

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Bedeutung einer PARP-Inhibition in der Behandlung des Peniskarzinoms

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ina Maria Fuhrmann  
aus Langenfeld (Rhld.)

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

Tag der Promotion: 17. Mai 2024

Für meine Eltern und Vera.

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	1
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Ziel der Dissertation .....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Das Peniskarzinom .....	2
2.1.1 Allgemeines .....	2
2.1.2 Therapie.....	6
2.2 Die BRCA-Mutation und PARP-Inhibitoren .....	9
2.2.1 Mutationen in den BRCA-Genen .....	9
2.2.2 Die Bedeutung von BRCA1 für die DNA-Reparatur.....	10
2.2.3 Gezielte Therapie BRCA-mutierter Tumore mittels PARP-Inhibition .....	11
3 Material und Methoden .....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Geräte .....	13
3.1.2 Programme .....	15
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	16
3.1.4 Reagenzien.....	19
3.1.5 Kits .....	22
3.1.6 Zelllinien.....	22
3.2 Methoden .....	22
3.2.1 Zellkultivierung.....	22
3.2.2 Umsetzen von Tumorzellen zur Zellvermehrung - Zellpassagierung.....	23
3.2.3 Zellzahlbestimmung .....	23
3.2.4 MTT-Zellviabilitätsassay - Tumorzellwachstum .....	24
3.2.5 Bestimmung des BrdU-Einbaus .....	28
3.2.6 Bestimmung der Zellzyklusphasen .....	30

3.2.7	Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate .....	31
3.2.8	Bestimmung der chemotaktischen Aktivität .....	32
3.2.9	Bestimmung des Migrationsverhaltens mittels <i>Scratch-Wound-Migration-Assay</i> . .....	34
3.2.10	Bestimmung des klonogenen Wachstums .....	35
3.2.11	Statistische Auswertung .....	38
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Evaluation der optimalen Dosis und des Tumorzellwachstums mittels des MTT-Tests .....	39
4.1.1	<i>In vitro</i> Etablierung der Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel .....	39
4.1.2	Olaparib inhibiert als Einzeltherapie das Tumorzellwachstum der PeC-Zellen	54
4.2	Die Standardtherapie und Olaparib induzieren zelltypspezifisch einen Zellzyklusarrest .....	56
4.3	Die Standardtherapie und Olaparib erhöhen die Anzahl apoptotischer Zellen .....	59
4.4	Die Standardtherapie und Olaparib hemmen zelltypspezifisch die chemotaktische Aktivität.....	61
4.5	Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die Migration....	62
4.6	Die Standardtherapie und Olaparib inhibieren das klonogene Wachstum.....	64
5	Diskussion .....	69
5.1	Evaluation der optimalen Dosis und des Tumorzellwachstums .....	70
5.1.1	<i>In vitro</i> Etablierung der Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel .....	70
5.1.2	Olaparib inhibiert als Einzelbehandlung das Tumorzellwachstum.....	72
5.2	Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die Verteilung der PeC-Zellen auf die Zellzyklusphasen.....	76
5.3	Die Standardtherapie und Olaparib erhöhen die Anzahl apoptotischer PeC-Zellen	78
5.4	Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die chemotaktische Aktivität und die Migration .....	78
5.5	Die Standardtherapie und Olaparib inhibieren das klonogene Wachstum der PeC- Zellen .....	80
6	Zusammenfassung .....	81

7	Literaturverzeichnis.....	84
8	Anhang .....	93
8.1	Dosis-Wirkungskurven nach Zweierkombinationen bei den PeC3- und PeC4-Zellen (MTT-Test).....	93
8.2	Dosis-Wirkungskurven nach Dreierkombinationen bei den PeC3- und PeC4-Zellen (MTT-Test).....	97

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
Anti-Anti	Antibiotika-Antimykotikum
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> , Ataxia Telangiectasia mutiert
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BRCA	<i>Breast Cancer</i> , Brustkrebs
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CI	<i>combination index</i> , Kombinationsindex
Cis	Cisplatin
CMFDA	5-Chlormethylfluoresceindiacetat
DDR	<i>desoxyribonucleic acid damage repair</i> , Reparatur von Desoxyribonukleinsäure-Schäden
DMEM	Dulbeccos's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSB	<i>double-strand break</i> , Doppelstrangbruch
DSNB	<i>dynamic sentinel lymph node biopsy</i> , dynamische Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Europäische Arzneimittel-Agentur
EpiCGS	Epitheliale Zellwachstums-Ergänzung
EpiCM	Epitheliales Zellmedium
FCS	Fetales Rinderserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> , US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	<i>homologous recombination</i> , homologe Rekombination
hrHPV-Typen	Hochrisiko humanes Papillomvirus-Typen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbeccos's Medium
Ktrl	Kontrolle
MIL	Modifizierte inguinale Lymphadenektomie
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i> , Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i> , mechanistisches Ziel des Rapamycins
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , Nicht-homologe Endverknüpfung
Ns	nicht signifikant
Ola	Olaparib
P/S solution	Penicillin und Streptomycin enthaltende Kochsalzlösung
P53BP1	p53-Binding-Protein 1
Pac	Paclitaxel
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS <sup>-</sup>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PBS <sup>+</sup>	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium
PeC	<i>penile carcinoma</i> , Peniskarzinom
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie – Computertomographie
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin

Px <sup>2</sup>	Quadratpixel
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
Rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SLFN11	Schlafen 11
SSB	<i>single-strand break</i> , Einzelstrangbruch
ssDNA	<i>single-stranded desoxyribonucleic acid</i> , einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dosis-Wirkungskurven für PeC3-Zellen nach Einzelbehandlung mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel.....	40
Abbildung 2: Dosis-Wirkungskurven für PeC4-Zellen nach Einzelbehandlung mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel.....	42
Abbildung 3: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel.....	45
Abbildung 4: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel und Cisplatin.....	47
Abbildung 5: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn für die kombinierte Gabe von zwei Therapeutika .....	48
Abbildung 6: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin.....	50
Abbildung 7: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn bei den PeC3-Zellen für die kombinierte Gabe von drei Therapeutika .....	51
Abbildung 8: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU.....	53
Abbildung 9: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn bei den PeC4-Zellen für die kombinierte Gabe von drei Therapeutika .....	54
Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve für PeC3- und PeC4-Zellen nach Einzelbehandlung mit Olaparib.....	55
Abbildung 11: Wachstum nach Behandlung mit den ausgewählten Konzentrationen für die Kombinationstherapie aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin sowie der Einzelbehandlung mit Olaparib.....	56
Abbildung 12: Verteilung der PeC-Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Standardtherapie oder Einzelbehandlung mit Olaparib .....	58
Abbildung 13: Anteil an der S-Phase der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib .....	59
Abbildung 14: Apoptose- und Nekroserate der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzelbehandlung mit Olaparib .....	60
Abbildung 15: chemotaktische Aktivität der PeC3-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib .....	62
Abbildung 16: Migration der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib.....	64
Abbildung 17: klonogenes Wachstum der PeC3-Zellen nach Einzeltherapie mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel und der Kombinationstherapie aus 5-FU und Paclitaxel .....	65
Abbildung 18: klonogenes Wachstum der PeC3-Zellen nach Standardtherapie oder	

