl in MCL Zellen mit un- und mutierten IgH Genen, sogenannte zirkuläre Transkripte, die bei dem Wechsel des IgH Isotyps durch Splicing entstehen (Babbage et al., 2004).

Eventuell entsteht dieser Isotyp-Wechsel extrafollikulär (Walsh & Rosenquist, 2005). Auch die somatische Hypermutation der IgH-Gene könnte außerhalb des Einflusses des Keimzentrums stattfinden (Walsh et al., 2003).

Der Mutationsstatus der IgH Gene hat keine prognostische Relevanz (Walsh et al., 2003) (Kienle et al., 2007).

Die kleinen lymphoiden Zellen sind unregelmäßig geformt und besitzen einen schmalen Zytoplasmasaum. Der Nucleus ist rund oder leicht eingekerbt, das Chromatin ist heterochromatisch.

In ungefähr 20% der MCL sind die Tumorzellen größer und stärker pleomorph. Sie weisen kleine Nucleoli in ihren euchromatischen Zellkernen auf. Diese werden als blastoide Lymphomzellen bezeichnet.

Die Proliferationsrate der blastoiden Varianten ist höher und die Prognose schlechter. Typischerweise besitzen diese Formen eine Überexpression von Mcl1- einem antiapoptotisch wirkenden Protein (Kienle et al., 2007).

Lymphozytäre Formen können in blastoide Formen übergehen und damit eine schnellere Progression des Tumors bedingen.

In 70% der Autopsien von Patienten wurden blastoide Varianten gefunden (Norton et al., 1995).

Die neoplastischen Zellen wachsen entweder nodulär (30% der Fälle bei Diagnosestellung) oder diffus. Teilweise kommen auch beide Wachstumsformen nebeneinander vor oder gehen ineinander über.

Diese nodulären Strukturen imitieren zum Teil Primär- oder Sekundärfollikel.

Innerhalb dieser Zellansammlungen können auch andere Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden, wie zum Beispiel Makrophagen oder follikuläre dendritische Zellen (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012) (*Pathologie*, Denk, Heitz, Böcker, 2008).

### **1.1.5. Klinik**

Die häufigste primäre Manifestation von MCL ist eine palpable Lymphadenopathie und Splenomegalie, häufig kombiniert mit charakteristischer B-Symptomatik.

Die Tumorzellen infiltrieren den Gastrointestinaltrakt, zum Beispiel in Form einer Lymphomatosis Polyposa des Colons oder den Waldeyer'schen Rachenring.

Der Tumor wird meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, in 80% der Fälle im Stadium IV.

Deswegen findet man häufig schon bei der Erstdiagnose eine Beteiligung des Knochenmarkes (64%) (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012).

### **1.1.6. Diagnose und Therapie**

Die Differentialdiagnose von MCL kann aufgrund der histologischen Ähnlichkeit zu anderen kleinzelligen Non-Hodgkin-Lymphomen, aber auch zu reaktiven Prozessen, wie Mantelzonen-Hyperplasie oder der Castleman'schen Krankheit, schwierig sein.

Die Diagnose erfordert zunächst eine adäquate Biopsie, die dann durch einen Hämatopathologen beurteilt wird (*Harrisons Innere Medizin*, Suttorp & Dietel, 2012).

Die Diagnose kann leichter mit Hilfe von modernen Techniken, wie der „Fluorescence In Situ Hybridization“ (FISH) zum Nachweis der für diesen Tumor charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;32), gestellt werden.

Dabei hat sich gezeigt, dass „double-fusion-signals“ spezifischer für MCL sind, als „single-fusion-signals“ (Caraway et al., 2005).

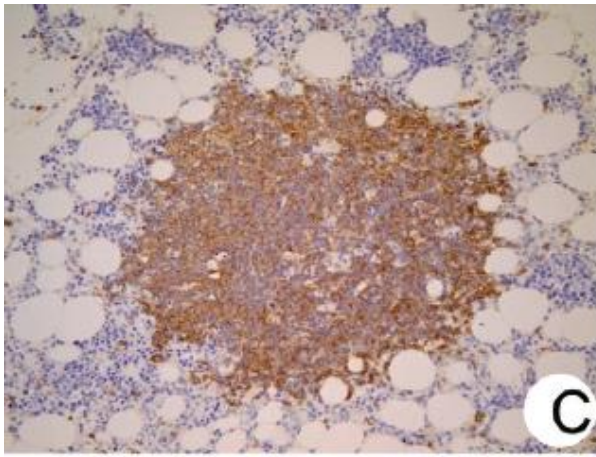
Auch immunhistologische Färbungen mit dem Nachweis der Oberflächenantigene CD5+/CD43+/CD10-/CD23- sowie der Überexpression von Cyclin D1 können hilfreich sein.

Die FISH ist der Goldstandard im Vergleich zu anderen Verfahren wie beispielsweise Immunhistologie und PCR. Diese haben eine höhere Rate an falsch negativen Ergebnissen (Bertoni et al., 2006).

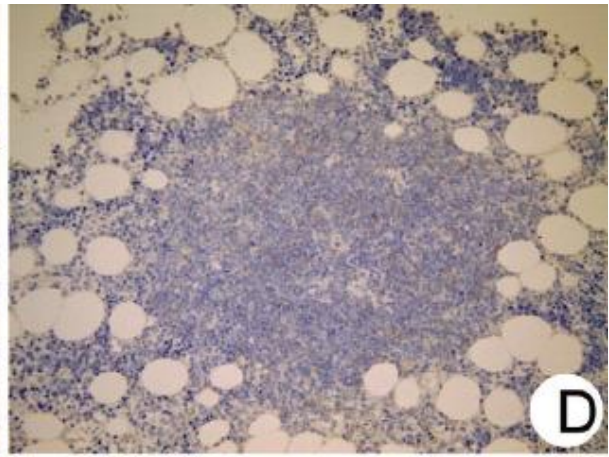
Es konnten aber auch MCL gefunden werden, die die Translokation t(11;14)(q13;32) nicht aufweisen und auch Cyclin D1 nicht überexprimieren (Fu et al., 2005). Diese Cyclin-D1-negativen Varianten können mit oben genannten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Da sie aber weniger als 10% der MCL ausmachen, sollte ein negatives FISH-Ergebnis für t(11;14)(q13;q32) immer noch als starkes Kriterium gegen die Diagnose eines MCL gelten (Bertoni et al., 2006).

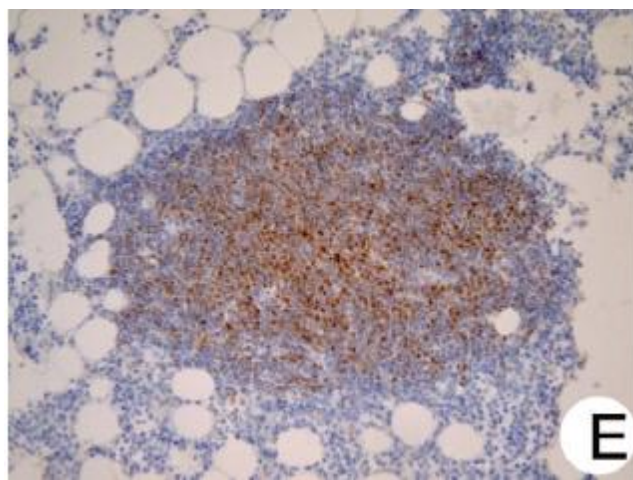




Anti-CD-20 Immunhistochemie



Anti-CD-23 Immunhistochemie



Anti-Cyclin-D1 Immunhistochemie

**Abbildung 1.1.6. 1** (Ohno, Katsurada, Isoda, & Yoshida, 2009)

Die Therapie von MCL ist schwierig.

Bei lokalisierten Formen kann eine kombinierte Radio-Chemo-Therapie erfolgreich sein. Diese Formen sind allerdings äußerst selten.

Die Kombination der Standardchemotherapie CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristine, Prednison) mit dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab ist wirksamer als die Standardtherapie (CHOP) (Lenz et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz, der vor allem bei jüngeren Patienten Anwendung findet, ist eine hoch dosierte Chemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation. Sie hat sich gegenüber einer Erhaltungstherapie mit Interferon- $\alpha$  als überlegen erwiesen (Dreyling & Hiddemann, 2009).

Der einzige kurative Therapieansatz bleibt eine allogene Stammzelltransplantation, da der Patient von dem „graft-versus-leukemia“ Effekt profitieren kann. Diese sollte bei jüngeren Patienten (<65 Jahren) mit einem Rezidiv erwogen werden. Es bleibt das Risiko einer „graft-versus-host“ Reaktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapie von MCL unbefriedigend bleibt. Der jeweilige Therapieansatz sollte von den persönlichen Risikofaktoren und dem Allgemeinzustand des Patienten abhängig gemacht werden (Dreyling & Hiddemann, 2009) (Weigert, Unterhalt, Hiddemann, & Dreyling, 2009).

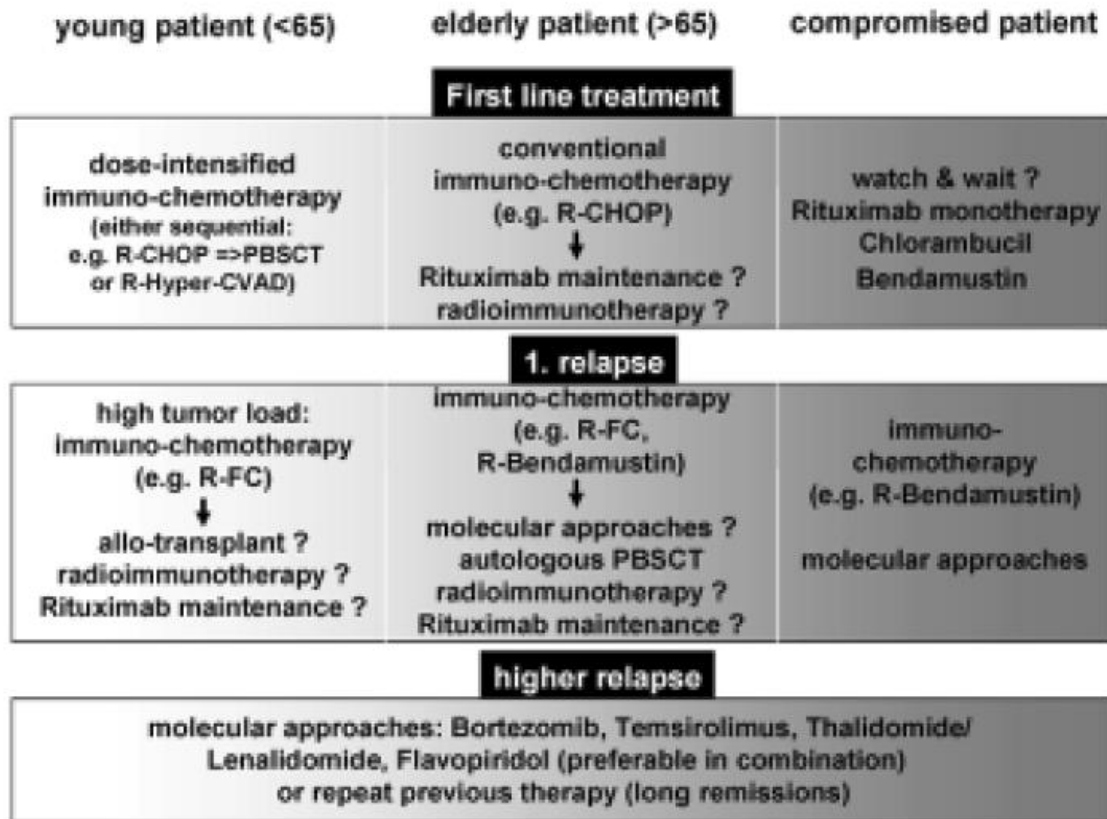


Abbildung 1.1.6. 2 (Dreyling & Hiddemann, 2009)

## 1.2 molekularpathologische Grundlagen

### 1.2.1 DNA-Reparaturmechanismen

Die Integrität des menschlichen Genoms wird ständig durch eine Vielzahl exogener und endogener Faktoren bedroht. Daher haben sich Reparaturmechanismen entwickelt, die entstandene Schäden beseitigen sollen. Andernfalls würden die Zellen bei jeder Mitose Gefahr laufen, Mutationen anzuhäufen und an die Tochterzellen weiterzugeben. Dies führt zu genomischer Instabilität und maligner Transformation.

Generell unterscheidet man zwischen Einzel (ESB)- und Doppelstrangbrüchen (DSB). Dabei stellen DSB die größte Herausforderung für die Zellen dar und sind potentiell letale Läsionen. Sie können auch zum Verlust einzelner Gene oder zur Entstehung von malignen Neoplasien beitragen (Deutzmann, 2006).

DNA DSB werden durch endogene Faktoren, wie reaktive Sauerstoffspezies, sowie exogene Faktoren, wie radioaktive Strahlung und bestimmte Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin, ausgelöst (*Pharmakologie und Toxikologie*, Wehling, 2010).

Auch entstehen sie in physiologischer Weise während der Meiose, der Rekombination der Immunglobulin-Gensegmente, und während der Integration sog. mobiler DNA-Abschnitte.

Zunächst werden DNA-Schäden durch „checkpoint“-Mechanismen registriert und führen zu einem Arrest des Zellzyklus. Dieser soll verhindern, dass Mutationen an Tochterzellen weitergegeben werden. Der Zellzyklus wird nach vollendeter Reparatur fortgesetzt, oder es wird, wenn die DNA-Schäden so ausgeprägt sind, dass eine Reparatur nicht möglich ist, die Apoptose der Zellen induziert.

Allgemein werden DNA DSB in eukaryontischen Zellen hauptsächlich über zwei Mechanismen repariert: das nichthomologen Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR).

Bei der homologen Rekombination wird ein homologer DNA-Abschnitt, also z.B. das Schwester-Chromatid oder ein homologes Chromosom, als Vorlage für die Neusynthese des beschädigten DNA-Abschnittes verwendet.

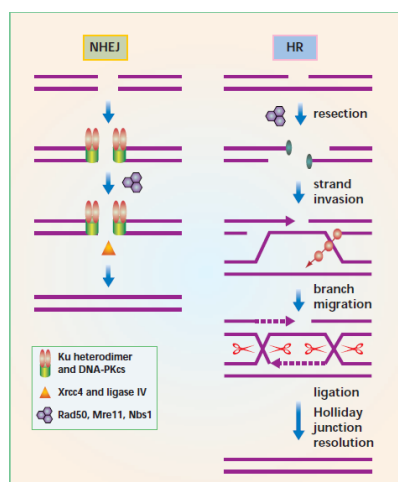


Abbildung 1.2.1. 1(Khanna & Jackson, 2001)

Daraus resultiert eine fehlerfreie Reparatur und es geht keine genetische Information verloren (Featherstone C. & Jackson S., 1999). In menschlichen Zellen ist die HR v.a. in pluripotenten Zellen wichtig und findet in der späten S- und der G2-Phase statt (Khanna & Jackson, 2001).

Generell ist das NHEJ in menschlichen Zellen von größerer Bedeutung, v.a. in differenzierten Zellen. Es findet in allen Stadien des Zellzyklus statt (Rothkamm, Kru, Thompson, & Lo, 2003) (Adams, Golding, Rao, & Valerie, 2010).

Bei dem NHEJ werden die abgebrochenen DNA-Enden direkt miteinander verbunden. Dazu bildet das Ku 70/80-Heterodimer mit DNA-PK im Bereich der DNA-Enden einen Komplex, das sog. DNA-PK-Holoenzym. Die DNA-Enden werden zusammengebracht und durch den rad50/mre11/NBS1-Komplex prozessiert. Die eigentliche Verknüpfung der DNA-Stränge erfolgt dann durch den DNA-Ligase-4-XRCC-Komplex (Kanaar & Hoeijmakers, 1998). Durch das NHEJ kann es zum Verlust einzelner Basen der DNA kommen, aber auch zu einer fehlerfreien Reparatur (Featherstone C. & Jackson S., 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Reparatur von DSB ist das sogenannte „single-strand-annealing“ (SSA).

Dabei werden homologe Abschnitte desselben DNA-Doppelstranges mit einander verknüpft und dazwischen liegende Segmente exzidiert. Dadurch kommt es zu einem Verlust an genetischem Material. Die Bedeutung des SSA in menschlichen Zellen ist noch weitestgehend unklar (Iliakis et al., 2004).

### **1.2.2. Signalwege der Reparatur von DNA-DSB**

Generell handelt es sich bei den Signalwegen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, um dreistufige Systeme.

Zunächst erfolgt die Detektion des DNA-Schadens durch Sensormoleküle. Deren Signal wird dann durch Transduktoren, bei denen es sich in der Regel um Proteinkinasen handelt, an Effektor Moleküle weitergeleitet. Diese bewirken dann die eigentliche Reparatur des Schadens (Jackson, 2002).

Auf der Ebene der Sensoren stehen ATM und ATR (ATM-Rad3-related). Sie gehören zur Familie der PIKK (phosphoinositide 3-kinase related kinases). Zu diesen gehört auch DNA-PK (Abraham, 2001).

ATM ist dabei entscheidend für die Induktion der Reparatur von DSB (Liang, Lin, Brunicardi, Goss, & Li, 2009). ATM wird vom mre11-Komplex, der aus mre11, rad 50 und NBS-1 besteht, zum Ort der DNA-Schädigung rekrutiert (D'Amours & Jackson, 2002).

ATM kann auch ohne direkten Kontakt zu DSB, durch Veränderungen der Chromatin Struktur, wie sie als Folge der DSB auftreten, aktiviert werden (Bakkenist & Kastan, 2003).

ATM liegt im Ruhezustand als Dimer oder Multimer vor. Im Falle einer Aktivierung kommt es zur Autophosphorylierung an Serin 1981 und dadurch zur Dissoziation der Dimere. Das legt die Kinase-Domäne von ATM frei. Substrate können nun binden und phosphoryliert werden (Bakkenist & Kastan, 2003).

Zu diesen Substraten zählen unter anderem Chk1/2, die als Transduktoren Signale zu den Effektoren weiterleiten. Außerdem führt deren Aktivierung auch zu einem Zellzyklusarrest und Chk2 ist an der Induktion der Apoptose nach DSB beteiligt.

Zu den Effektoren gehören die DNA-Reparaturenzyme p53 und cdc25 (Zhou & Bartek, 2004).

Dieses 3-stufige hierarchische Modell wurde in den letzten Jahren in Frage gestellt. So ist z.B. NBS1 an der Aktivierung von ATM im Rahmen des mre11-Komplexes beteiligt. NBS1 wird aber andererseits durch ATM phosphoryliert und ist dann wichtig für die Aktivierung der checkpoint Mechanismen (J. H. J. Petrini & Stracker, 2003).

Die Abbildung 1.2.2.1 zeigt nochmals eine Zusammenfassung über die wichtigsten, an der Reparatur von DSB beteiligten, Signalwege.

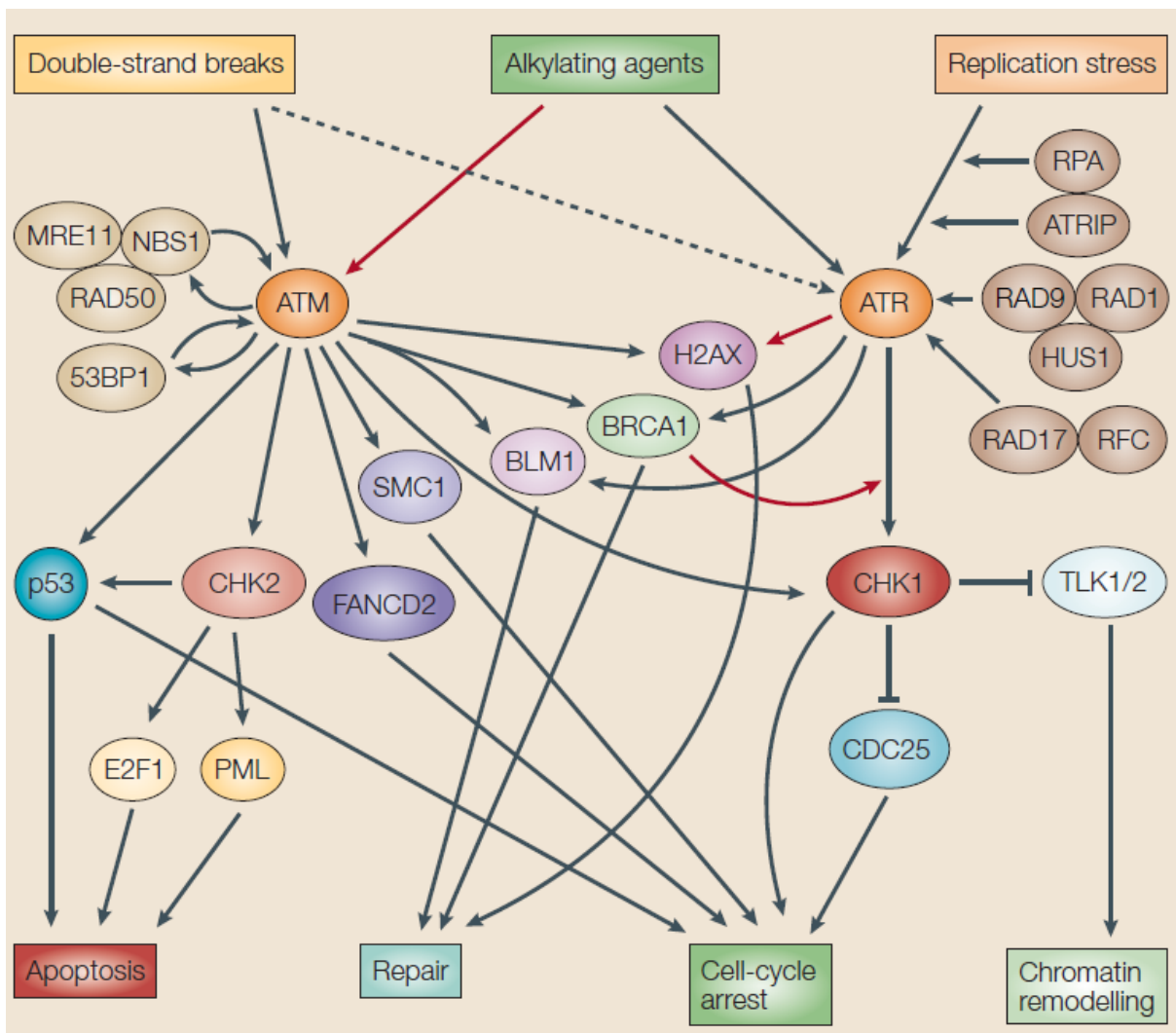


Abbildung 1.2.2.1 (Zhou & Bartek, 2004)

### 1.2.3. Die Poly-(ADP-Ribose)Polymerase (PARP)-1

Die Familie der PARP Enzyme besteht aus 17 Enzymen mit Poly-ADP-Ribosylierungs-Kapazität. Die PARP-1 ist das am besten charakterisierte Mitglied und bindet überwiegend an ESB und DSB mit Hilfe von zwei Zink-Fingern (Lindahl, Satoh, Poirier, & Klungland, 1995) (Abd Elmageed, Naura, Errami, & Zerfaoui, 2012). Die PARP-1 ist ein Enzym, dessen Amino-Ende über eine DNA-bindende Domäne verfügt und dessen Carboxy-terminales-Ende das katalytische Zentrum bildet. Sie produziert Poly-ADP-Ribose unter Verbrauch von NADH<sub>2</sub> (reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid). Um ihre vollständige katalytische Aktivität zu erreichen, muss sie an DNA gebunden sein. Ihr wichtigstes Substrat scheint dabei sie selbst zu sein (Lindahl et al., 1995).

Durch diese autokatalytische Reaktion bekommt die PARP-1 eine zunehmend negative Ladung. Diese führt durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Dissoziation von der DNA (Ferro & Olivera, 1982). Um erneut an die DNA binden zu können, müssen die Poly-(ADP-) Ribose-Ketten zunächst von der Poly-(ADP-Ribose) Glykohydrolase (PARG) entfernt werden (Lindahl et al., 1995).

Die Funktion der PARP-1 ist noch nicht vollständig geklärt. So weisen PARP-1(-/-)-knockout Mäuse einen normalen Phänotyp auf. Sie entwickeln nicht frühzeitig Tumore. Das macht eine essentielle Funktion der PARP-1 unwahrscheinlich. Allerdings entwickeln diese Mäuse frühzeitig epidermale Hyperplasien. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Funktion der PARP -1 für Zellen unter normalen Bedingungen zwar nicht essentiell ist, aber eine wichtige Funktion bei der Reaktion auf Störfaktoren der Umwelt, wie z.B. UV-Strahlung, spielt (Z. Q. Wang et al., 1995). Dafür spricht auch, dass die Hemmung der PARP in vitro zu einer Sensibilisierung gegenüber mutagenen Substanzen, wie ionisierender Strahlung (Ben-Hur, Utsumi, & Elkind, 1984) oder Alkylantien (Boulton et al., 1995), führt.

Die PARP-1 ist an der Reparatur von DNA-Schäden, insbesondere an der Basen-Exzisionsreparatur (BER) von ESB, beteiligt. Eine Hemmung der PARP-1 sensibilisiert Zellen für die Apoptose nach der Induktion von DNA-Schäden (Beneke, Geisen, Zevnik, Bauch, & Ku, 2000). Diese ESB degenerieren während der Replikation zu DSB, wenn die Funktion der PARP gehemmt ist (Bryant et al., 2005).

Neben der Reparatur von ESB scheint PARP-1 auch an der Reparatur von DSB beteiligt zu sein, und zwar über einen, von dem herkömmlichen Mechanismus des NHEJ via DNA-PK und DNA-Ligase-4, unabhängigen Weg. Dabei soll die PARP-1 den XRCC1/DNA-Ligase-3 Komplex zum Ort des DSB rekrutieren (Audebert, Salles, & Calsou, 2004).

Die Inhibition von PARP-1 führt zu einem höheren Maß an genomischer Instabilität. Dies zeigt sich in einer erhöhten Rate an HR zwischen Schwesterchromatiden, die sowohl spontan als auch nach der Behandlung mit mutagenen Substanzen auftreten (Schreiber et al., 1995).

Diese Eigenschaften von PARP-1 machen sie für die Tumorthherapie interessant und könnte insbesondere bei Tumoren mit erworbenen Resistenzen eine Rolle spielen (Curtin et al., 2004) (Delaney et al., 2000).

## 2. Zielsetzung

Wie bereits erwähnt, ist die Prognose von Patienten mit MCL infaust. Zwar sprechen viel Patienten initial auf die Therapie an, aber eine stabile Remission wird selten erreicht (Jares et al., 2007).

Daher ist es wichtig, neue Erkenntnisse der Forschung in die Therapie dieser Tumorentität einfließen zu lassen.

Normale Chemotherapeutika töten vor allem schnell proliferierende Zellen ab. Zu diesen gehören neben den Tumorzellen auch beispielsweise Darmepithelien und Zellen des Knochenmarkes. Dadurch entstehen die typischen Nebenwirkungen einer Chemotherapie wie z.B. die Suppression des Immunsystems (*Harrisons Innere Medizin*, Wehling, 2010).

Ein neuer Therapieansatz der Tumorthherapie ist die sog. „synthetic lethality“. Darunter versteht man eine synergistische Wirkung einer Mutation und eines Medikamentes bezüglich des Zelltodes. Weder die Mutation noch das Medikament besitzen alleine das Potential, Zellen abzutöten (Garber, 2004).

Dies hat den Vorteil, dass Tumore mit charakteristischer Mutation selektiv bekämpft werden können, ohne gesundes Gewebe zu schädigen.

Diese Dissertation folgt der Idee der „synthetic lethality“. Es wurde anhand von Zellkulturmodellen überprüft, ob die Therapie von MCL, die generell ein hohes Maß an genetischer Instabilität besitzen, mit dem PARP-Inhibitor Olaparib (AZD2281) sinnvoll ist. Insbesondere wurde der Zusammenhang von ATM und p53-Mutationen und dem Ansprechen auf AZD2281 in MCL untersucht. Dafür wurden verschiedenen MCL Zelllinien, die sich im Mutationsstatus bezüglich p53 und ATM unterscheiden, in vitro mit AZD2281 behandelt. Mit Hilfe von MTT-Tests wurde die Anzahl vitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten abgeschätzt.

Nachfolgend wurden Proteinisolate von den mit AZD2281 vorbehandelten Zellen isoliert und an der DNA Reparatur beteiligte Signalwege mittels Western Blot-Analysen untersucht. Um eine stärkere Hochregulation der an der DNA Reparatur beteiligten Enzyme zu induzieren, wurde für die Western Blot Analysen zusätzlich eine Vorbehandlung mit Cisplatin durchgeführt.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Sterilkultur 200 Inkubator: Heraeus cytoperm 2 incubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Automatischer Zellzähler: Casy 1	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Photometer für Zellproliferationsassay (MTT-Assay): Digiscan	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Hohenlinden, Deutschland
Photometer für Bradford-Assay: Spektralfotometer DU530	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Protein-Gelelektrophoresekammer: Mini-Protean II cell chamber	BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Spannungsquelle: Power Pac 300	
Blotkammer: Semi-Dry Transfer Cell	
Stromquelle: Modell 3000 XI	
Röntgenfilmentwicklungsautomat: SRX-101A	Konica Minolta Medical & Graphic Imaging GmbH Europe, München, Deutschland
<b>Allgemeine Geräte:</b>	
Magnetrührer: RCT basic	IKA- Werke Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland
pH-Meter: pH 323	Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Wärmebad: Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Mikroskop: Eclipse TS100	Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, Niederlande
Schüttler: Stuart Scientific 3D Rocking Platform STR9	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Zentrifuge: Centrifuge 5417 R 4K15	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Sigma- Aldrich Co., St. Louis, USA

Tabelle 3.1.1. I



### 3.1.2. Chemikalien

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien, soweit nicht in der Tabelle 3.1.2.1 aufgeführt, wurden von den Fa. Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, und E.Merck KG, Darmstadt, bezogen.

Die sterilen Plastikartikel für die Zellkultur stammten von Falcon ®, Corning Inc., Corning, NJ, USA.

Die Röntgenfilme Kodak X-OMAT MA oder X-OMAT-AR, die für die Proteindetektion im Rahmen der Western Blots verwendet wurden, stammten von Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA.

Die Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membranen Immobilion-P stammten von Milipore Corporation, Bedford, MA, USA.

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Proteinassay nach Bradford	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proliferationsassay (MTT-Test)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
ECL Detektionsreagenz für Western Blots	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Cisplatin	Absource Diagnostics GmbH, München, Deutschland
PARP-Inhibitor Olaparib (AZD 2281)	Absource Diagnostics GmbH, München, Deutschland
RPMI und DMEM-Medium für die Zellkultur	GIBCO Corp., Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	
Streptomycin	
Penicillin	
Glutamin	
DMSO freezing medium	

Tabelle 3.1.2. 1

### 3.1.3. Antikörper zur Proteindetektion

Antigen	Antigen Masse in kDa	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
ATM (D2E2)	350	1:1000 in 5%BSA in TTBS	Rabbit IgG	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Phospho-ATM (Ser1981)	350	1:1000 in 5% Magermilchpulver in TTBS	Mouse IgG1	
Phospho-p53 (Ser15)	53	1:1000 in 5%BSA in TTBS	Rabbit	
Phospho-Histone H2A.X (Ser139)	15	1:1000 in 5%BSA in TTBS	Rabbit	
p21 Waf1/Cip1	21	1:1000 in 5%BSA in TTBS	Rabbit IgG	
p95/ NBS1	95	1:1000 in 5%BSA in TTBS	Rabbit	
PARP	116	1:1000 in 5% Magermilchpulver in TTBS	Mouse IgG1	
$\alpha$ -Tubulin	50-60	1:5000- 1:10000 in 5% Magermilchpulver in TTBS	Mouse IgG1	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 3.1.3.1

Sekundärantikörper (konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)):

<b>Antigen</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mouse IgG	1:2000	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Rabbit-IgG	1:2000	

**Tabelle 3.1.3. 1**

### **3.1.4. Puffer und Lösungen**

Folgende Standardpuffer wurden eingesetzt:

- Zelllysepuffer (10- fach konzentriert): 20mM Tris-Cl ph 7,4, 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2,5mM Na-Pyrophosphat, 1mM β-Glycerolphosphat, 1mM Natriumvanadat, 1µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF
- PBS Puffer: 138mM NaCl, 4,3mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Bradford Reagenz: 0,01% Coomasie Brillant Blau G-250, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure, H<sub>2</sub>O ad 1 Liter, 1:4 verdünnt in PBS
- SDS- Ladepuffer (5×konzentriert): 312,5mM Tris-Cl ph 6,8, 10%SDS, 50% Glycerol, 250mM DTT, 0,05% Bromphenol-Blau, H<sub>2</sub>O ad 10ml
- SDS-Laufpuffer (10×konzentriert): 250mM Tris, 1,92M Glycin, 1%SDS, ad H<sub>2</sub>O 500ml
- Anodenpuffer I: 0,3mM Tris, 20% Methanol, ad H<sub>2</sub>O 500ml
- Anodenpuffer II: 25mM Tris, 20% Methanol, ad H<sub>2</sub>O 500ml
- Kathodenpuffer: 25mM Tris, 20% Methanol, 40mM Amino-N-Caprone Säure
- TBS (10×konzentriert): 24,2g Tris, 80g NaCl, ph auf 7,6 mit Essigsäure einstellen, ad H<sub>2</sub>O 1l
- TTBS-Puffer: 100ml TBS, 10ml 0,1%Tween-20, ad H<sub>2</sub>O 1l
- Blocking-Puffer: 0,1% Tween-20, 5%Magermilchpulver in 1 mal TBS

### 3.1.5 Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese

Die Dichte der Trenngele wurde je nach Molekülgröße der nachzuweisenden Proteine zwischen 7,5% und 12,5% variiert. Generell wurden Proteine mit einer Molekülgröße kleiner 70kDa mit 12,5% SDS-Gelen aufgetrennt. Bei einer Größe zwischen 70-150kDa wurden 10% SDS-Gele verwendet und bei noch größeren Proteinen 7,5% Gele.