Einzeltherapie mit Olaparib .....	66
Abbildung 19: klonogenes Wachstum der PeC4-Zellen nach Einzeltherapie mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel und der Kombinationstherapie aus Cisplatin und Paclitaxel.....	67
Abbildung 20: klonogenes Wachstum der PeC4-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib .....	69

## **Abbildungsverzeichnis Anhang**

Abb. A1: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Cisplatin .....	93
Abb. A2: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel und Cisplatin.....	94
Abb. A3: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel.....	95
Abb. A4: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Cisplatin .....	96
Abb. A5: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel.....	97
Abb. A6: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU.....	98
Abb. A7: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, 5-FU und Cisplatin.....	99
Abb. A8: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, 5-FU und Cisplatin.....	100
Abb. A9: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel.....	101
Abb. A10: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel.....	102
Abb. A11: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU.....	103

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: aktuelle TNM-Klassifikation des PeC; die pN-Klassifikation wird ebenfalls aufgeführt, bei der T-Kategorie entspricht die pathologische der klinischen Klassifikation (25) .....	4
Tabelle 2: Stadieneinteilung des PeC, orientiert an der TNM-Klassifikation (26) .....	5
Tabelle 3: verwendete Geräte .....	13
Tabelle 4: verwendete Programme .....	15
Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien .....	16
Tabelle 6: verwendete Reagenzien.....	19
Tabelle 7: verwendete Kits .....	22
Tabelle 8: Übersicht über die im MTT-Test verwendeten Konzentrationen zur Behandlung der Zelllinie PeC3 mit Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel und Olaparib.....	26
Tabelle 9: Übersicht über die im MTT-Test verwendeten Konzentrationen zur Behandlung der Zelllinie PeC4 mit Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel und Olaparib.....	26
Tabelle 10: allgemeines Pipettierschema für die Kombination von zwei Therapeutika im MTT-Test .....	27
Tabelle 11: allgemeines Pipettierschema bei der Kombination von drei Therapeutika im MTT-Test .....	28
Tabelle 12: Behandlungsschema für die Zelllinien PeC3 und PeC4 für alle nachfolgenden Untersuchungen.....	28
Tabelle 13: Differenzierung zwischen vitalen, frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen im Durchflusszytometer mithilfe des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I .....	32
Tabelle 14: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Cisplatin innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays.....	36
Tabelle 15: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit 5-FU innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays .....	36
Tabelle 16: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Paclitaxel innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays.....	36
Tabelle 17: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit der Kombinationstherapie bestehend aus zwei Therapeutika innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays.....	37
Tabelle 18: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit der Kombinationstherapie bestehend aus 5-Fluorouracil, Paclitaxel und Cisplatin innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays .....	37
Tabelle 19: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Olaparib innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays.....	37
Tabelle 20: Arzneimittelinteraktion: Einteilung mithilfe des Kombinationsindex (CI) nach	

Chou (1991) .....48

---

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Einleitung

Das Peniskarzinom (PeC) ist ein seltener maligner Tumor, der meist von den Plattenepithelzellen des inneren Blattes des Präputiums oder des *Glans penis* ausgeht (1). Es handelt sich hierbei um eine aggressive Neoplasie, die sich durch ein schnelles Tumorwachstum sowie eine rasche Metastasierung in die Lymphknoten auszeichnet (2). Während lokal begrenzte Erkrankungen in den meisten Fällen durch einen chirurgischen Eingriff erfolgreich geheilt werden können, gibt es für das metastasierte PeC bisher keine anhaltend wirksamen Behandlungsstrategien (3). Als systemische Standardtherapie kommt hier in Europa zurzeit eine platinbasierte Chemotherapie, oftmals bestehend aus der Kombination der Chemotherapeutika Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Paclitaxel zur Anwendung (1). Bei dieser Therapie sind die Ansprechraten mit etwa 30% jedoch gering und das Gesamtüberleben beträgt nicht mehr als 12 Monate (2, 4-6). Für das fortgeschrittene PeC ist daher die Entwicklung neuer und effektiver Behandlungsoptionen erforderlich. Die Generierung eines genomischen Profils des metastasierten PeC identifizierte neue potentielle Angriffspunkte für eine gezielte Therapie, wie etwa Veränderungen im mTOR- und Tyrosinkinase-Signalweg sowie in den DNA-Reparaturwegen (7). Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Augenmerk auf die Breast Cancer (BRCA)-Mutation gelegt, die in 7% der Karzinome nachgewiesen werden konnte. Durch diese und verwandte Mutationen kommt es zu einer unzureichenden Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA in der Zelle, die durch Mutationsakkumulation zur Tumorgenese und -progression beitragen, aber auch spezifische Angriffspunkte für Therapeutika darstellen könnten (8). So werden in der Behandlung von anderen BRCA-mutierten Tumorentitäten bereits Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitoren eingesetzt. Die PARPs sind Enzyme, die unter anderem eine wichtige Rolle bei der Basen-Exzisionsreparatur (BER) von DNA-Einzelstrangbrüchen spielen (9, 10). Aufgrund der Defekte in der Doppelstrangreparatur in BRCA-mutierten Zellen können die betroffenen Tumorzellen bei einer Inhibition der PARPs weder Einzel- noch Doppelstrangbrüche reparieren und es kommt zur Induktion eines regulierten Zelltodes (11). Gesunde Zellen (ohne BRCA-Mutation) können die Inhibition von PARP durch das intakte System zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen ausgleichen.

## 1.2 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertation war es, in zwei verschiedenen PeC-Zelllinien in Abhängigkeit von einer BRCA-Mutation die Wirksamkeit des PARP-Inhibitors Olaparib gegenüber der Standardtherapie mit Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel zu vergleichen. Anlass für die Studie war

---

der Nachweis einer Mutation im BRCA1-Gen in der primären humanen PeC-Zelllinie PeC3 im Rahmen einer Exomsequenzierung. Für den *in vitro* Vergleich wurde neben den PeC3-Zellen die primäre PeC-Zelllinie PeC4 herangezogen, in der eine solche Mutation nicht vorlag.