Die Angaben gelten für 2 Mini- Trenngele:

Dichte	7,5%	10%	12,5%
Acrylamid / Bis	2,54ml	2,66ml	4,2ml
1M Tris-Cl ph8,8	3,74ml	2ml	3,74ml
H <sub>2</sub> O	2,86ml	3,32ml	2ml
20%SDS	50µl	50µl	50µl
10% APS	50µl	50µl	50µl
TEMED	25µl	25µl	25µl

Tabelle 3.1.5. 1

Zusammensetzung des Sammelgels:

Die Angaben gelten für 2 Minigele:

Dichte	5%
Acrylamid/Bis	836µl
1M Tris-Cl ph6,8	626µl
H <sub>2</sub> O	3,5ml
20%SDS	25µl
10%APS	25µl
TEMED	10µl

Tabelle 3.1.5. 2

### 3.1.6. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Translokation</b>	<b>Primäre Referenz</b>	<b>Jahr der Isolierung</b>	<b>Bezug</b>
Granta-519	t(11;14)(q13;32)	(Jadayel, 1997)	1991	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Jeko-1	t(11;14)(q13;32)	(Jeon, 1998)		Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
JVM-2	t(11;14)(q13;32)	(Melo, 1986)	1984	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Mino	t(11;14)(q13;32)			Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
NCEB-1	t(11;14)(q13;32)	(Saltman, 1988)	1987	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Z138	t(11;14)(q13;32)	(Estrov Z., 1998) (Medeiros L.J., 2006)	1990	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

Tabelle 3.1.6. 1

Übersicht über den Mutationsstatus der verwendeten Zelllinien:

<b>Zelllinie</b>	<b>ATM</b>	<b>p53</b>	<b>Quelle</b>
Granta-519	mutiert	mutiert	(Williamson et al., 2012) (de Leeuw et al., 2004)
Jeko-1	Wildtyp	mutiert	(Kawamata et al., 2009) (Jeon, Kim, Yoshino, & Akagi, 1998)
Mino	Wildtyp	mutiert	(Lai et al., 2002) (Salaverria et al., 2008)
NCEB	mutiert	Wildtyp	(Kawamata et al., 2009) (de Leeuw et al., 2004)
Z138	Wildtyp	Wildtyp	(de Leeuw et al., 2004) (Williamson et al., 2010)

**Tabelle 3.1.6.2**

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Zellkultur**

Die Zellen wurden in 250ml Flaschen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage, unter sterilen Bedingungen in der Arbeitsbank, gewechselt. Die Temperatur im Brutschrank betrug 37°C, der CO<sub>2</sub>-Gehalt 5% und die Luftfeuchtigkeit 92%.

Die Zellen erhielten je nach Linie entweder RPMI oder DMEM als Medium. Diesem wurde jeweils 2mM Glutamin, 100µg/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zugefügt.

Um den Einfluss von stimulierenden Wachstumsfaktoren gering zu halten, wurde dem Medium FCS in einer reduzierten Konzentration von 5% beigelegt.

Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und bei einer Dichte von 70-80% gesplittet.

### **3.2.2. Zell-Proliferationsassay**

Zur Durchführung des Proliferationsassay wurden die Zellen zunächst mit Hilfe des Zellcounter Casy 1 von Schärfe System GmbH gezählt. Danach wurde die Zellkultur so verdünnt, dass die Zellzahl 200000/ml betrug. Jeweils 100µl wurden dann in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte eingebracht. Pro Versuchsansatz wurden jeweils 3 Proben entnommen, um später Mittelwerte berechnen zu können.

Je nach Fragestellung wurde den Zelllinien 24h vorher AZD2281 (Olaparib) 1:5000 verdünnt zugefügt. Als Vergleichsgruppe dienten nicht vorbehandelte, native Zellen.

Diese 96-Lochplatten wurden dann 24h, 48h oder 96h im Inkubator bebrütet. Nach diesen Zeitspannen wurde 10µl MTT-Salz hinzugefügt. Den Zellen blieben dann jeweils 4h Zeit, das MTT Salz zu Formazan abzubauen, bevor sie lysiert wurden. Die Formazan Konzentration, die proportional zur Zahl vitaler Zellen ist, wurde photometrisch durch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen.

### **3.2.3. Proteinisolierung**

Vor der Proteinextraktion wurden die Zellen in 250ml Flaschen kultiviert. Den Zellkulturen wurde zuvor Cisplatin 10µg/ml oder AZD2281 1:5000 verdünnt, oder eine Kombination von beiden, hinzugefügt.

Die Proteine wurden dann jeweils nach 1h, 24h und 48h extrahiert. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert und, zur Arretierung von intrazellulären Signalkaskaden, mit eiskaltem PBS gespült. Nach der Lyse mittels 500µl Lysepuffer mit Leupeptin als Proteaseinhibitor, wurden die Proteine mit Hilfe einer Ultrazentrifuge, bei 4°C und 10000rpm für 15min, ausgefällt. Der Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2.4. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Bradford Proteinassay ist eine häufig eingesetzte Methode zur photometrischen Quantifizierung von Proteinen in Lösung. Er beruht auf dem Prinzip, dass Proteine in saurer Lösung über kationische und anionische Gruppen an Coomassie Blau binden und dadurch dessen Extinktionsmaximum von 470nm auf 595nm verschieben. Das Ausmaß der Absorption bei 595nm ist abhängig von der Proteinkonzentration in der Lösung.

Allerdings ist das Ausmaß der Komplexbildung nicht nur abhängig vom Proteingehalt, sondern auch von der Anzahl an sauren bzw. basischen Aminosäuren.

Deshalb empfiehlt sich die Verwendung von Kälberserumalbumin (BSA) als Kalibrierungsstandard (Bradford, 1976) (Compton & Jones, 1985).

Zur Durchführung des Bradford-Assay wurden die Proteinisolate zunächst 1:10 in PBS verdünnt. Dann wurde das 1:4 verdünnte Bradford Reagenz hinzugegeben und die Probe geschüttelt. Anschließend wurde die Extinktion bei 595nm photometrisch bestimmt. Genauso wurde auch eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin analysiert, wodurch dann die Kalibrationskurve erstellt werden konnte. Anhand dieser kann man die Proteinkonzentration in den Proteinproben berechnen.

### **3.2.5. SDS-Gelelektrophorese**

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden jeweils 10µg des Proteingemisches mit 5-fach konzentriertem Ladepuffer vermischt und 5 Minuten bei 98°C denaturiert. Nach kurzem zentrifugieren wurde der gesamte Ansatz auf die SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120V in einem SDS-Laufpuffer. Die Laufzeit war abhängig von der Größe der Proteine. Je größer das nachzuweisende Protein war, desto länger war die Laufzeit.

### **3.2.6. Western-Blot**

Nach der Auftrennung der Proteine wurden die Gele in einem halbtrockenen System (semi-dry Western Blot) mit Hilfe von drei Puffern (Anodenpuffer I, II und Kathodenpuffer) bei 150mA auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran geblottet. Die Dauer des Blots variierte je nach Proteingröße zwischen 1-2 Stunden. Danach wurden die PVDF Membrane mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Antikörper in 5% BSA bzw. 5% Magermilchpulver in TTBS verdünnt.



### 3.2.7. Immundetektion

Die PVDF Membran wurde zunächst dreimal 5 Minuten in TTBS gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde mit 5% Magermilchpulver in TTBS 1:2000 verdünnt. Die Immunreaktion wurde durch eine Chemilumineszenz Reaktion mit dem ECL-Puffer von Millipore sichtbar gemacht. Diese Reaktion beruht auf der Umwandlung des Substrates Luminol durch die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase. Dabei entsteht ein lumineszierender Farbstoff. Durch Exposition von Röntgenfilmen für ca. 1 Minute, und nachfolgender Entwicklung dieser, kann diese Reaktion sichtbar gemacht werden.

Die Auswertung der Western Blot Analysen erfolgte visuell semiquantitativ. Dabei wurde folgende Einteilung vorgenommen:

- : negativ
- (+) : fraglich positiv
- +: schwach positiv
- ++: positiv
- +++ : stark positiv

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zell-Proliferationsassay

Bei allen Zelllinien zeigte sich eine Hemmung des Wachstums nach Zugabe des PARP-Inhibitors AZD2281 (Olaparib). Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Zelllinie Granta-519 zu beobachten. Am schwächsten bei der Zelllinie Mino.

Dieser Effekt war bei allen Zelllinien erst nach 48 stündiger Inkubation mit AZD2281 zu beobachten. Das Maximum der Wachstumshemmung war nach durchschnittlich 72h erreicht.

#### 4.1.1. Zell-Proliferationsassay mit Granta-519

Bei Granta-519 zeigte sich eine deutliche Hemmung des Wachstums nach 48h. Der Effekt von AZD 2281 war nach 72h maximal.

	Extinktion nach 24h	Extinktion nach 48h	Extinktion nach 72h	Extinktion nach 96h
Granta	0,1	0,165	0,194	0,24
Granta mit AZD2281	0,12	0,18	0,156	0,156

Tabelle 4.1.1.1

Graphische Darstellung der Extinktion mit (rot) und ohne (blau) AZD2281 nach 24h, 48h, 72h, 96h:

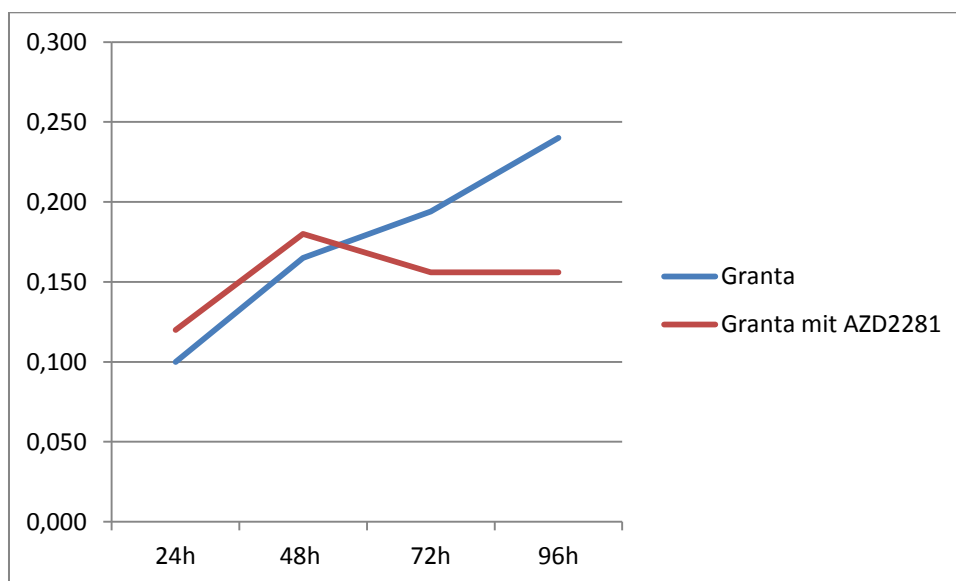


Abbildung 4.1.1.1

#### 4.1.2. Zell-Proliferationsassay mit JeKo-1

Auch bei JeKo-1 war der antiproliferative Effekt von AZD2281 erst nach 48h Inkubationszeit zu messen. Maximal war dieser nach 72h.

	Extinktion nach 24h	Extinktion nach 48h	Extinktion nach 72h	Extinktion nach 96h
JeKo-1	0,11	0,19	0,24	0,35
JeKo-1 mit AZD2281	0,11	0,19	0,241	0,29

Tabelle 4.1.2.1

Graphische Darstellung der Extinktion mit (rot) und ohne (schwarz) AZD2281 nach 24h, 48h, 72h, 96h:

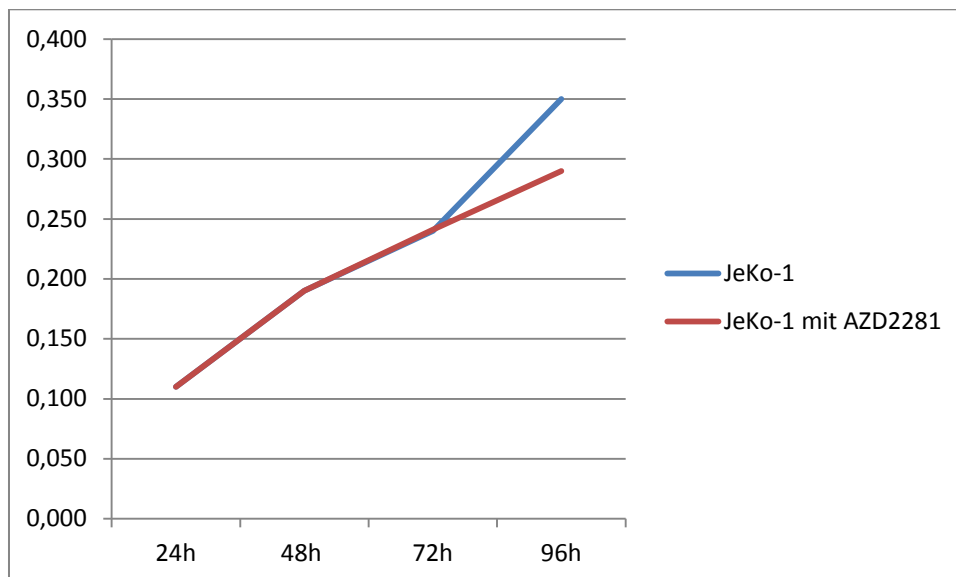


Abbildung 4.1.2.1

### 4.1.3. Zell-Proliferationsassay mit Mino

Bei der Zelllinie Mino war kein hemmender Effekt von AZD2281 nachweisbar. Auch nach Inkubation der Zellen mit AZD2281 über 72h zeigten diese weiterhin ein exponentielles Wachstum.

	Extinktion nach 24h	Extinktion nach 48h	Extinktion nach 72h	Extinktion nach 96h
Mino	0,092	0,19	0,235	0,33
Mino mit AZD2281	0,09	0,185	0,21	0,3

Tabelle 4.1.3.1

Graphische Darstellung der Extinktion mit (rot) und ohne (blau) AZD2281 nach 24h, 48h, 72h, 96h:

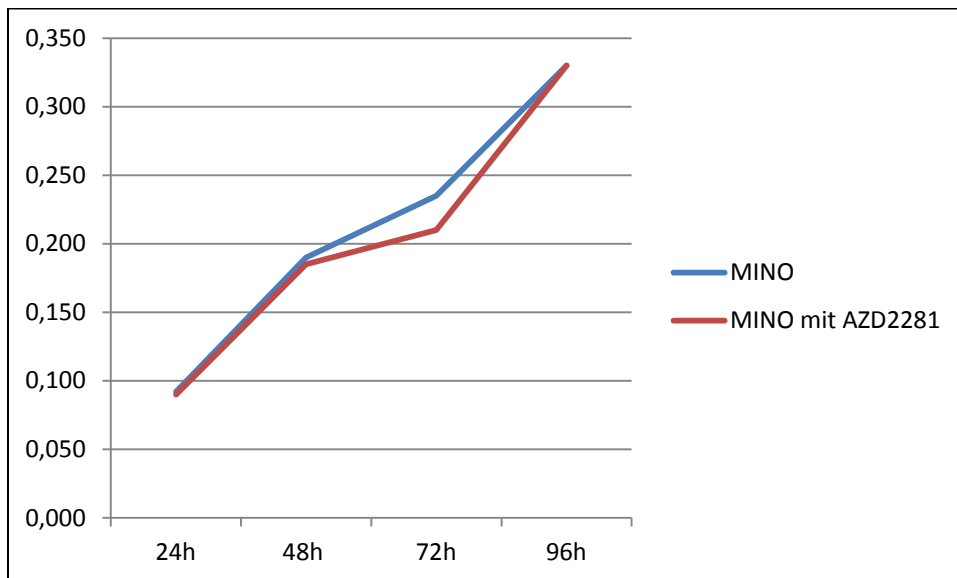


Abbildung 4.1.3.1

#### 4.1.4. Zell-Proliferationsassay mit NCEB-1

Die Zelllinie NCEB-1 zeigte, wie auch die anderen, eine deutliche Extinktionsabnahme erst nach einer Inkubationszeit mit AZD2281 von 72h.

	Extinktion nach 24h	Extinktion nach 48h	Extinktion nach 72h	Extinktion nach 96h
NCEB-1	0,298	0,453	0,52	0,55
NCEB-1 mit AZD2281	0,31	0,452	0,49	0,4

Tabelle 4.1.4.1

Graphische Darstellung der Extinktion mit (rot) und ohne (blau) AZD2281 nach 24h, 48h, 72h und 96h:

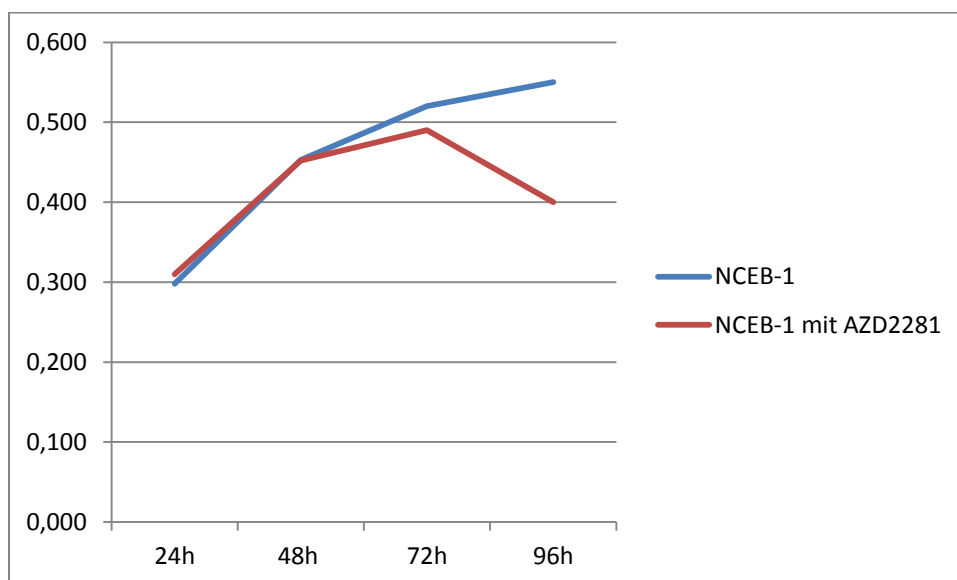


Abbildung 4.1.4.1

#### 4.1.5. Zell-Proliferationsassay mit Z138

Die Zelllinie Z138 zeigte ein sehr geringes Ansprechen auf den Inhibitor AZD2281. Auch nach 72 stündiger Inkubation mit AZD2281 war noch ein exponentielles Wachstum zu messen.

	Extinktion nach 24h	Extinktion nach 48h	Extinktion nach 72h	Extinktion nach 96h
Z138	0,1	0,191	0,25	0,365
Z138 mit AZD2281	0,1	0,18	0,23	0,28

Tabelle 4.1.5.1

Graphische Darstellung der Extinktion mit (rot) und ohne (blau) AZD2281 nach 24h, 48h, 72h, 96h:

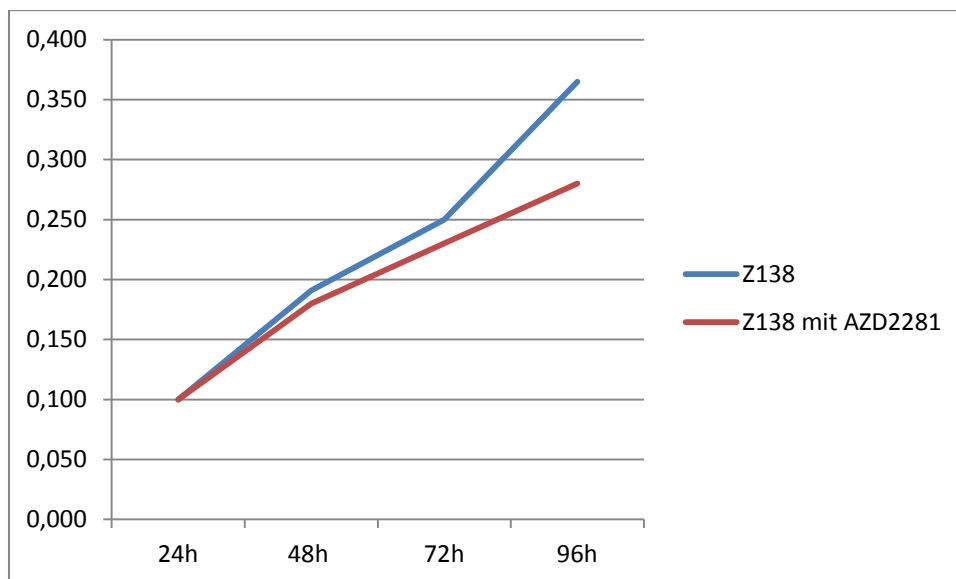


Abbildung 4.1.5.1

## 4.2. Western Blot Analysen

AZD2281 zeigte bei allen Zelllinien erst nach circa 48h einen inhibitorischen Effekt. Daher wurden die Zellen vor der Proteinisolation bis zu 48h mit AZD2281 inkubiert. Ebenfalls wurden Proteinisolate nach Inkubation mit AZD2281 für 1h und 24h untersucht, da hier noch keine signifikante Hemmung des Wachstums stattfindet. Diese wurden jeweils mit Proteinisolaten einer Kontrolle ohne Vorbehandlung verglichen.

Zusätzlich wurden Western Blot Analysen an Proteinisolaten nach Vorbehandlung der Zelllinien mit Cisplatin und einer Kombination aus Cisplatin und AZD2281 untersucht. Die PARP-1 ist an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Diese wurden mit Hilfe von Cisplatin induziert (Beneke et al., 2000). Cisplatin induziert unter anderem Einzelstrangbrüche der DNA (*Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*, Efferth, 2006). Diese degenerieren unter dem Einfluss von PARP Inhibitoren im Rahmen der Mitose zu DSB (Bryant et al., 2005). Proteinisolate wurden nach Inkubation der Zellen mit einer Kombination aus Cisplatin und AZD2281 nach 1h, 24h und 48h entnommen.

Da die Untersuchung der Proteinisolate nähere Hinweise auf die Ursache des unterschiedlichen Ansprechens der verschiedenen Zelllinien geben sollte, wurden jeweils zwei Zelllinien mit besonders hoher Sensibilität auf AZD2281 (Granta und NCEB-1) und zwei mit geringem Ansprechen (Mino, Z138) untersucht.

#### 4.2.1. Western Blots nach isolierter Behandlung mit AZD2281

Die alleinige Vorbehandlung mit AZD2281 führte zu einer Hochregulation der an der Reparatur von DNA DSB beteiligten Enzyme. Dies war bei der AZD2281 sensiblen Zelllinie Granta deutlicher ausgeprägt als bei Mino.

Exemplarisch werden hier nur die Western Blots von Granta- 519 und Mino dargestellt.

Mino:

Ctrl	AZD1h	AZD24h	AZD48h	
				ATM
				Phospho- ATM (Ser1981)
				NBS1
				PARP
				Phospho-p53 (Ser15)
				p21
				Phospho- Histone H2A.X (Ser139)

Abbildung 4.2.1.1

Granta-519:

Ctrl	AZD1h	AZD24h	AZD48h	
				ATM
				Phospho- ATM (Ser1981)
				NBS1
				PARP
				Phospho-p53 (Ser15)
				p21
				Phospho- Histone H2A.X (Ser139)

Abbildung 4.2.1.2



semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen:

MINO

Ctrl	AZD1h	AZD24h	AZD48h	
+	+	++	++	ATM
++	++	+++	+++	Phospho-ATM (Ser1981)
-	+	+	(+)	NBS1
++	++	++	+++	PARP
++	++	++	++	Phospho- p53 (Ser15)
+	+	++	++	p21
++	++	++	+++	Phospho- Histone H2A.X (Ser139)

Abbildung 4.2.1.3

Granta- 519:

Ctrl	AZD1h	AZD24h	AZD48h	
(+)	(+)	+	+	ATM
+	+	+	++	Phospho-ATM (Ser1981)
+	+	+	++	NBS1
++	++	+++	+++	PARP
(+)	+	(+)	(+)	Phospho- p53 (Ser15)
++	++	++	++	p21
+	++	++	+++	Phospho- Histone H2A.X (Ser139)

Abbildung 4.2.1.4

#### 4.2.2 ATM Kinase- Sensor von DNA Schäden

ATM konnte in allen Proteinisolaten nachgewiesen werden, auch in den Kontrollansätzen ohne Zugabe von zytostatischen Substanzen. Allerdings kam es zu einer Zunahme der Expression von ATM mit der Dauer der Inkubation mit Cisplatin und AZD 2281..

Eine Aktivierung von ATM führt zur Autophosphorylierung an Serin 1981 (Bakkenist & Kastan, 2003).

Deshalb wurde auch selektiv diese phosphorylierte Variante nachgewiesen, wobei unter Zugabe von Cisplatin und AZD2281 im Vergleich zur Gabe von Cisplatin alleine, eine stärkere Phosphorylierung von ATM in den Zellen erfolgte.

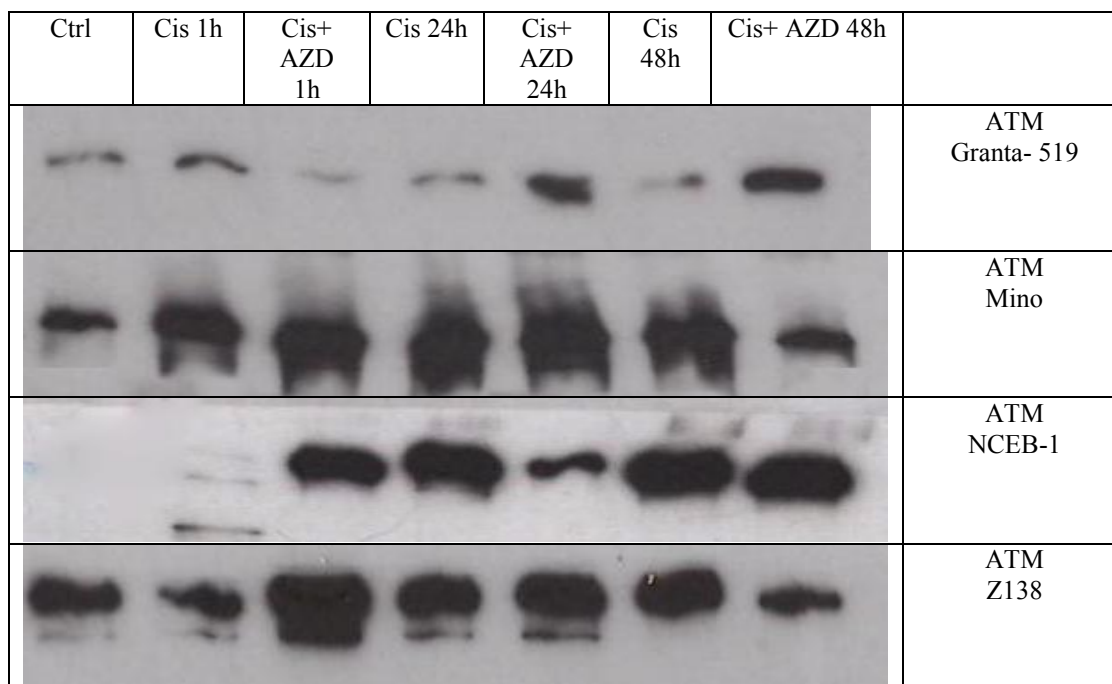


Abbildung 4.2.2.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an ATM:

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
+	+	(+)	+	++	(+)	++	ATM Granta- 519
++	+++	+++	+++	+++	+++	++	ATM Mino
-	-	+++	+++	++	+++	+++	ATM NCEB-1
+++	++	+++	+++	+++	+++	++	ATM Z138

Abbildung 4.2. 2.2

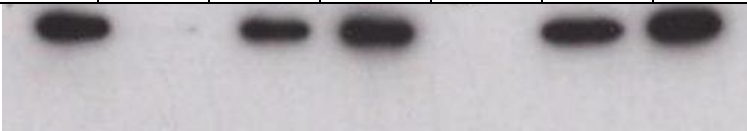



Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
							Phospho-ATM (Ser1981) Granta- 519
							Phospho-ATM (Ser1981) Mino
							Phospho-ATM (Ser1981) NCEB-1
							Phospho-ATM (Ser1981) Z138

Abbildung 4.2.2.3

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an Phospho-ATM (Ser1981):

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
++	-	++	++	-	++	++	Phospho-ATM (Ser1981) Granta- 519
+	++	++	++	+++	++	++	Phospho-ATM (Ser1981) Mino
+++	++	(+)	+++	++	(+)	++	Phospho-ATM (Ser1981) NCEB-1
++	++	+	++	+++	+++	+++	Phospho-ATM (Ser1981) Z138

Abbildung 4.2.2.4

### 4.2.3 NBS1/p95- DNA-Reparaturenzym und Regulator des Zellzyklus

NBS1 formt zusammen mit rad50 und mre11 einen Komplex, der an der Reparatur von DNA DSB beteiligt ist (Carney et al., 1998).

NBS1 konnte in der Zelllinie Z138 wiederholt nicht nachgewiesen werden. Dies war auch bereits in den Etablierungsversuchen der Fall. Soweit es uns bekannt ist, wurde bisher noch nicht beschrieben, dass die Zelllinien Z138 NBS1 nicht exprimiert.

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
							NBS1 Granta-519
							NBS1 Mino
							NBS1 NCEB-1
							NBS1 Z138

Abbildung 4.2. 3.1

Etablierungsversuch:

Z138I	Mino	REC1	NCEB-1	Granta

Abbildung 4.2. 3.2

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an NBS1:

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
-	+	+	+	+	++	+++	NBS1 Granta- 519
(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	NBS1 Mino
(+)	-	-	-	-	+	+	NBS1 NCEB-1
-	-	-	-	-	-	-	NBS1 Z138

Abbildung 4.2. 3.3

#### 4.2.4 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)

In den Western Blot Analysen konnte eine starke konstitutive Expression nachgewiesen werden. Daher wurde eine Belichtungszeit von wenigen Sekunden gewählt. Sonst ergab sich bei der Belichtung ein schwarzer Röntgenfilm.

Die Zelllinie Mino zeigte eine Abnahme der Expression der PARP mit zunehmender Behandlungsdauer.

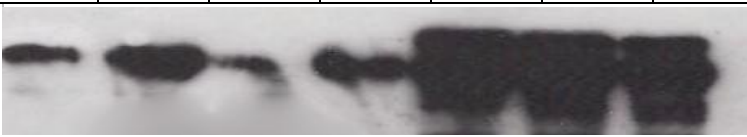


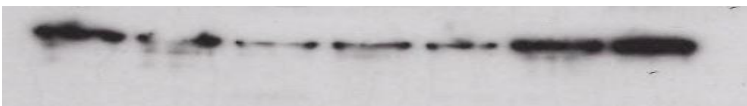
Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
							PARP Granta-519
							PARP Mino
							PARP NCEB-1
							PARP Z138

Abbildung 4.2. 4.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an PARP:

	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
+	++	+	++	+++	+++	+++	PARP Granta- 519
++	++	+	+	(+)	+	(+)	PARP Mino
++	++	++	+++	++	+++	+++	PARP NCEB-1
+	+	+	+	+	++	++	PARP Z138

Abbildung 4.2.4.2

#### 4.2.5 p53- “Wächter des Genoms”

P53 wird bei DNA-Schädigung an Serin15 phosphoryliert. Dies führt dann via p21 zum Zellzyklusarrest (Pestell et al., 1999) (Shieh, Ikeda, Taya, & Prives, 1997).