Um einen möglichst aussagekräftigen Vergleich der Therapieformen zu ermöglichen, wurde in einem ersten Schritt zunächst die Standardtherapie, bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel, *in vitro* etabliert. Ziel war es hierbei eine geeignete Kombination für die nachfolgenden Versuche zu identifizieren. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien PeC3 und PeC4 nach Einzelgabe sowie nach kombinierter Gabe der Substanzen evaluiert. Weiterhin wurde eine quantitative Bestimmung der Wechselwirkung der Therapeutika mittels des Programms CompuSyn (12) durchgeführt.

Nach Etablierung der Standardtherapie wurde zur Klärung der eigentlichen Fragestellung von der BRCA1-mutierten PeC3 und nativen PeC4 nach Behandlung mit Olaparib oder der Standardtherapie:

- das progressive Wachstumsverhalten evaluiert,
- die Verteilung in den Zellzyklusphasen sowie
- die Apoptose- und Nekroserate analysiert,
- das invasive Potential (Metastasierung) bestimmt.

Weltweit erstmalig sollte so mittels *in vitro* Studien evaluiert werden, ob und in welchem Maße eine Therapie mit Olaparib, in Abhängigkeit von einer BRCA1-Mutation, eine neue, wirkungsvollere Therapie für Patienten mit PeC darstellen könnte. Die Studien sind dabei als erste wegweisende Basis für die Etablierung einer potentiell vielversprechenden Behandlungsoption im Sinne der Präzisionsmedizin für Patienten mit PeC zu sehen.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das Peniskarzinom**

#### **2.1.1 Allgemeines**

Der Begriff Peniskarzinom (PeC) bezeichnet maligne Neoplasien, die sich aus dem Epithel des Penis entwickeln. In 95% der Fälle handelt es sich dabei um ein Plattenepithelkarzinom (13). Diese gehen entsprechend von den Plattenepithelzellen des *Glans penis*, des *Sulcus coronarius* oder des inneren Blattes des Präputiums aus. PeC der Schaffthaut sind hingegen selten. Die übrigen 5% der PeC sind rare Tumorentitäten wie Basalzellkarzinome und Melanome.

Das PeC ist eine seltene Erkrankung, von der weltweit im Jahr schätzungsweise 26.000 Fälle auftreten und die damit weniger als 1% der neu diagnostizierten Krebserkrankungen beim

---

Mann ausmacht (14). In einkommensstarken Ländern ist der Tumor besonders selten und tritt dort mit einer Inzidenz von 0,1-1 pro 100.000 Männer auf (15, 16). Weltweit sind jedoch regionale Unterschiede in der Inzidenzrate zu verzeichnen, die durch Risikofaktoren wie Infektionen mit dem Humanen Papillomvirus (HPV), Rauchen und schlechte hygienische Verhältnisse sowie durch protektive Faktoren, wie routinemäßige Zirkumzisionen im Kindesalter, bedingt sind. In Teilen Südamerikas, Asiens und Afrikas hat das PeC einen höheren Anteil und macht bis zu 10% der malignen Neoplasien beim Mann aus (15). Das PeC betrifft dabei vor allem Männer im fortgeschrittenen Alter mit einem Häufigkeitsgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt (2).

Eine Infektion mit HPV stellt nach derzeitiger Auffassung einen der häufigsten Risikofaktoren dar, der zur Genese des PeC beitragen kann (17, 18). Nach derzeitiger Studienlage sind dabei ca. 50% der PeC mit einer HPV-Infektion assoziiert (16). Die HPVs sind unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren, von denen über 150 verschiedene Typen existieren, von denen jedoch nur einige eindeutig mit der Entstehung von Krebs assoziiert werden können (19, 20). Die Tumorgenese wird nach Integration der Virus-DNA in die DNA der Epithelzellen, durch Überexpression von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, induziert. Für das PeC spielen insbesondere die Hochrisiko-HPV-Typen (hrHPV-Typen) 16 und 18 eine entscheidende Rolle (21). Als weitere Risikofaktoren gelten hauptsächlich klinische Risikofaktoren, vor allem chronische Entzündungen und somatische Genveränderungen (19). Entsprechend werden die PeC auch in der aktuellen Klassifikation der World Health Organization (WHO) in HPV- und nicht HPV-assoziierte Tumore eingeteilt (22, 23). Die WHO unterteilt die beiden Gruppen weiterhin in verschiedene histologische Subtypen. Eine Klassifikation des PeC entsprechend der WHO-Klassifikation, wie sie auch im pathologischen Befundbericht enthalten sein soll, liefert neben Hinweisen über die Pathogenese auch Informationen über die Prognose (24).

Die Stadieneinteilung (Tabelle 2) des PeC erfolgt mittels der aktuellen TNM (Tumor, Nodus, Metastasen)-Klassifikation (25). Mithilfe dieser Klassifikation werden die Tumorausdehnung (T), die Involvierung von regionären Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zunächst klinisch und anschließend auch histopathologisch untersucht und zugeordnet. Als Besonderheit wird beim PeC das histopathologische Grading, also die Angabe über den Differenzierungsgrad des Karzinoms, in der T-Kategorie der TNM-Klassifikation mit angegeben, indem der Grad beim pT1-Tumor zwischen einer pT1a- und einer pT1b-Kategorie differenziert (26). Als weiterer wichtiger prognostischer Faktor unterscheidet auch das Vorhandensein einer lymphovaskulären Invasion (L1-Status) oder einer perineuralen Tumorinvasion, ob der Tumor der pT1a- oder pT1b-Kategorie zugeordnet wird (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: aktuelle TNM-Klassifikation des PeC; die pN-Klassifikation wird ebenfalls aufgeführt, bei der T-Kategorie entspricht die pathologische der klinischen Klassifikation (25)