Bei allen Zelllinien kam es zu einer deutlichen Zunahme der Expression von Phospho-p53(Ser15) mit zunehmender Behandlungsdauer.

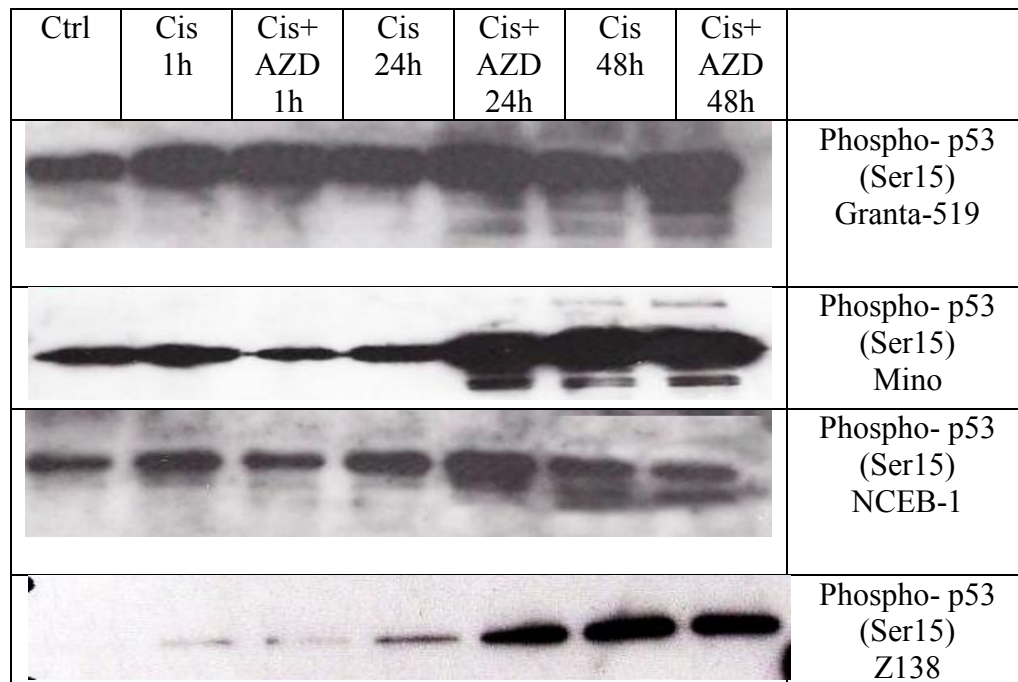


Abbildung 4.2.5.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an Phospho-p53(Ser15):

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Phospho- p53 (Ser15) Granta- 519
++	++	++	++	+++	+++	+++	Phospho- p53 (Ser15) Mino
++	++	++	++	+++	++	++	Phospho- p53 (Ser15) NCEB-1
-	(+)	(+)	+	++	++	++	Phospho- p53 (Ser15) Z138

Abbildung 4.2.5.2



#### 4.2.6 p21 Waf1/Cip1- Tumorsuppressorgen

p21 ist ein Tumorsuppressorgen, das die Progression des Zellzyklus in der G1/S-Phase blockiert. Bei DNA- Schäden wird p53 durch Cyclin abhängige Kinasen phosphoryliert, was zu einer gesteigerten Expression von p21 und zum Zellzyklusarrest führt (Pestell et al., 1999). Insbesondere bei der AZD2281 resistenten Zelllinien Z138 konnte eine deutliche p21 Expression erst nach 48 stündiger Vorbehandlung mit Cisplatin und AZD2281 gezeigt werden.

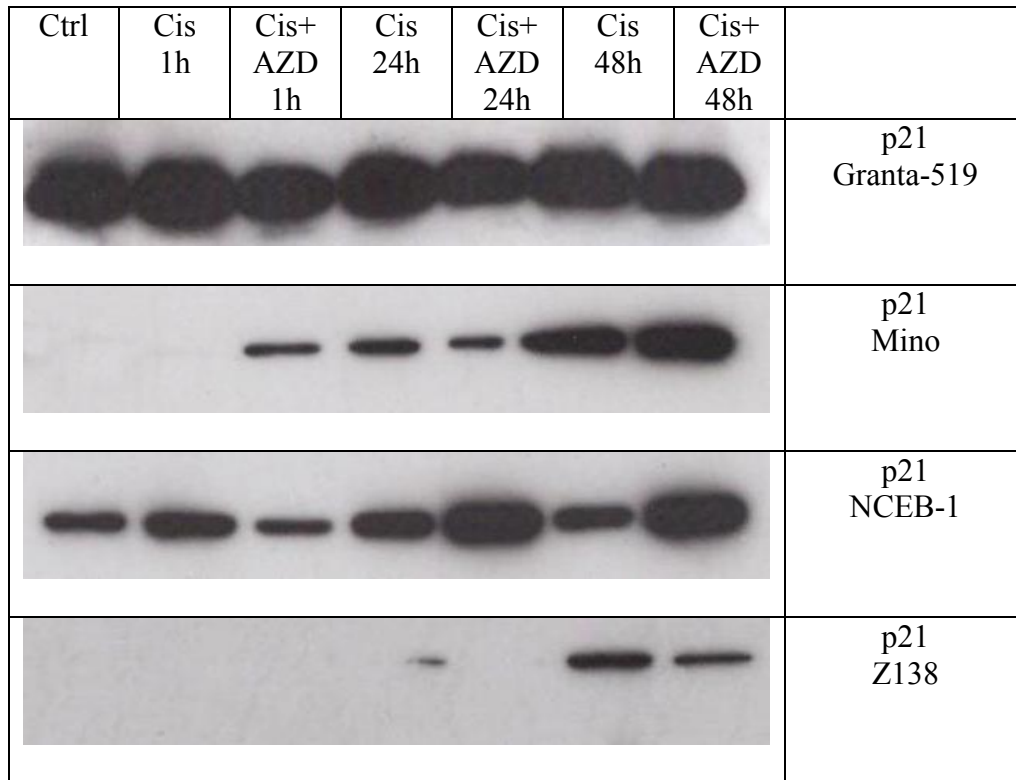


Abbildung 4.2.6.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an p21:

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	p21 Granta- 519
-	-	+	+	+	++	++	p21 Mino
++	++	+	++	+++	++	+++	p21 NCEB-1
-	-	-	(+)	-	+	+	p21 Z138

Abbildung 4.2.6.2

#### 4.2.7 Histone H2A.X – Baustein der Chromatin Struktur

Histone H2A.X wird als Antwort auf DNA DSB an Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Dies wird vor allem durch die ATM katalysiert (Burma et al., 2001).

In dem unten gezeigten Versuchsansatz, in welchem spezifisch Phospho-Histone H2A.X (Ser139) nachgewiesen wurde, fand sich mit zunehmender Inkubation der Zellen mit Cisplatin und AZD2281 ein Anstieg von Phospho-H2A.X.

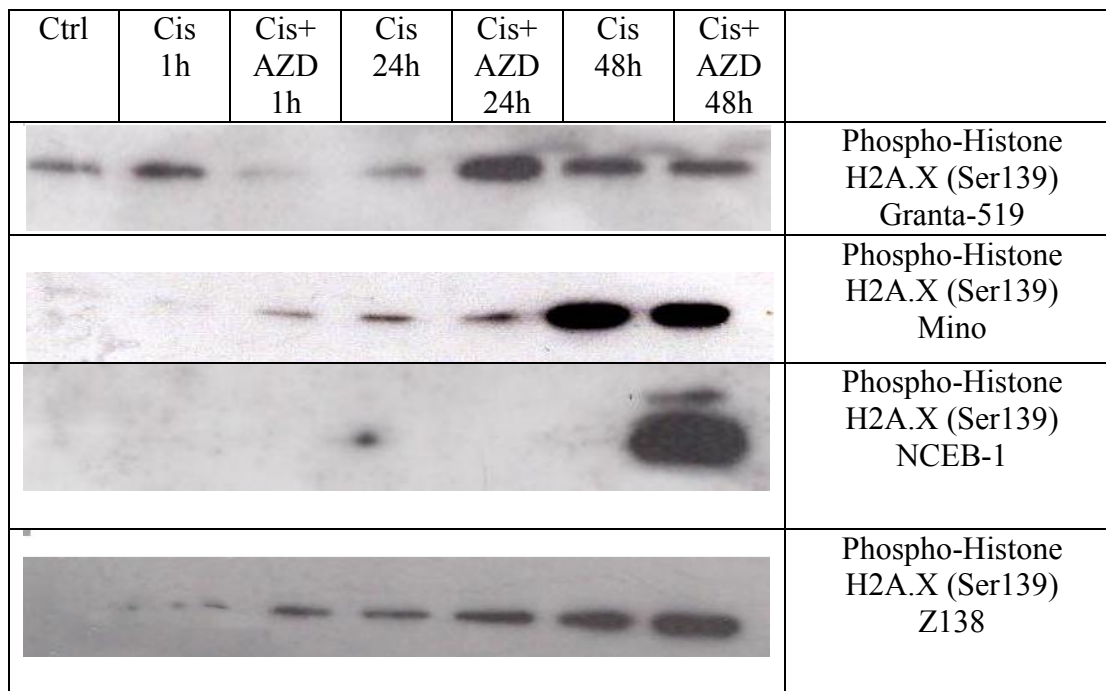


Abbildung 4.2.7.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an Phospho-Histone H2A.X:

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
+	+	(+)	+	++	++	++	Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Granta- 519
-	-	(+)	+	+	++	++	Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Mino
-	-	-	-	-	-	+++	Phospho-Histone H2A.X (Ser139) NCEB-1
-	(+)	+	+	++	++	+++	Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Z138

Abbildung 4.2.7.2

#### 4.2.8 $\alpha$ - Tubulin

$\alpha$ - Tubulin wurde als Ladungskontrolle der Western Blots Analysen verwendet und ist ein sogenanntes „house keeping gene“.  $\alpha$ - Tubulin ist als Ladungskontrolle bei Western Blot Analysen an MCL Zellen gut geeignet (X. Wang et al., 2010).

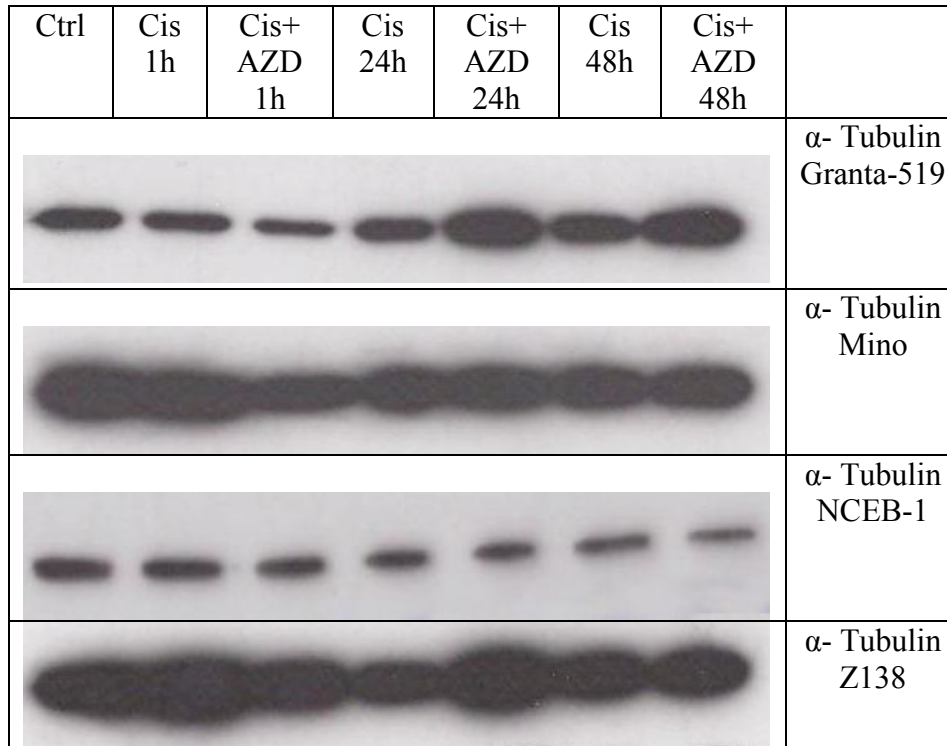


Abbildung 4.2.8.1

semiquantitative Auswertung der Western Blot Analysen an  $\alpha$ - Tubulin:

Ctrl	Cis 1h	Cis+ AZD 1h	Cis 24h	Cis+ AZD 24h	Cis 48h	Cis+ AZD 48h	
++	++	++	++	+++	+++	+++	$\alpha$ - Tubulin Granta- 519
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	$\alpha$ - Tubulin Mino
+++	++	++	++	++	++	++	$\alpha$ - Tubulin NCEB-1
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	$\alpha$ - Tubulin Z138

Abbildung 4.2.8.2

## 5. Diskussion

Da sich MCL durch eine besonders schlechte Prognose und ein ebensolches Therapieansprechen auszeichnen, wurden ihr Ansprechen auf PARP Inhibitoren, als gezielte Therapie im Kontext der „synthetic lethality“, erforscht.

Die PARP ist essentiell in Zellen, die Defekte in der homologen Rekombination aufweisen, also z.B. in Zellen mit Mutationen von BRCA1 bzw. BRCA2. Daher wurde der Einsatz von PARP Inhibitoren zuerst bei Mamma-, und Ovarialkarzinomen untersucht, da diese ein bekanntes Beispiel für Tumore mit BRCA1/ 2 Mutationen sind. BRCA1(-/-)- Zellen und BRCA2(-/-)- Zellen sind sensibel gegenüber PARP Inhibitoren (Bryant et al., 2005) (Farmer et al., 2005).

Der orale PARP Inhibitor AZD2281 zeigte bei Patientinnen mit Mamma-, bzw. Ovarialkarzinomen und positivem Mutationsstatus von BRCA1 oder -2 vielversprechende Ergebnisse in klinischen Phase -I und -II Studien. Dabei traten überwiegend leichte bis mäßige Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit und Anämien auf (Audeh et al., 2010).

Weitere Untersuchungen zeigten einen synergistischen Effekt der Kombination von AZD2281 und Cisplatin bezüglich der Wachstumshemmung von BRCA2- negativen Mamma Karzinom Zellen (Evers et al., 2008). PARP-1 bindet an Platin induzierten DNA Schäden (Zhu, Chang, & Lippard, 2010). Cisplatin ist auch in der Therapie des rezidivierenden, aggressiven Mantelzelllymphoms wirksam (Seymour, Grigg, Szer, & Fox, 2002).

Dieses Kombinationsschemata erhöht die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen, insbesondere von Thrombozytopenien und Neutropenien bzw. einer allgemeinen Myelosuppression (Rajan et al., 2012).

Daraufhin wurde intensiv daran geforscht, ob dieses Modell der „synthetic lethality“ mit PARP Inhibitoren auch auf andere Mutationen von DNA- Reparaturenzyme ausgeweitet werden kann. ATM negativen Zellen wurden als besonders sensitiv auf PARP-Inhibitoren identifiziert (Bryant & Helleday, 2006) (Turner et al., 2008). Die Sensitivität gegenüber AZD2281 von MCL-Zellen mit ATM-Mutationen ist in vivo und in vitro höher als von solchen ohne diese Mutation (Weston et al., 2010). Allerdings ist die Sensitivität von ATM-negativen Zellen gegenüber PARP-Inhibitoren geringer als von BRCA -1 und -2 negativen Zellen. ATM ist ein Sensormolekül von DNA-Schäden. ATM ist allerdings nicht direkt an der Reparatur von DNA-Schäden wie BRCA-1/ -2 beteiligt (Weston et al., 2010).

Eine zusätzliche Mutation von p53 erhöht das Ansprechen von Zellen mit ATM Mutationen auf PARP Inhibitoren und genotoxischen Substanzen deutlich im Vergleich zu einer isolierten ATM Mutation (Williamson et al., 2012).

NHEJ ist für die Toxizität von PARP-Inhibitoren notwendig. Es handelt sich hierbei um einen fehleranfälligen Weg der DNA- Reparatur, der in der Gegenwart von PARP-Inhibitoren und bei Defekten in der homologen Rekombination, z.B. durch eine ATM Mutation, verstärkt abläuft. Dadurch kommt es zur Akkumulation von genetischen Schäden und zur Instabilität des Genoms. Dies führt dann zur Apoptose. Die Kombination von PARP-Inhibitoren mit Hemmstoffen der DNA-PKc, dem Hauptmediator des NHEJ, führt zum Verlust der Toxizität der PARP-Inhibitoren. Diese Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zur ursprünglichen Annahme, dass bei Zellen mit Defekten in der HR, unter der Therapie mit PARP Inhibitoren,

das NHEJ der rettende Mechanismus der DNA DSB- Reparatur ist (Patel, Sarkaria, & Kaufmann, 2011).

## **5.1. Zellproliferationsassay**

### **5.1.1. Zellproliferationsassay an Zelllinien mit mutiertem ATM Status**

Für die Zellproliferationsassays wurden Zelllinien verwendet, die sich im Mutationsstatus von ATM und p53 unterscheiden, um den Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Sensibilität gegenüber AZD2281 zu untersuchen.

(siehe Tabelle 3.1.6.2)

Eine besonders ausgeprägte Hemmung des Wachstums nach der AZD2281 Behandlung zeigten die Zelllinien NCEB und Granta. Diese Zelllinien besitzen beide ATM Mutationen, Granta zusätzlich eine Mutation im p53-Gen (de Leeuw et al., 2004) (Kawamata et al., 2009) (Williamson et al., 2012).

Ein deutlich inhibitorischer Effekt von AZD2281 war erst nach 48 Stunden zu sehen. Bei Granta trat dieser früher und ausgeprägter auf als bei NCEB.

PARP-1 ist an der Reparatur von DNA ESB beteiligt. Durch Hemmung der PARP-1 degenerieren diese im Rahmen der Zellteilung zu DNA DSB, an deren Reparatur wiederum ATM beteiligt ist (Beneke et al., 2000) (Bryant & Helleday, 2006).

Zelllinien mit ATM Mutationen ist es nicht möglich, die DSB zu reparieren und es kommt zur Apoptose. Die Zellzyklusdauer von Mantelzelllymphomen beträgt ca. 32 Stunden (*The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook*, Drexler, 2000), daher tritt der Effekt von AZD2281 verzögert ein. Die Zellen müssen erst einen Zellzyklus durchlaufen, damit die durch AZD2281 entstehenden ESB zu DSB degenerieren.

Die höhere Sensitivität von Granta gegenüber PARP Inhibitoren im Vergleich zu NCEB, lässt sich durch die zusätzliche Mutation von p53 in der Zelllinie Granta erklären. Nach Williamson C.T. et al., 2012, sind Zellen, die sowohl eine ATM als auch eine p53 Mutation aufweisen, sensibler gegenüber PARP Inhibitoren, als bei einer isolierte ATM Mutation. Zelllinien, die Mutationen in beiden Allelen des p53 Gens besitzen, sind sensibler für AZD2281 als die Zelllinie Granta, da diese noch ein funktionsfähiges Allel des p53 Gens aufweist. Man vermutet in diesem Zusammenhang einen sogenannten „gen-dose-effect“ (Williamson et al., 2012). Die Zelllinie Granta weist ein früheres Ansprechen auf AZD2281 auf. Dies lässt sich einerseits durch die kürzere Generationszeit von Granta (49h) im Vergleich mit NCEB (72-96h) erklären (*The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook*, Drexler, 2000), andererseits auch durch die p53 Mutation. P53 kann im Rahmen einer DNA-Schädigung zu einer Hemmung der Progression des Zellzyklus führen und damit eine mitotische Teilung verhindern (Gu & Zhu, 2012).

### 5.1.2. Zellproliferationsassay an Zelllinien ohne ATM Mutation

Die Zelllinien JeKo-1, Mino und Z138 weisen 2 Wildtyp Allele des ATM Gens auf.

Sie unterscheiden sich im Mutationsstatus von TP53.

JeKo-1 und Mino haben mindestens ein mutiertes Allel von TP53 (Kawamata et al., 2009) (Jeon et al., 1998) (Lai et al., 2002) (Salaverria et al., 2008). Z138 besitzt zwei Wildtyp Allele (Williamson et al., 2010) (de Leeuw et al., 2004).

Der Mutationsstatus von TP53 hat bei intaktem ATM Gen keinen Einfluss auf die Sensibilität gegenüber AZD2281. Mino spricht weniger auf AZD2281 an als Z138, obwohl Mino eine p53 Mutation hat. Auch zeigte JeKo-1 ein besseres Ansprechen auf AZD2281 als Z138 trotz der p53 Mutation.

Eine isolierte Mutation von p53 bewirkt keine Sensibilisierung gegenüber PARP Inhibitoren. Allerdings sind diese Zelllinien sehr sensibel gegenüber einer kombinierten Hemmung von PARP und ATM mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren (Williamson et al., 2012). In Zellen mit intaktem ATM und p53 Mutation führt eine Hemmung der PARP zunächst zu der Entstehung von ESB, die dann im Verlauf der Mitose zu DSB degenerieren (Beneke et al., 2000) (Bryant et al., 2005).

Diese DSB führen durch Autophosphorylierung zu einer Aktivierung und Stabilisierung von ATM. ATM wiederum aktiviert und phosphoryliert p53 an Serin 15 (Stracker et al., 2013).

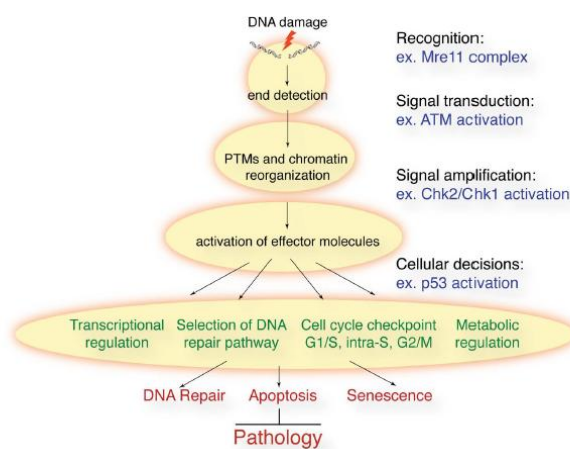


Abbildung 5.1.2.1 (Stracker et al., 2013)

P53 steht hierarchisch gesehen unter ATM und es werden auch andere DNA Reparaturenzyme und Signalkaskaden durch ATM aktiviert, die zum Teil redundante Wirkungen haben.

Die Interaktion zwischen ATM und p53 ist insbesondere für den G1/S-Phase Checkpoint wichtig. Diese Interaktion führt zu einer Expression von p21 und proapoptotischen Faktoren und damit zu einer Hemmung der Progression des Zellzyklus (Massagué, 2004) (Xu, Yang, Brugarolas, Jacks, & Baltimore, 1998).

Erfolgt dies aufgrund einer Mutation von p53 nicht, und kommt es zu einer Progression des Zellzyklus, gibt es nachgeschaltete Checkpunkte, die einen Arrest des Zellzyklus und die Reparatur der DNA Schäden bewirken, aber p53 unabhängig sind.

In der S- und G2-Phase werden dann DNA DSB insbesondere über den Weg der HR, der weniger Fehler anfällig ist, repariert (Foster, De, Johnson, Petrini, & Stracker, 2012).

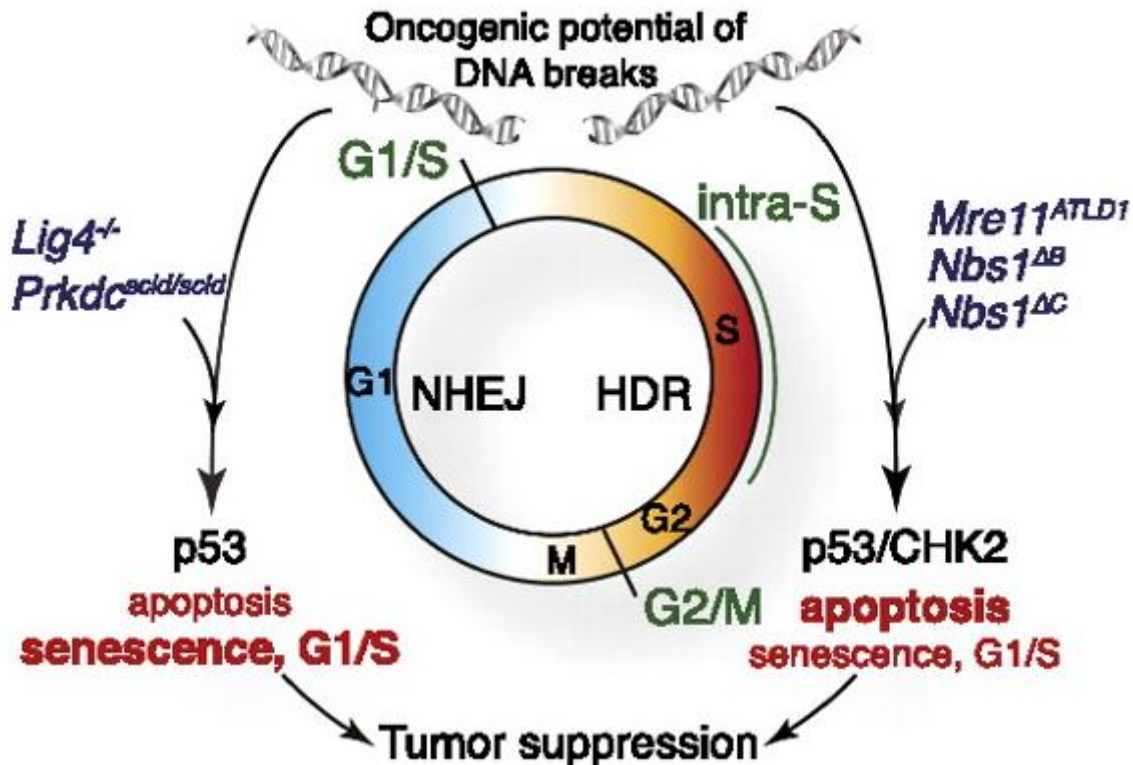


Abbildung 5.1.2.2 (Foster et al., 2012)

In Zellen mit Wildtyp ATM und mutierten p53 werden die durch Behandlung mit AZD2281 entstehenden DSB erst in der G2- und S-Phase repariert. Dort erfolgt überwiegend die HR, die sehr exakt und wenig Fehler anfällig ist. Dies könnte das geringere Ansprechen dieser Zellen auf AZD2281 erklären.

In Zellen mit mutiertem ATM kann die Reparatur von DNA DSB vermindert erfolgen, da ATM an der Spitze der Reparaturmechanismen steht (Foster et al., 2012) (J. H. J. Petrini & Stracker, 2003) (Williamson et al., 2012). Der alternative Mechanismus des NHEJ ist fehleranfällig und führt zu einer Akkumulation genetischer Mutationen. Ab einer gewissen Anhäufung von Mutationen hat dies den Zelltod zur Folge. Deshalb wird eine in ATM (-/-) - Zellen unter dem Einfluss von AZD2281 ablaufendes, dereguliertes NHEJ als ursächlich für die PARP Inhibitor vermittelte Toxizität angesehen (Patel et al., 2011). Dieser Effekt kann durch p53 gemildert werden, da p53 zur Seneszenz oder Apoptose führt, wenn sich im Rahmen des NHEJ Mutationen anhäufen.

Eine zusätzliche Mutation von p53 hat daher auch einen zusätzlich sensibilisierenden Effekt gegenüber AZD2281.

Die Toxizität von PARP Inhibitoren auf p53(-/-), ATM(-/-) -Zellen kann durch DNA-PKc Hemmstoffe aufgehoben werden (Williamson et al., 2012).

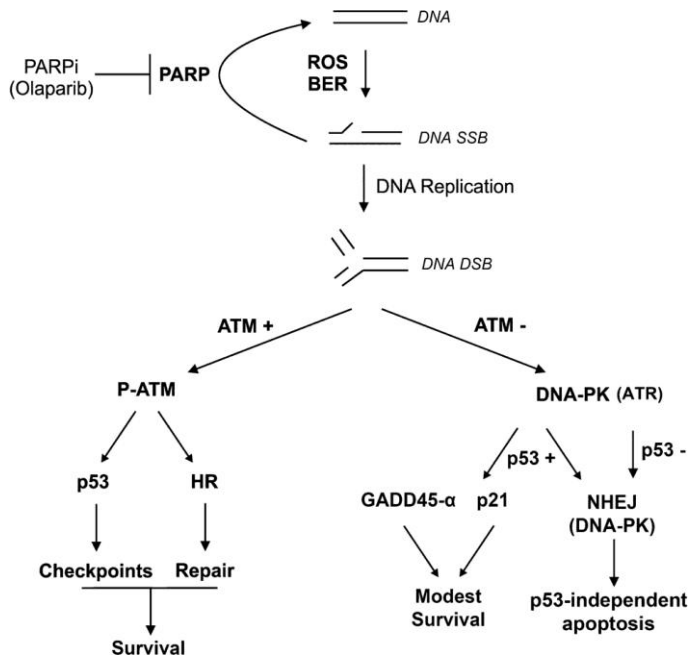


Abbildung 5.1.2.3 (Williamson et al., 2012)

Allerdings gibt es auch Thesen, die diesen Forschungsergebnissen unmittelbar widersprechen. Hier dient DNA-PK in Abwesenheit von ATM als alternativer Weg der DNA Reparatur, um einen Zelltod zu verhindern (Jiang et al., 2009).

Dies steht in unmittelbarem Widerspruch zueinander und weiterführende Forschung wird notwendig sein, um diese Diskrepanz auf molekularer Ebene zu erklären. Auch erklärt dies nicht das unterschiedliche Ansprechen von JeKo und Mino auf AZD2281, da beide denselben Mutationsstatus bezüglich ATM und p53 aufweisen. Dies zeigt, dass man noch weit davon entfernt ist, sämtliche prädiagnostischen Gene für ein Ansprechen auf AZD2281 bzw. PARP Inhibitoren zu kennen, und das oben erklärte Modell eine starke Vereinfachung und Interpretation darstellt, die das Verständnis erleichtert.



## 5.2. Western Blot Analysen

### 5.2.1 Western Blot Analysen von ATM

Die Inkubation mit Cisplatin führt zur Bildung von DNA Addukten durch Quervernetzung der DNA Stränge und Bindung des reaktiven Platin unter Mitnahme von NH<sub>3</sub>-Gruppen an Nucleinsäure Untereinheiten (*Pharmakologie und Toxikologie*, Wehling, 2010).

Die Reparatur dieser Addukte geschieht vor allem über die BER, deren Steigerung zu einer Cisplatin Resistenz führen kann. Alternativ werden die entstehenden Addukten über die Mismatch-Reparatur repariert. Eine Hemmung dieser Mismatch Reparatur führt zu einer Cisplatin Resistenz. Durch überschießende Reparaturmechanismen im Rahmen der mismatch Reparatur entstehen ESB (Chaney & Sancar, 1996) (Eastman & Schulte, 1988).

Im Vergleich zu den anderen Zelllinien war ATM bei Granta geringer nachweisbar, da Granta ein mutiertes Allel von ATM besitzt, was zu einer verminderten Expression von ATM führt (Williamson et al., 2012).

In den anderen Zelllinien kam es dagegen zu einer Zunahme der ATM Expression durch die Behandlung mit Cisplatin und/ oder AZD2281, was für eine Akkumulation von genetischen Schäden und der Entstehung von DNA- DSB spricht.

Viel aussagekräftiger für die intrazellulär ablaufenden Signalkaskaden ist in diesem Zusammenhang der Nachweis der autokatalytisch aktivierten Variante Phospho-ATM (Ser1981).

Der Effekt der zunehmenden Aktivierung von ATM durch Autophosphorylierung konnte, wie erwartet, vor allem bei Inkubation mit AZD2281/ Cisplatin beobachtet werden. Durch die Behandlung mit AZD2281 entstehen DSB, aus den durch Cisplatin induzierten ESB. Diese aktivieren ATM und führen zur autokatalytischen Phosphorylierung an Serin 1981.

Besonders deutlich war dies zusehen bei der Zelllinie NCEB und einer Inkubationszeit von 48h.

Sie besitzt Mutationen des ATM Gens. Dies hätte aber nur dann Einfluss auf das Ergebnis; wenn das autokatalytisch aktive Zentrum von ATM davon betroffen wäre.

### 5.2.2. Western Blot Analysen von NBS-1/ p95

Das NBS-1 Protein spielt wie ATM eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA DSB. Es formt mit hMre11/hRad50 einen Protein Komplex, der daran beteiligt sein soll, einen räumlichen Kontakt zwischen DNA Schäden und den Reparaturenzymen herzustellen (J. H. Petrini, 1999).

NBS-1 wird von ATM aktiviert und zum Ort der DNA Schädigung rekrutiert. Phosphoryliertes NBS-1 soll ausschließlich an der Reparatur von DNA DSB beteiligt sein (J. H. J. Petrini & Stracker, 2003).