<b>Klinische Klassifikation</b>			
<b>T</b> Primärtumor	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor	
	Tis	Carcinoma in situ (penile intraepitheliale Neoplasie)	
	Ta	Nichtinvasives lokalisiertes Plattenepithelkarzinom	
	T1	Glans: Tumor infiltriert Lamina propria; Vorhaut: Tumor infiltriert Dermis, Lamina propria oder Dartos'sche Faszie; Schaft: Tumor infiltriert das Bindegewebe zwischen Epidermis und Corpora unabhängig von der Lokalisation	
		T1a	Tumor ohne lymphovaskuläre oder perineurale Infiltration, nicht schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
		T1b	Tumor mit lymphovaskulärer Infiltration und/oder perineuraler Invasion oder ist schlecht differenziert/undifferenziert/sarkomatoid
		T2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum (entweder Glans oder ventraler Schaft) mit/ohne Invasion der Urethra
		T3	Tumor infiltriert Corpus cavernosum (eingeschlossen Tunica albuginea) mit/ohne Invasion der Urethra
		T4	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen (z.B. Skrotum, Prostata, Schambein)
<b>N</b> Regionäre Lymphknoten (klinisch)	NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
	N0	Keine palpablen oder sichtbar vergrößerten Leistenlymphknoten	
	N1	Ein palpabler unilateraler Leistenlymphknoten	
	N2	Multiple oder bilaterale palpable mobile Leistenlymphknoten	
	N3	Fixierte Leistenlymphknotenpakete oder uni- oder bilaterale pelvine Lymphadenopathie	
<b>M</b> Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen	
	M1	Fernmetastasen	

<b>Pathologische Klassifikation</b>		
<b>pN</b> Regionäre Lymphknoten	pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	pN1	Metastase(n) in einem oder zwei Leistenlymphknoten
	pN2	Metastasen in mehr als zwei unilateralen inguinalen oder bilateralen Leistenlymphknoten
	pN3	Metastase(n) in Beckenlymphknoten (uni- oder bilateral) oder extranodale Ausbreitung regionärer Lymphknotenmetastasen
<b>G</b> Histopathologisches Grading	GX	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
	G1	Gut differenziert
	G2	Mäßig differenziert
	G3	Schlecht differenziert
	G4	Undifferenziert

Tabelle 2 zeigt die Zuteilung zu einem Stadium anhand der TNM-Klassifikation.

Tabelle 2: Stadieneinteilung des PeC, orientiert an der TNM-Klassifikation (26)

Stadium 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Stadium I	T1a	N0	M0
Stadium IIA	T1b, T2	N0	M0
Stadium IIB	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IIIB	T1, T2, T3	N2	M0
Stadium IV	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Die niedrige Inzidenzrate des PeC trägt entscheidend zum fehlenden Krankheitsbewusstsein europäischer Männer bei. Dies führt häufig dazu, dass erste Anzeichen der Erkrankung übersehen werden und es zu einer späten Vorstellung des Patienten beim Arzt kommt. Zu

---

diesem Zeitpunkt ist das PeC klinisch meist gut sichtbar und präsentiert sich dann häufig als tumorale Raumforderung am *Glans penis* (35-48%), dem inneren Vorhautblatt (13-21%) oder seltener am Schaft (2%) (27, 28). Je nach Subtyp kann es allerdings zu unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern des PeC kommen (3).

In der klinischen Diagnostik können neben der gründlichen Inspektion und Palpation zunächst die Sonographie sowie die Magnetresonanztomographie (MRT) nach artifizieller Erektion für eine Beurteilung der Tiefeninfiltration des Tumors Anwendung finden (29, 30). Bei klinischem Verdacht auf ein PeC sollte weiterhin eine möglichst frühzeitige histologische Diagnosesicherung mittels Biopsie erfolgen (26). Neben der Beurteilung des Primärtumors spielt die Feststellung des Lymphknotenstatus als wichtiger Prognosefaktor eine große Rolle in der Diagnostik (31-33). Die lymphogene Metastasierung des PeC verläuft entsprechend den anatomischen Gegebenheiten zunächst ohne Seitenpräferenz nach inguinal, anschließend nach ipsilateral pelvin und dann retroperitoneal entlang der großen Gefäße (26). Eine Palpation der Leisten ist deswegen Bestandteil der klinischen Diagnostik. Aufgrund von okkulten Metastasen in einem Viertel der Fälle von klinisch unauffälligen Lymphknoten wird weiterhin stadienabhängig eine invasiv-operative Lymphknotendiagnostik in Betracht gezogen. Sind die Lymphknoten tastbar vergrößert, ist die Wahrscheinlichkeit für manifeste Lymphknotenmetastasen sehr hoch und eine Lymphadenektomie mit histologischer Diagnosesicherung indiziert.

Das PeC führt meist erst spät und in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu Fernmetastasen. Diese treten dann in Form von retroperitonealen bzw. mediastinalen Lymphknoten-, Lungen-, Leber- und Knochenmetastasen auf. Zur Diagnose von Fernmetastasen werden Schnittbildverfahren, wie beispielweise das PET-CT, verwendet.

Das frühzeitige Erkennen und die rechtzeitige Therapie spielen beim PeC eine große Rolle, da sich mit Fortschreiten des Karzinoms die Prognose dramatisch verschlechtert (34). Bei Diagnose eines lokalisierten PeC beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate etwa 90% (35). Liegen bilaterale oder pelvine Lymphknotenmetastasen vor (N2 oder N3), sinkt das Gesamtüberleben auf 10-20% und liegt bei extranodaler Ausbreitung unter 10%.

### 2.1.2 Therapie

Die Therapie des PeC erfolgt in Abhängigkeit vom Stadium. Die Wahl der Therapie hängt weiterhin von Faktoren wie Tumorgöße, Grading, histologischem Subtyp, Lokalisation, Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie der Patientenpräferenz ab (2, 3, 6, 26, 36).

Im Stadium 0 (Tis-Ta, N0, M0) ist der Tumor nicht invasiv und auf das Epithel begrenzt. Eine Therapie kann in diesem Fall aus einer lokalen Exzision bestehen, wobei bei auf die Vorhaut beschränkten Tumoren eine Zirkumzision ausreichend sein kann. Zur Behandlung eines

---

*Carcinoma in situ* kann weiterhin eine chirurgische Deepithelialisierung der Glans durchgeführt werden („*glans resurfacing*“). Neben der invasiven Therapie ist eine topische Chemotherapie mit 5-FU oder Imiquimod sowie die Anwendung von Lasersystemen (CO<sub>2</sub>-Laser, Nd:YAG-Laser) zur Ablation oberflächlicher Karzinome möglich. PeC im Stadium I (T1a, N0, M0) infiltrieren das Stroma, weisen allerdings keine Merkmale auf, die auf ein erhöhtes Risiko für eine Metastasierung schließen lassen. Je nach Ausdehnung und Lokalisation des Tumors ist eine lokale Exstirpation, eine Lasertherapie, die partielle Glansekтомie, die totale Glansekтомie mit Rekonstruktion oder die Penisteilamputation möglich. Als organerhaltende Alternative steht die lokale Strahlentherapie in Form einer perkutanen Strahlentherapie oder Brachytherapie zur Verfügung. Patienten mit PeC, die dem Stadium II (T1b-T3, N0, M0) zugeordnet werden, weisen zwar noch keine tastbaren Lymphknoten auf, haben aber, durch Merkmale wie eine lymphovaskuläre oder perineurale Invasion oder aber einen niedrigen Differenzierungsgrad des Tumors, ein erhöhtes Risiko für okkulte Mikrometastasen in den Lymphknoten. Aus diesem Grund wird in diesem Stadium zusätzlich zu der operativen Therapie des Primärtumors eine invasiv-operative Lymphknotendiagnostik in Form einer modifizierten inguinalen Lymphadenektomie (MIL) oder einer Sentinel Lymphknotendiagnostik (DSNB) durchgeführt. Im Stadium IIB sollte eine Penisteilamputation oder eine radikale Penektomie mit Anlage einer Boutonniere durchgeführt werden. Alternativ kann eine lokale Strahlentherapie angewandt werden. Patienten mit einem PeC des Stadiums III weisen inguinale Lymphknotenmetastasen ohne extranodale Ausbreitung auf. Nach histologischer oder zytologischer Sicherung werden diese durch eine radikale inguinale Lymphadenektomie, gegebenenfalls kombiniert mit einer ipsilateralen pelvinen Lymphknotenentfernung, behandelt. Ab einer Einstufung von pN2/pN3 kann zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie bestehend aus 4 Zyklen Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel erfolgen. Bei aggressiven Tumoren ( $\geq G2$ ) und/oder Lymphknotenmetastasen mit einer Größe von mehr als 3 cm kann eine Chemotherapie schon bei einem pN1-Status indiziert sein. Tumore des Stadiums IV (T4 und/oder N3 und/oder M1) sind charakterisiert durch ein lokales Wachstum in umgebende Strukturen, fortgeschrittene Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen. Die Prognose in diesem Stadium ist schlecht und eine kurative Therapie ist, wenn überhaupt, nur mittels eines multimodalen Ansatzes möglich.

#### 2.1.2.1 Chemotherapie als Standard der systemischen Therapie

Erkenntnisse über die systemische Therapie bei Patienten mit PeC sind begrenzt, da es an randomisierten Studien mangelt (3, 26). Weiterhin stammen die vorhandenen Daten aus kleinen Studien mit bis zu 40 Patienten, da es aufgrund der niedrigen Inzidenz der Karzinomart schwierig ist, eine ausreichende Anzahl an Patienten für Studien zu gewinnen (37). Angelehnt an retrospektive Daten wird dennoch angesichts der schlechten Prognose von Patienten mit Hochrisikoprofilen eine zytostatische Therapie empfohlen.

---

Nachdem erste Versuche mit unterschiedlichen Chemotherapeutika als Einzel- sowie als Kombinationstherapie keine Erfolge gezeigt hatten (37-45), untersuchten Pizzocaro et al. die Wirksamkeit der Kombination aus 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel und konnten ein Ansprechen bei 5 von 6 untersuchten Patienten mit moderaten Nebenwirkungen feststellen (46). In einer weiteren Studie mit 19 Patienten erfolgte ebenfalls die Therapie mit einem Taxan, 5-FU und Cisplatin, wobei das krankheitsfreie Überleben nach einer medianen Beobachtungsdauer von 42 Monaten bei 52,6% lag (47). In zwei weiteren Studien konnte eine Wirksamkeit der Kombination aus Paclitaxel, Cisplatin und Ifosfamid bei der Therapie des PeC aufgezeigt werden (4, 48).

Aufgrund der aktuellen Datenlage empfiehlt die S3-Leitlinie bei adjuvanter und neoadjuvanter Indikation zurzeit eine Polychemotherapie bestehend aus 4 Zyklen Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU (26). Als Alternative kann statt 5-FU auch Ifosfamid angewendet werden.

Das Zytostatikum Cisplatin gehört zu der Gruppe der Platin-Komplex-Bildner und wird in einem weiten Spektrum von Krebsarten, darunter Hoden-, Ovarien-, Kopf- und Hals-, Kolorektal-, Harnblasen- und Lungenkrebs, appliziert (49-52). Seine zytostatische Wirkung entfaltet es insbesondere durch die Bildung von Querverknüpfungen zwischen Guanin-Basen innerhalb eines DNA-Stranges (*Intrastrand Crosslinks*) oder zwischen benachbarten DNA-Strängen (*Interstrand Crosslinks*) (53). Hierdurch wird die DNA-Reparatur (*DNA Damage Repair*, DDR) aktiviert und die Induktion der mitochondrialen Apoptose gefördert (54, 55). Je nach Ausmaß der Schädigung bewirkt Cisplatin dabei einen Arrest in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus oder die Zellen werden in den Zelltod (meist apoptotisch) getrieben (56). Als unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie mit Cisplatin werden Erbrechen, Nephrotoxizität, Neurotoxizität und Ototoxizität aufgeführt (57, 58). Neben Cisplatin ist auch 5-FU ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum, welches insbesondere in der Behandlung vom kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle spielt, aber auch bei anderen Krebsarten, wie dem Mammakarzinom und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich, eingesetzt wird. 5-FU weist eine ähnliche Struktur wie die Pyrimidinmoleküle auf und kann anstelle von Uracil und Thymin in die RNA oder DNA eingebaut werden (59). Seine größte Wirkung entfaltet es über die Inhibition der Thymidilat-Synthase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese (59, 60). Hierdurch wird die Bildung des DNA-Bausteins Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) verhindert. Da dieser für die DNA-Reparatur und -Replikation unerlässlich ist, kommt es so zur Hemmung des Zellwachstums. Neben den für Zytostatika typischen Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Schleimhaut- und Knochenmarksschädigung, wird in Zusammenhang mit der Therapie mit 5-FU über kardio- und neurotoxische Wirkungen berichtet (61-66). Das zusätzlich verwendete Taxan Paclitaxel findet ebenfalls in der Therapie anderer Karzinomarten, wie beispielsweise beim Ovarial-, Mamma- und Bronchialkarzinom, Anwendung (67-69). Paclitaxel gehört zu den Mikrotubuli-Inhibitoren (Spindelgifte) und verhindert als solcher den Abbau der aus Mikrotubuli

---

aufgebauten Spindelfasern (70-74). Hierzu bindet Paclitaxel an das  $\beta$ -Tubulin und fördert so die Polymerisation von Tubulin. Die dann in Gegenwart von Paclitaxel gebildeten Mikrotubuli sind außerordentlich stabil und dysfunktional, sodass die normale Tubulindynamik gestört und die Zellteilung gehemmt wird. Durch die Phasenspezifität der Mikrotubuli-Inhibitoren kommt es hierdurch zu einem Arrest in der G2- und M-Phase des Zellzyklus und/oder zum Zelltod. Unter der Therapie mit Paclitaxel können die für Zytostatika typischen unerwünschten Wirkungen, wie Alopezie, auftreten (68). Als wichtigste dosislimitierende Nebenwirkungen werden die Leukopenie (Neutropenie) und die periphere Neuropathie beschrieben, während andere hämatologische Toxizitäten sowie die Kardiotoxizität eher weniger ausgeprägt zu sein scheinen.