Somit ist zu erwarten, dass auch die Expression von NBS-1 bei Behandlung der Zellen mit Cisplatin und/ oder AZD2281 ansteigt.

Dies trifft für Granta-519 und NCEB zu. Hier nimmt die Expression von NBS-1 analog zu ATM ab 48h zu und ist dann bei einer Kombinationsbehandlung der Zellen mit AZD2281/ Cisplatin wieder deutlich höher als bei alleiniger Inkubation mit Cisplatin. Dieses Ergebnis erscheint in Zusammenschau mit den Western Blots von ATM durchaus plausibel.

Interessanterweise ist die Expressionszunahmen bei der Zelllinie Mino deutlich geringer, wie dies auch schon für ATM der Fall war.

In der Zelllinien Z138I ließ sich NBS-1 wiederholt nicht nachweisen. Dies war auch schon in den Etablierungsversuchen zum Austesten der richtigen Anti-NBS-1-Antikörper Konzentration der Fall. In der Literatur findet sich kein Hinweis auf eine fehlende Expression von NBS-1 in der Zelllinie Z138.

Eine fehlende NBS-1 Funktion in der Zelllinie Z138 kann erklären, warum diese besser auf AZD2281 anspricht als Mino, obwohl sie sich im ATM Mutationsstatus nicht unterscheiden. Da NBS-1 eines der Zielstrukturen der ATM Kinase ist, führt das Fehlen dieses Protein zu einer Störung der DNA Reparaturmechanismen und damit zu einer erhöhten Sensitivität auf AZD2281.

### 5.2.3. Western Blot Analysen von PARP

Die PARP wird im Rahmen von DNA Schäden aktiviert und scheint ein Sensor für diese zu sein (Haince et al., 2007). Die wichtigste Zielstruktur der PARP ist sie selbst (Lindahl et al., 1995). Die Synthese von Poly-ADP-Ribose Molekülen führt zu einer Veränderung der Chromatinstruktur und zu einer Aktivierung ATM abhängiger Signalwege. Eine Hemmung der PARP führt dahingegen zu einer verminderten ATM-abhängigen Phosphorylierung von p53 und Histone H2A.X (Haince et al., 2007).

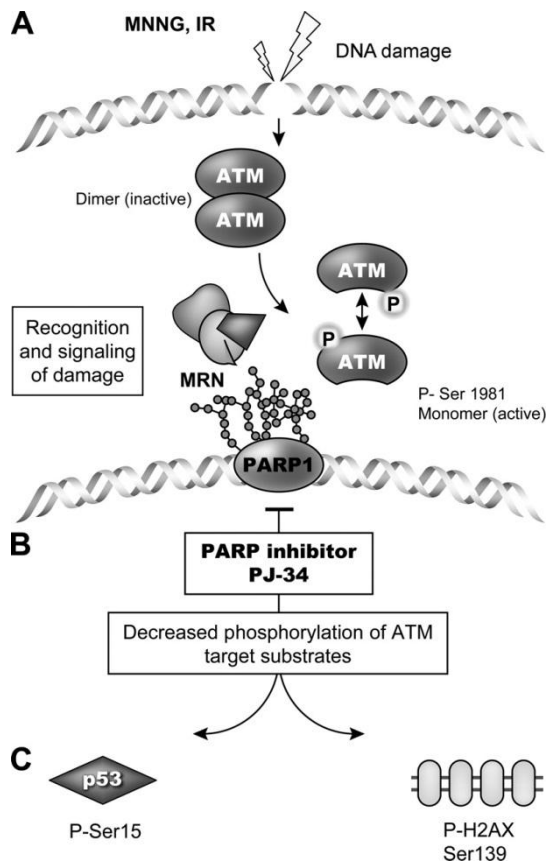


Abbildung 5.2.3.1 1 (Haince et al., 2007)

Die PARP-1 ist intrazellulär in großer Menge vorhanden und wird durch DNA Schäden induziert (Lindahl et al., 1995) (Tartier et al., 2003).

Daher lässt sich ein deutlicher Nachweis der PARP-1 sowohl in unbehandelten und behandelten Zellen erwarten, mit einer Zunahme der Expression im Rahmen der Behandlung mit AZD2281 und Cisplatin.

Dies bestätigt sich in den Ergebnissen der Western Blots weitest gehend. Hier fand sich eine konstant hohe Nachweisbarkeit der PARP unabhängig von der Vorbehandlung der Zelllinien. Eine deutliche Zunahme der PARP Nachweisbarkeit konnte vor allem bei Granta gefunden werden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass ein Antikörper verwendet wurde, der die PARP gesamt und nicht selektiv die PARP-1 nachweist, was limitierend für die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist.

#### **5.2.4 Western Blot Analysen von Phospho-p53 (Ser15)**

Die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 wird durch die ATM Kinase im Rahmen von DNA DSB katalysiert. Dies führt zum Zellzyklus Arrest in der G1-Phase (Kang et al., 2005).

Der Einfluss der PARP-1 auf die ATM vermittelte Aktivierung von p53 wird kontrovers diskutiert. Manche Studien zeigen einen positiven Einfluss der PARP-1 auf die Phosphorylierung von p53 durch ATM und somit eine verminderte ATM-abhängige Phosphorylierung von p53 unter dem Einfluss von PARP Inhibitoren (Haince et al., 2007). Andere Studien wiederum zeigen eine Hemmung der ATM abhängigen Aktivierung von p53 durch die PARP-1 (Watanabe et al., 2004).

In vorliegenden Western Blots von Granta und NCEB fanden sich eine hohe Nachweisbarkeit von Phospho-p53 (Ser15). ATM gilt als wesentlicher Katalysator für diese Phosphorylierung und beide Zelllinien besitzen ATM Mutationen. Allerdings besitzt zumindest Granta einen niedrigen Spiegel an funktionsfähiger ATM Kinase (Williamson et al., 2012). Auch andere Enzyme wie z.B. die AMP-abhängige Kinase können eine derartige Phosphorylierung von p53 katalysieren (Williamson et al., 2012). Daher lässt sich kein einfacher Zusammenhang zwischen einer ATM Mutation und einer verminderten Aktivierung von p53 ableiten.

Generell hatten alle Zelllinien einen hohen Spiegel an phosphorylierten p53. Bei Mino und Z138 fand sich eine deutliche Zunahme der Phospho-p53 (Ser15) Konzentration durch die Behandlung mit Cisplatin und/ oder AZD2281. Ansonsten fand sich eine im Wesentlichen von der zusätzlichen Gabe von AZD2281 zu Cisplatin unabhängige Nachweisbarkeit von Phospho-p53 (Ser15).

## 5.2.5 Western Blot Analysen von p21

Die Transkription von p21 wird durch aktiviertes p53 stimuliert. p21 ist an der durch p53 vermittelten Apoptose beteiligt (Green & Kroemer, 2009).

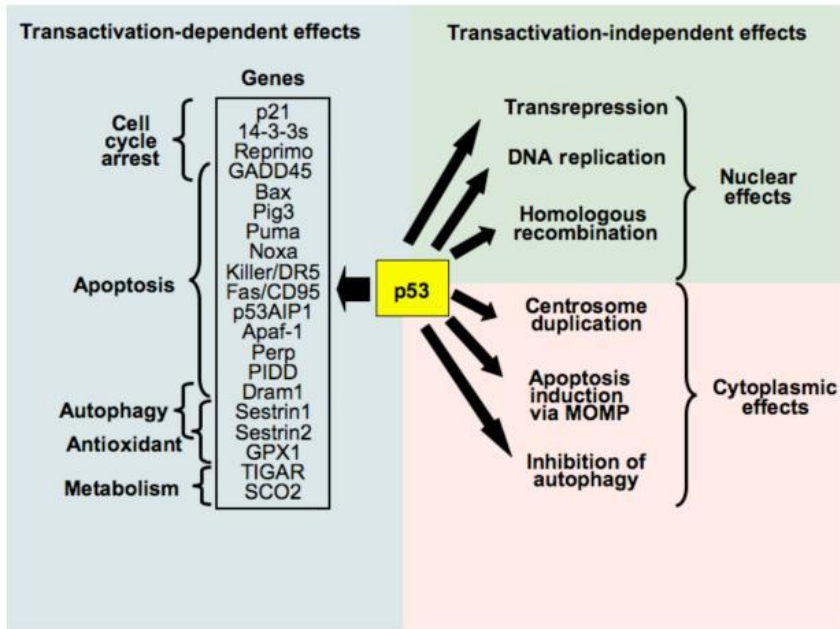


Abbildung 5.2.5.1 1 (Green & Kroemer, 2009)

Die unter 5.2.3 beschriebene, hohe Nachweisbarkeit von Phospho-p53 (Ser15) korreliert dementsprechend mit der hohen Expression von p21.

Bei der Zelllinie Z138, bei der es erst nach einem Einwirken von AZD2281 und/oder Cisplatin über mindestens 24h Stunden zu einer deutlichen Aktivierung von p53 gekommen war, kam es dementsprechend auch erst etwas zeitlich versetzt zu einer deutlichen Zunahme der p21 Konzentration.

### **5.2.6 Western Blot Analysen von Phospho-Histone H2A.X (Ser139)**

Histone H2A.X ist eines der ersten Substrate der ATM Kinase im Rahmen einer DNA Schädigung und wird von ihr an Serin 136 und Serin 139 phosphoryliert (Kang et al., 2005) (Shiloh & Kastan, 2001).

Phospho-Histone H2A.X rekrutiert dann weitere, an der Reparatur von DNA Schäden beteiligte, Enzyme zum Ort der Schädigung.

Allerdings gibt es auch Hinweise, dass Phospho- Histone H2A.X ATM aktivieren kann und somit kein Downstream- sondern ein Upstream Mediator des ATM Signalweges ist (Kang et al., 2005) (Ward, Minn, Jorda, & Chen, 2003)(Kobayashi et al., 2009).

Ähnlich wie bei der Aktivierung von p53, gibt es auch hier die Hypothese, dass es unter dem Einfluss von PARP Inhibitoren zu einer verspäteten und reduzierten Phosphorylierung von Histone H2A.X durch ATM kommt (Watanabe et al., 2004).

In obigen Western Blots fand sich eine Zunahme der Nachweisbarkeit von Phospho-Histone H2A.X analog zu der Zunahme von Phospho-p53. Bei beiden handelt es sich, wie schon beschrieben, um Zielstrukturen der aktivierten ATM Kinase.

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass sich PARP Inhibitoren möglicherweise gut für die Therapie von MCL mit ATM Mutationen - im Sinne des Modells der synthetic lethality- eignen insbesondere, wenn diese zusätzlich Mutationen im TP53 Gen aufweisen. Mantelzelllymphome weisen in 26% p53 Mutationen, in 56% ATM Mutationen und in 10% Mutationen in beiden Genen auf (Williamson et al., 2012) (Greiner et al., 2006).

Eine Therapie mit AZD2281 könnte daher bei einem großen Teil der diagnostizierten MCL vielversprechend sein.

Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse sollte in klinischen Studien mit der Verwendung von AZD2281 als Ergänzung zur konventionellen Therapie getestet werden.

In klinischen Studien zur Therapie des Ovarialkarzinoms mit AZD2281 hat sich zudem ein ausgesprochen günstiges Nebenwirkungsprofil gezeigt (Ledermann et al., 2012).

Es wird aber auch klar, dass viele noch nicht bekannte Faktoren das Ansprechen auf AZD2281 bedingen, und dass die beteiligten Signalwege nur unzureichend erforscht sind.

Dementsprechend ist zu erwarten, dass im Rahmen intensiverer Forschung noch mehr Gene, wie zum Beispiel das NBS1 Gen, die eine erhöhte Sensibilität gegenüber PARP Inhibitoren bedingen, bekannt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Kombinationstherapie mit AZD2281 und Platinderivaten ist, dass mit Hilfe von PARP Inhibitoren eine Cisplatin Resistenz überwunden werden kann (Zhu et al., 2010). Die Resistenz auf Platinderivate entsteht vor allem durch Hochregulation von DNA Reparaturmechanismen (Germà-Lluch & Piulats, 2013).

Die PARP interagiert aber genau mit diesen Reparaturmechanismen und stimuliert die Reparatur von DNA Schäden. Auch dies bedarf noch intensiver Forschung, um die tatsächliche Relevanz dieser theoretischen Überlegungen zu überprüfen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abd Elmageed, Z. Y., Naura, A. S., Errami, Y., & Zerfaoui, M. (2012). The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport. *Cellular signalling*, 24(1), 1–8.
- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*, 15(17), 2177–96.
- Adams, B. R., Golding, S. E., Rao, R. R., & Valerie, K. (2010). Dynamic dependence on ATR and ATM for double-strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants. *PLoS One*, 5(4), e10001.
- Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55117–55126.
- Audeh, M. W., Carmichael, J., Penson, R. T., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K. M., Scott, C., Weitzel, J.N., Oaknin, A., Loman, N., Lu, K., Schmutzler, R.K., Matulonis, U., Wickens, M., Tutt, A. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376(9737), 245–51.
- Babbage, G., Garand, R., Robillard, N., Zojer, N., Stevenson, F. K., & Sahota, S. S. (2004). Mantle cell lymphoma with t(11;14) and unmutated or mutated VH genes expresses AID and undergoes isotype switch events. *Blood*, 103(7), 2795–2798.
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506.
- Beà, S., Valdés-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martín-Garcia, D., Jares, P., Giné, E., Pinyol, M., Royo, C., Nadeu, F., Conde, L., Juan, M., Clot, G., Vizán, P., Di Croce, L., Puente, D.A., López-Guerra, M., Moros, A., Roue, G., Aymerich, M., Villamor, N., Colomo, L., Martínez, A., Valera, A., Martín-Subero, J.I., Amador, V., Hernández, L., Rozman, M., Enjuanes, A., Forcada, P., Muntañola, A., Hartmann, E.M., Calasanz, M.J., Rosenwald, A., Ott, G., Hernández-Rivas, J.M., Klapper, W., Siebert, R., Wiestner, A., Wilson, W.H., Colomer, D., López-Guillermo, A., López-Otín, C., Puente, X.S., Campo, E. (2013). Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18250–5.
- Beneke, R., Geisen, C., Zevnik, B., Bauch, T., & Ku, J. (2000). DNA Excision Repair and DNA Damage-Induced Apoptosis Are Linked to Poly ( ADP-Ribosyl ) ation but Have Different Requirements for p53, *Mol Cell Biol.*, 20(18), 6695–6703.



- Ben-Hur, E., Utsumi, H., & Elkind, M. M. (1984). Inhibitors of poly(ADP-ribose) synthesis enhance X-ray killing of log-phase Chinese hamster cells. *Radiation research*, 97(3), 546–55
- Bertoni, F., Rinaldi, a, Zucca, E., & Cavalli, F. (2006). Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematological Oncology*, 24(1), 22–27.
- Bishop, J. M., Deng, C. T., Faras, A. J., Goodman, H. M., Guntaka, R. R., Levinson, W. E., Cordell-Stewart, B., Taylor, J.M., Varmus, H. E. (1975). Transcription of the Rous sarcoma virus genome in vitro and in vivo. *Bibliotheca haematologica*, (40), 517–23.
- Boulton, S., Pemberton, L. C., Porteous, J. K., Curtin, N. J., Griffin, R. J., & Golding, B. T. (1995). Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity : a comparative study of the biological effects of poly ( ADP-ribose ) polymerase inhibitors, *Br J Cancer*, 72(4), 849-56.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–54.
- Bryant, H. E., & Helleday, T. (2006). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair. *Nucleic acids research*, 34(6), 1685–91.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*, 276(45), 42462–7.
- Caraway, N. P., Gu, J., Lin, P., Romaguera, J. E., Glassman, A., & Katz, R. (2005). The utility of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the translocation t(11;14)(q13;q32) in the diagnosis of mantle cell lymphoma on fine-needle aspiration specimens. *Cancer*, 105(2), 110–8.
- Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., Hays, L., Morgan, W.F., Petrini, J. H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 93(3), 477–86.
- Chaney, S. G., & Sancar, A. (1996). DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(19), 1346–60.
- Cogliatti, S. B., & Schmid, U. (2001). Who is WHO and what was REAL? *Swiss Med Wkly.*,132(43-44):607-17.

Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151(2), 369–74.

Curtin, N. J., Wang, L.-Z., Yiakouvaki, A., Kyle, S., Arris, C. a, Canan-Koch, S., Webber, S.E., Durkacz, B.W., Calvert, H.A., Hostomsky, Z., Newell, D. R. (2004). Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clinical cancer research*, 10(3), 881–889.

D'Amours, D., & Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(5), 317–327.