Bei den von der S3-Leitlinie empfohlenen cisplatinbasierten Chemotherapien ist zu beachten, dass es schnell zu einer Resistenzentwicklung gegenüber diesen kommt. Das hat zur Folge, dass sie lediglich eine Ansprechrate von 15-55% aufweisen und das progressionsfreie Überleben bei 20 Wochen liegt (2, 4-6). Patienten, deren PeC während oder nach der cisplatinbasierten Chemotherapie fortschreitet, haben unter uneinheitlichen und nicht allgemein etablierten Zweitlinienprotokollen ein medianes Gesamtüberleben von unter 6 Monaten (75). Es steht somit zurzeit weder in der Erst- noch in der Zweitlinientherapie eine wirklich wirksame Behandlung für das fortgeschrittene PeC zur Verfügung. Die Entwicklung neuer und effektiver Therapieoptionen ist daher dringend erforderlich.

## **2.2 Die BRCA-Mutation und PARP-Inhibitoren**

### **2.2.1 Mutationen in den BRCA-Genen**

Für das PeC stehen bisher nur wenige Daten über die Rolle molekularer Biomarker zur Verfügung, die Aufschluss über die Prognose geben oder die Auswahl der Patienten für spezifische therapeutische Ansätze ermöglichen könnten (76). Eine Infektion mit HPV stellt zurzeit den wichtigsten Biomarker dar, wobei HPV-positive PeC mit einer besseren Prognose und einem indolenteren klinischen Verlauf einherzugehen scheinen und die präventive oder therapeutische Impfung gegen HPV als nützliche Ergänzung der Behandlungsstrategien zu sehen ist (77). Weitere mögliche Angriffspunkte für gezieltere Therapien wurden bereits in Untersuchungen des Genoms vom fortgeschrittenen PeC gefunden (7). Aus den Daten konnte geschlossen werden, dass mehr als ein Viertel der Patienten mit metastasiertem PeC von bereits verfügbaren Therapien, die auf mTOR-, DNA-Reparatur- und Tyrosinkinasewege abzielen, profitieren könnten. Zu den Veränderungen, die Einfluss auf die DNA-Reparatur nehmen, gehören auch Mutationen in den BRCA-Genen. Bei den BRCA-Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene (78). Die exprimierten Proteine sorgen somit in gesunden Zellen für die Aufrechterhaltung einer ordnungsgemäßen DNA-Reparatur und Zellteilung und

---

unterdrücken so die Tumorentstehung. Mutationen im Bereich solcher Gene können allerdings zum Funktionsverlust der Proteine und damit zur Krebsentstehung beitragen. Es werden somatische Mutationen, also im Laufe der Zeit in einer Körperzelle entstandene, von vererbten Mutationen in den Keimzellen (Keimbahnmutationen) unterschieden (79). Die Keimbahnmutationen werden autosomal dominant vererbt und führen bei Frauen zu einem hohen Lebenszeitrisiko, ein Mamma- oder Ovarialkarzinom zu entwickeln (79, 80). Das Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, liegt dabei bei 60-80%, ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, bei 20-30% (81). Insgesamt machen die BRCA1/2-Mutationen nur einen geringen Teil aller Brustkrebsfälle aus, allerdings wurde festgestellt, dass zwischen 50% und 70% der sporadisch auftretenden Tumore mindestens ein BRCA1-Allel verloren haben, was darauf hindeuten könnte, dass der Verlust von BRCA1 auch für die sporadische Entwicklung von Mammakarzinomen von Bedeutung ist (82). Darüber hinaus konnte auch eine Hypermethylierung des BRCA1-Promotors bei einem erheblichen Teil der sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinome festgestellt werden (83). Von einer Keimbahnmutation betroffene Frauen sind meist heterozygote Träger des Gens, das heißt es ist nur eines der zwei Allele des BRCA1- oder BRCA2-Gens mutiert. Das eine Allel scheint dabei zunächst die Schutzwirkung aufrechtzuerhalten und es kommt erst nach einem zusätzlichen Funktionsverlust des zweiten Allels zur Krebsentstehung. Diese Hypothese wird als „second-hit“-Theorie bezeichnet. In diesem Modell kann der „zweite Treffer“ durch eine Punktmutation, einen somatischen Verlust des Allels oder auch durch eine epigenetische Stilllegung des Gens erfolgen (84). Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass schon Mutationen in einem Allel der BRCA-Gene ausreichen könnten, um die Tumorgenese zu initiieren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es zu einem teilweisen Funktionsverlust oder einer Störung der Funktion des nicht mutierten Allelprodukts durch das mutierte Protein kommt. Weiterhin scheinen heterozygote BRCA-Mutationen die Entstehung von Tumoren zu fördern, indem sie die Reaktionen auf Strahlung, Hormone und andere Stimuli verändern und so eine genomische Instabilität verursachen, unter anderem, indem sie mit Veränderungen in anderen kritischen Genen einhergehen.

### 2.2.2 Die Bedeutung von BRCA1 für die DNA-Reparatur

Das BRCA1-Gen war das erste Gen, das mit einer erhöhten Anfälligkeit für Brustkrebs in Verbindung gebracht werden konnte (85). Das BRCA1-Protein hat Funktionen in mehreren zellulären Prozessen, die für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität verantwortlich sind, darunter die Signalisierung von DNA-Schäden, die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulierung, die Ubiquitinierung von Proteinen, der Chromatiumbau, die Transkriptionsregulierung, das mRNA-Spleißen und die Apoptose-Induktion (86). Die genaue Rolle von BRCA1 in den meisten Prozessen ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings geht man davon aus, dass es die vielfältigen Aufgaben durch seine Fähigkeit zur Interaktion mit

---

einer Vielzahl von Proteinen erfüllt. Dabei fungiert BRCA1 durch seine Interaktionen als Gerüst für die Bildung verschiedener Proteinkomplexe mit unterschiedlichen zellulären Funktionen. Als Angriffspunkt für Therapien ist insbesondere seine Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wichtig.

DNA-Schäden können ständig durch endogene und exogene Einflüsse entstehen, sodass die Zellen eine koordinierte DDR, bestehend aus verschiedenen voneinander abhängigen Signalwegen, entwickelt haben (86). Es kann zu Einzelstrangbrüchen (SSB), Doppelstrangbrüchen (DSB) und Fehlpaarungen oder Modifikationen der Basen kommen. Die gefährlichste Art der DNA-Schäden stellen dabei die DSB dar. Es besteht hierbei die Gefahr, dass die gebrochenen DNA-Enden sich auflösen und dass es zur Vereinigung von nicht zusammengehörigen Enden kommt, was zu einem Verlust oder einer Veränderung der genetischen Information führen kann. Weiterhin ist die Reparatur solcher Schäden besonders schwierig. Die Hauptwege, die hierfür zur Verfügung stehen, sind die Nichthomologe-Endverknüpfung (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). NHEJ ist die häufigste Form der DSB-Reparatur. Die beschädigten Enden des DNA-Stranges werden hierbei nach begrenzter Bearbeitung direkt zusammengefügt. Die NHEJ gilt insgesamt als fehleranfällig. HR ist hingegen ein fehlerfreier Reparaturmechanismus für DSB. Hierbei erfolgt eine Reparatur unter Verwendung der Schwesterchromatiden als Vorlage, daher kann sie lediglich in sich teilenden Zellen stattfinden.

Das Protein BRCA1 ist sowohl an der HR als auch an der NHEJ beteiligt, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Für die NHEJ ist dabei immer noch umstritten, ob und in welcher Form BRCA1 eine Rolle spielt, da verschiedene Studien hierzu widersprüchliche Ergebnisse aufzeigen (87-94). Im Gegensatz dazu wurden für die HR bereits zahlreiche Funktionen von BRCA1 beschrieben (95-99). Insgesamt ist durch eine Mutation im BRCA1-Gen, die die Funktion des exprimierten Proteins einschränkt, von einem Defekt in der Reparatur durch HR auszugehen, wobei die Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

### 2.2.3 Gezielte Therapie BRCA-mutierter Tumore mittels PARP-Inhibition

Der Defekt in der DNA-Reparatur von DSB kann genutzt werden, um BRCA-mutierte Tumore innerhalb der Therapie gezielt anzugreifen. Die PARP-Inhibition stellt hierbei eine Möglichkeit dar. Die PARP-Familie besteht aus 17 Mitgliedern, von denen insbesondere PARP1 und PARP2 anerkannte Sensoren und Signalübermittler der DDR sind. Die Hauptaufgabe dieser Proteine ist das Erkennen von SSB und DSB, die Rekrutierung der DNA-Reparaturmaschinerie und die Stabilisierung der Replikationsgabel während der DNA-Reparatur (100). Durch eine Inhibition von PARP können SSB nicht wie gehabt repariert werden, so dass es in der Folge zur Anhäufung von SSB und damit zum erhöhten Risiko von DSB kommt, die dann ebenfalls nicht mehr repariert werden können (101). Weiterhin wird

---

PARP1 durch einige PARP-Inhibitoren auf der DNA „eingefangen“ (*PARP trapping*), so die Freisetzung von PARP1 an der Schadensstelle der DNA verhindert und darüber die Funktion von PARP1 gestört (102-104).

Im Jahr 2005 wurde von zwei Forschungsgruppen die Sensibilität von BRCA-Mutationen gegenüber einer PARP-Inhibition entdeckt, welche diese als neue Strategie für die Behandlung BRCA-mutierter Tumore nahe legte (101, 105). Wie oben beschrieben, führt eine PARP-Inhibition zur Entstehung von DSB, die unter normalen Umständen durch die HR repariert werden (11). Liegt ein Defekt in diesem Reparaturweg vor, wie es bei einer BRCA-Mutationen der Fall ist, ist dies jedoch nicht möglich, sodass schließlich weder die Einzel- noch die Doppelstrangbrüche adäquat repariert werden können (106). Dies führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität und schließlich zur Apoptose der Tumorzelle. Das Konzept, dass der Defekt in einem von zwei Genen oder Proteinen kaum Auswirkungen auf die Zelle hat, Defekte in beiden Genen oder Proteinen allerdings zum Zelltod führen, wird als synthetische Letalität bezeichnet (107).

Aufgrund der Erfolge von PARP-Inhibitoren in den präklinischen Studien, wurden mehrere klinische Studien unter Verwendung der Inhibitoren als Monotherapie für Patienten mit Keimbahnmutationen im BRCA1/2-Gen bei fortgeschrittenem Brustkrebs, Eierstockkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Prostatakrebs durchgeführt, wobei signifikante antitumorale Wirkungen nachgewiesen werden konnten (108-111). Dabei zeigten die PARP-Inhibitoren ein insgesamt günstiges Sicherheitsprofil, wobei zu den festgestellten Toxizitäten Myelosuppression, gastrointestinale Symptome und Müdigkeit gehörten (112). Diese Studien führten zur Zulassung mehrerer PARP-Inhibitoren für diverse Krebsformen durch die European Medicines Agency (EMA) und die U.S. Food and Drug Administration (FDA). Der PARP-Inhibitor Olaparib läuft unter dem Handelsnamen Lynparza und ist bereits von der EMA für die Behandlung von fortgeschrittenem Krebs der Ovarien, der Eileiter, des Peritoneums, der Brust, des Pankreas und der Prostata zugelassen. Die Anwendung von Olaparib ist dabei an mehrere Voraussetzungen gebunden, die sich je nach Krebsart unterscheiden. So muss eine Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen oder ein anderer Defekt in der DNA-Reparatur durch HR vorliegen. Von der FDA wurde Olaparib jedoch auch unabhängig vom BRCA1/2-Mutationsstatus für die Erhaltungstherapie von Eierstockkrebs zugelassen, da entsprechende klinische Studien zeigen konnten, dass auch Patienten ohne BRCA-Mutation von dieser Therapie profitieren (113-116).