De Leeuw, R. J., Davies, J. J., Rosenwald, A., Bebb, G., Gascoyne, R. D., Dyer, M. J. S., Staudt, L.M., Martinez-Climent, J.A., Lam, W. L. (2004). Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Human molecular genetics*, 13(17), 1827–37.

Delaney, C. a, Wang, L. Z., Kyle, S., White, a W., Calvert, a H., Curtin, N. J., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Newell, D. R. (2000). Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clinical cancer research*, 6(7), 2860–2867.

Denk, H., Heitz, P. U., Böcker, H. M. W., Blut, Knochenmark und lymphatisches System, In: „Pathologie“, Denk, H., Heitz, P. U., Böcker, H. M. W. (Hrsg.), Urban & Fischer bei Elsevier, München, 2008, 4.Auflage, S. 555-593.

Dörken B., Onkologie und Hämatologie, In: „Harrisons Innere Medizin“, Suttorp, N., Dietel, M., Zeitz M. (Hrsg.), ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2009, 17.Auflage , S. 866-867  
Drexler, H. G., Granta-519, NCEB-1, Z138, Table II, In: “The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook”, Drexler, H. G. (Hrsg.), Academic Press, London, 2000, S. 216, 249, 288, 680-687.

Dreyling, M., & Hiddemann, W. (2009). Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 542–51.

Eastman, A., & Schulte, N. (1988). Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, 27(13), 4730–4.

Efferth, T., Molekulare Toxikologie, In: „Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften“, Efferth, T., Springer Verlag, Heidelberg, 2006, S. 153-182.

Ekström Smedby, K., Hjalgrim, H., Melbye, M., Torrang, A., Rostgaard, K., Munksgaard, L., Adami, J., Hansen, M., Porwit-MacDonald, A., Jensen, B.A., Roos, G., Pedersen, B.B., Sundström, C., Glimelius, B., Adami, H.-O. (2005). Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(3), 199–209.

Evers, B., Drost, R., Schut, E., de Bruin, M., van der Burg, E., Derksen, P. W. B., Holstege, H., Liu, X., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Smith, G.C., Martin, N.M., Lau, A., O'Connor, M.J., Jonkers, J. (2008). Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clinical cancer research*, 14(12), 3916–25.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M., Jackson, S.P., Smith, G.C., Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–21.

Featherstone, C, & Jackson, S. P. (1999). DNA double-strand break repair. *Current biology* : CB, 9(20), R759–61.

Fernández, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E., & Rosenwald, A. (2005). Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *Journal of clinical oncology*, 23(26), 6364–6369.

Ferrer, A., Marcé, S., Bellosillo, B., Villamor, N., Bosch, F., López-Guillermo, A., Espinet, B., Solé, F., Montserrat, E., Campo, E., Colomer, D. (2004). Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes. *Oncogene*, 23(55), 8941–9.

Ferro, A. M., & Olivera, B. M. (1982). Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 257(13), 7808–13.

Foster, S. S., De, S., Johnson, L. K., Petrini, J. H. J., & Stracker, T. H. (2012). Cell cycle- and DNA repair pathway-specific effects of apoptosis on tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), 9953–8.

Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Gascoyne, R.D., Staudt, L.M., Chan, W. C. (2005). Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, 106(13), 4315–21.

Garber, K. (2004). Running interference: pace picks up on synthetic lethality research. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(13), 982–3.

Geisler, C. H., Kolstad, A., Laurell, A., Rätty, R., Jerkeman, M., Eriksson, M., Nordström, M., Kimby, E., Boesen, A.M., Nilsson-Ehle, H., Kuittinen, O., Lauritzen, G.F., Ralfkiaer, E., Ehinger, M., Sundström, C., Delabie, J., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Brown, P., Elonen, E. (2010). The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood*, 115(8), 1530–3.

Germà-Lluch, J. R., & Piulats, J. M. (2013). Molecular bases of platinum-resistance in testicular cancer, *Archivos españoles de urología*, 66(5), 524–35.

Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242), 1127–30.

Greiner, T. C., Dasgupta, C., Ho, V. V., Weisenburger, D. D., Smith, L. M., Lynch, J. C., Vose, J.M., Fu, K., Armitage, J.O., Braziel, R.M., Campo, E., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Jaffe, E.S., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Im, M.Y., Karaman, M.W., Pike, B.L., Chan, W.C., Hacia, J. G. (2006). Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2352–7.

Gu, B., & Zhu, W.-G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *International journal of biological sciences*, 8(5), 672–84. doi:10.7150/ijbs.4283  
Haince, J.-F., Kozlov, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Hendzel, M. J., Lavin, M. F., & Poirier, G. G. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry*, 282(22), 16441–53.

Herold G., Maligne Lymphome, In: “Innere Medizin”, Herold G. (Hrsg.), Köln, 2010, S. 68-73

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C. J., Green, S. J., Martin, N. M. B., Orr, A. I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., Smith, G. C. M. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research*, 64(24), 9152–9.

Hirt, C., Schüler, F., Dölken, L., Schmidt, C. a, & Dölken, G. (2004). Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood*, 104(3), 904–5.

- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H. C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W.D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W., Unterhalt, M. (2008). A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, 111(2), 558–65.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, a, Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104(1-4), 14–20.
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687–96.
- Jares, P., Colomer, D., & Campo, E. (2007). Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: Perspectives for new targeted therapies. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 750–762.
- Jeon, H. J., Kim, C. W., Yoshino, T., & Akagi, T. (1998). Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *British journal of haematology*, 102(5), 1323–6.
- Jiang, H., Reinhardt, H. C., Bartkova, J., Tommiska, J., Blomqvist, C., Nevanlinna, H., Bartek, J., Yaffe, M.B., Hemann, M. T. (2009). The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes & development*, 23(16), 1895–909.
- Kaelin, W. G. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 5(9), 689–98.
- Kanaar, R., & Hoeijmakers, J. H. J. (1998). Molecular mechanisms of DNA double- strand break repair, 8924(1989), 2708–2712.
- Kang, J., Ferguson, D., Song, H., Bassing, C., Eckersdorff, M., Alt, F. W., & Xu, Y. (2005). Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. *Molecular and cellular biology*, 25(2), 661–70.
- Kawamata, N., Ogawa, S., Gueller, S., Ross, S. H., Huynh, T., Chen, J., Chang, A., Nabavi-Nouis, S., Megrabian, N., Siebert, R., Martinez-Climent, J.A., Koeffler, H. P. (2009). Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Experimental hematology*, 37(8), 937–46.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks : signaling, repair and the cancer connection, *Nat Genet.*, 27(3), 247–54.

Kienle, D., Katzenberger, T., Ott, G., Saupe, D., Benner, A., Kohlhammer, H., Barth, T.F., Höller, S., Kalla, J., Rosenwald, A., Müller-Hermelink, H.K., Möller, P., Lichter, P., Stilgenbauer, S. (2007). Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors. *Journal of clinical oncology*, 25(19), 2770–2777.

Kienle, D., Kröber, A., Katzenberger, T., Ott, G., Leupolt, E., Barth, T. F. E., Möller, P., Benner, A., Habermann, A., Müller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Lichter, P., Döhner, H., Stilgenbauer, S. (2003). VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, 102(8), 3003–3009.

Kobayashi, J., Tauchi, H., Chen, B., Burma, S., Bruma, S., Tashiro, S., ... Komatsu, K. (2009). Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(4), 752–7.

Lai, R., McDonnell, T. J., O'Connor, S. L., Medeiros, L. J., Oudat, R., Keating, M., Morgan, M.B., Curiel, T.J., Ford, R. J. (2002). Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leukemia research*, 26(9), 849–55.

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. *The New England journal of medicine*, 366(15), 1382–92.

Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wörmann, B., Dührsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2005). Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results. *Journal of clinical oncology*, 23(9), 1984–92.

Levine, A. M., Shimodaira, S., & Lai, M. M. C. (2003). Treatment of HCV-related mantle-cell lymphoma with ribavirin and pegylated interferon Alfa. *The New England journal of medicine*, 349(21), 2078–9.

Liang, Y., Lin, S.-Y., Brunicardi, F. C., Goss, J., & Li, K. (2009). DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World journal of surgery*, 33(4), 661–6.

Lindahl, T., Satoh, M. S., Poirier, G. G., & Klungland, A. (1995). Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends in biochemical sciences*, 20(10), 405–11.

- Lovec, H., Grzeschiczek, a, Kowalski, M. B., & Möröy, T. (1994). Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *The EMBO journal*, 13(15), 3487–3495.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L., Maligne Neoplasien, Zytostatika, In: “Pharmakologie und Toxikologie“, Lüllman H., Mohr K., Hein L. (Hrsg.), Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, 2006, 16.Auflage, S.418-433.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298–306.
- Norton, A. J., Matthews, J., Pappa, V., Shamash, J., Love, S., Rohatiner, A. Z., & Lister, T. A. (1995). Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Annals of oncology*, 6(3), 249–56.
- Ohno, H., Katsurada, T., Isoda, K., & Yoshida, Y. (2009). Histopathology of bone marrow “clot” section of a mantle cell lymphoma. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 48(6), 489–90.
- Ott, G., Kalla, J., Ott, M. M., Schryen, B., Katzenberger, T., Müller, J. G., & Müller-Hermelink, H. K. (1997). Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*, 89(4), 1421–1429.
- Patel, A. G., Sarkaria, J. N., & Kaufmann, S. H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), 3406–11.
- Pestell, R. G., Albanese, C., Reutens, A. T., Segall, J. E., Lee, R. J., & Arnold, A. (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine reviews*, 20(4), 501–34.
- Petrini, J. H. (1999). The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *American journal of human genetics*, 64(5), 1264–9.
- Petrini, J. H. J., & Stracker, T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in cell biology*, 13(9), 458–62.
- Pham, L. V, Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., & Ford, R. J. (2003). Inhibition of Constitutive NF- $\kappa$ B Activation in Mantle Cell Lymphoma B Cells Leads to Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis, *J Immunol.*, 171(1):88-95

Quintanilla-Martinez, L., Davies-Hill, T., Fend, F., Calzada-Wack, J., Sorbara, L., Campo, E., Jaffe, E.S., Raffeld, M. (2003). Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood*, 101(8), 3181–3187.

Rajan, A., Carter, C. A., Kelly, R. J., Gutierrez, M., Kummar, S., Szabo, E., Yancey, M.A., Ji, J., Mannargudi, B., Woo, S., Spencer, S., Figg, W.D., Giaccone, G. (2012). A phase I combination study of olaparib with cisplatin and gemcitabine in adults with solid tumors. *Clinical cancer research*, 18(8), 2344–51.

Rassow J., Hauser K., Netzker R., Mutationen und DNA Reparatur, In: „Biochemie“, J. Rassow, K.Hauser, R. Netzker (Hrsg.), Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, 2006, 1.Auflage, S.492-500 .

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858–68.

Rothkamm, K., Kru, I., Thompson, L. H., & Lo, M. (2003). Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle, *Mol Cell Biol.*, 23(16), 5706–5715.

Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T. H.-T., Fend, F., Jaffe, E. S., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M. (2006). Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, 108(5), 1668–1676.

Salaverria, I., Espinet, B., Carrió, A., Costa, D., Astier, L., Slotta-Huspenina, J., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Solé, F., Colomer, D., Serrano, S., Miró, R., Beà, S., Campo, E. (2008). Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes, chromosomes & cancer*, 47(12), 1086–97.

Schaffel, R., Hedvat, C. V, Teruya-Feldstein, J., Persky, D., Maragulia, J., Lin, D., Portlock, C.S., Moskowitz, C.H., Zelenetz, A. D. (2010). Prognostic impact of proliferative index determined by quantitative image analysis and the International Prognostic Index in patients with mantle cell lymphoma. *Annals of oncology*, 21(1), 133–9. doi:10.1093/annonc/mdp495  
Schöllkopf, C., Melbye, M., Munksgaard, L., Smedby, K. E., Rostgaard, K., Glimelius, B., Chang, E.T., Roos, G., Hansen, M., Adami, H.O., Hjalgrim, H. (2008). *Borrelia* infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 111(12), 5524–5529.

Schreiber, V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., De Murcia, G., & De Murcia, J. M. (1995). A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4753–7.



- Seymour, J. F., Grigg, A. P., Szer, J., & Fox, R. M. (2002). Cisplatin, fludarabine, and cytarabine: a novel, pharmacologically designed salvage therapy for patients with refractory, histologically aggressive or mantle cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 94(3), 585–93.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325–34.
- Shiloh, Y., & Kastan, M. B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Advances in cancer research*, 83, 209–54.
- Stracker, T. H., Roig, I., Knobel, P. A., & Marjanović, M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in genetics*, 4, 37.
- Tartier, L., Spenlehauer, C., Newman, H. C., Folkard, M., Prise, K. M., Michael, B. D., Ménessier-de Murcia, J., de Murcia, G. (2003). Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells. *Mutagenesis*, 18(5), 411–6.
- Turner, N. C., Lord, C. J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A.N., Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *The EMBO journal*, 27(9), 1368–77
- Walsh, S. H., & Rosenquist, R. (2005). Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 22(4), 327–41.
- Walsh, S. H., Thorsélius, M., Johnson, A., Söderberg, O., Jerkeman, M., Björck, E., Eriksson, I., Thunberg, U., Landgren, O., Ehinger, M., Löfvenberg, E., Wallman, K., Enblad, G., Sander, B., Porwit-MacDonald, A., Dictor, M., Olofsson, T., Sundström, C., Roos, G., Rosenquist, R. (2003). Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood*, 101(10), 4047–4054.
- Wang, X., Björklund, S., Wasik, A. M., Grandien, A., Andersson, P., Kimby, E., Dahlman-Wright, K., Zhao, C., Christensson, B., Sander, B. (2010). Gene expression profiling and chromatin immunoprecipitation identify DBN1, SETMAR and HIG2 as direct targets of SOX11 in mantle cell lymphoma. *PloS one*, 5(11), e14085.
- Wang, Z. Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., & Wagner, E. F. (1995). Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes & development*, 9(5), 509–520.
- Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G., & Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *The Journal of biological chemistry*, 278(22), 19579–82.

Watanabe, F., Fukazawa, H., Masutani, M., Suzuki, H., Teraoka, H., Mizutani, S., & Uehara, Y. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(2), 596–602.

Weigert, O., Unterhalt, M., Hiddemann, W., & Dreyling, M. (2009). Mantle cell lymphoma: state-of-the-art management and future perspective. *Leukemia & lymphoma*, 50(12), 1937–50.

Weston, V. J., Oldreive, C. E., Skowronska, A., Oscier, D. G., Pratt, G., Dyer, M. J. S., Smith, G., Powell, J.E., Rudzki, Z., Kearns, P., Moss, P.A., Taylor, A.M., Stankovic, T. (2010). The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood*, 116(22), 4578–4587.

Williamson, C. T., Kubota, E., Hamill, J. D., Klimowicz, A., Ye, R., Muzik, H., Dean, M., Tu, L., Gilley, D., Magliocco, A.M., McKay, B.C., Bebb, D.G., Lees-Miller, S. P. (2012). Enhanced cytotoxicity of PARP inhibition in mantle cell lymphoma harbouring mutations in both ATM and p53. *EMBO molecular medicine*, 4(6), 515–27.

Williamson, C. T., Muzik, H., Turhan, A. G., Zamò, A., O'Connor, M. J., Bebb, D. G., & Lees-Miller, S. P. (2010). ATM deficiency sensitizes mantle cell lymphoma cells to poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*, 9(2), 347–357.

Xu, Y., Yang, E. M., Brugarolas, J., Jacks, T., & Baltimore, D. (1998). Involvement of p53 and p21 in cellular defects and tumorigenesis in *Atm*<sup>-/-</sup> mice. *Molecular and cellular biology*, 18(7), 4385–90.

Zhou, B.-B. S., & Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature reviews. Cancer*, 4(3), 216–225.

Zhu, G., Chang, P., & Lippard, S. J. (2010). Recognition of platinum-DNA damage by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 49(29), 6177–83.

Zuckerman, E., Zuckerman, T., Levine, A. M., Douer, D., Gutekunst, K., Mizokami, M., Qian, D.G., Velankar, M., Nathwani, B.N., Fong, T. L. (1997). Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Annals of internal medicine*, 127(6), 423–8.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.- Prof. Dr. Heinz Höfler, der mir diese Arbeit ermöglichte und Frau PD Dr. Martina Rudelius für die stete Unterstützung und Beratung während der gesamten Arbeit. Ebenso danke ich dem gesamten Laborteam und insbesondere Herrn Guido Piontek für die konstruktive und hilfreiche Zusammenarbeit.