Insgesamt deuten die erfolgreichen Anwendungen in der Behandlung anderer Krebsarten darauf hin, dass auch Patienten mit PeC von einer Olaparib-Behandlung profitieren könnten, wobei sich auch hier die Frage stellt, ob dies vom BRCA-Mutationsstatus abhängig ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Tabelle 3: verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Absaugsystem VACUSAFE</b>	158320	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
<b>Analysenwaage</b>	90040730	Sartorius	Göttingen, Deutschland
<b>Axiocam 503 color</b>	503 color	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
<b>Axiocam 503 mono</b>	503 mono	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
<b>Axiocam ICm1</b>	ICm1	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
<b>BD FACS Flow Supply System</b>	649908	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>BD LSR Fortessa X-20 Durchflusszytometer</b>	657669 (Special Order)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>CO<sub>2</sub> Inkubator Heracell 150</b>	90009142	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Finnpipette F2 0.2 bis 2 µL</b>	4642010	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Finnpipette F2 1 bis 10 µL</b>	4642030	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Finnpipette F2 10 bis 100 µL</b>	46642070	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Finnpipette F2 100 bis 1000 µL</b>	4642090	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

<b>Gerät</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Finnpipette F2 2 bis 20 µL</b>	4642050	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Finnpipette F2 20 bis 200 µL</b>	4642080	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Sicherheitswerkbank Maxisafe 2030i</b>	42503091	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Inverses Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1</b>	491915-0001-000	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
<b>Inverses Mikroskop AE2000 Binocular</b>	630-1316	Motic Deutschland GmbH	Wetzlar, Deutschland
<b>Mikroskop Axiovert 40 CFL</b>	491202-0002-001	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
<b>Mikrozentrifuge, Hereaus Fresco 21</b>	75002425	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Pipettierhilfe accu-jet® pro</b>	26301	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
<b>Plattenlesegerät Tecan US Inc. Spark 10M</b>	30086375	Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
<b>Sapphire Biomolecular Imager</b>	IS1026	Azure Biosystems	Dublin, California, USA
<b>ThermoCell MixingBlock</b>	MB-102 (MB-101)	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.	Hangzhou, China
<b>Vibrationsmischer/ Vortex</b>	RS-VA 10	Phönix Instruments	Garbsen, Deutschland
<b>Wasserbad Precision GP28</b>	15315867	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Zellzähler, LUNA™ Automated Cell Counter</b>	L10001	Logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich

<b>Gerät</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Zentrifuge, Megafuge® 1.0R</b>	75003060/02	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Zentrifuge, Megafuge® 16R</b>	521-2065	Heraeus	Hanau, Deutschland
<b>Kugel-Magnet 5 mm</b>	B5 Magnetkugel	Brudazon UG	Hamm, Deutschland
<b>Mini Scheiben-Magnet 1x1 mm</b>	S1x1 mini Scheibenmagnet	Brudazon UG	Hamm, Deutschland

### 3.1.2 Programme

Tabelle 4: verwendete Programme

<b>Name</b>	<b>Version</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>AzureCapture</b>	1.1.0315.0	Azure Biosystems	Dublin, Californien, USA
<b>AzureSpot</b>	2.0.062	Azure Biosystems	Dublin, Californien, USA
<b>BD FACSDiva™</b>	8.0.2	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>CompuSyn</b>	1.0	ComboSyn Incorporated	Paramus, New Jersey, USA
<b>Endnote</b>	20.2.1.15749.	Thomson Reuters	Toronto, Kanada
<b>FlowJo</b>	10.5.3.	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>GraphPad Prism</b>	7.04.	GraphPad Software, Inc.	San Diego, Californien, USA
<b>ImageJ</b>	1.48 v	Wayne Rasband / National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
<b>Magellan</b>	V 2.2	Tecan Trading AG	Männedorf, Schweiz
<b>Office Professional Plus 2010</b>	14.0.7237.5000	Microsoft Corporation	Seattle, Washington, USA

<b>Name</b>	<b>Version</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Zen</b>	2.3.	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Cell Counting Slides</b>	L12001	Logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
<b>Einmal-Pinzette, steril</b>	8124658	Centramed Medizintechnik Beteiligungs GmbH	Koblenz, Deutschland
<b>FACS-Röhrchen, Falcon® Round-Bottom Tubes, Polystyrene, Corning®, Volume = 5 mL, Cap</b>	352054	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
<b>Feuchttuch, Schülke wipes</b>	119541	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
<b>Filtereinheit, 0,20 µm, hydrophobes PTFE, 25 mm</b>	SLFG025LS	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
<b>FluoroBlok™ Insert 8.0 µm pore size 24 well format</b>	351152	Corning ® Inc.	Corning, New York, USA
<b>Mikrotiterplatte Zellkultur, 96-Well, transparent, Flachboden, steril</b>	833924005	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
<b>Multititerplatte Zellkultur, 12-Well, transparent, Flachboden, steril</b>	665180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich

<b>Produkt</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Multititerplatte Zellkultur, 24-Well, transparent, Flachboden, steril</b>	662160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
<b>Multititerplatte, 24- Well, Companion Plate mit Membraneinsätzen</b>	353504	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
<b>Pasteurpipetten 2ml, L: 230mm, Glas</b>	612-1702	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
<b>Pasteurpipetten graduirt 3 ml, unsteril, 155 mm</b>	EA65.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
<b>Pipettenspitze 10 µl SurPhob mit Filter, steril</b>	VT0200	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 10 µl SurPhob extra lang, unsteril</b>	VT0103	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 100 µl SurPhob mit Filter, steril</b>	VT0230	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 1250 µl SurPhob mit Filter, steril</b>	VT0270	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 1250 µl SurPhob extra lang, unsteril</b>	VT0173	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 20 µl SurPhob mit Filter, steril</b>	VT0220	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Pipettenspitze 200 µl SurPhob mit Filter, steril</b>	VT0240	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Pipettenspitze 200 µl SurPhob extra lang, unsteril</b>	VT014 3	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml</b>	30121023	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml</b>	30120086	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
<b>Serologische Pipette mit Filter, steril 5 ml</b>	606180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
<b>Serologische Pipette mit Filter, steril 10 ml</b>	607180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
<b>Serologische Pipette mit Filter, steril 25 ml</b>	760180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
<b>Serologische Pipette mit Filter, steril 50 ml</b>	768180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
<b>Spritze 10 ml exzentrisch</b>	309110	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>StarGuard Protect Nitril Handschuhe M</b>	SG-P-M	STARLAB INTERNATIONAL GmbH	Hamburg, Deutschland
<b>Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup></b>	833910002	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
<b>Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup> Cell+</b>	833910302	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland

Produkt	Produkt-Nr.	Firma	Firmensitz
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	833911002	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> Cell+	833911302	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	188271	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich

### 3.1.4 Reagenzien

Tabelle 6: verwendete Reagenzien

Produkt	Produkt-Nr.	Firma	Firmensitz
Accutase® solution	A6964	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic (100 x)	15240062	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Aqua dest., Ampuwa (H <sub>2</sub> O)	7151-5	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland
BrdU-5-Bromo-2'-desoxyuridine	B5002-250MG	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	A2153-100G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
CellTracker Green CMFDA Dye, Molecular Probes	C7025	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Cisplatin	51831786	Selleck Chemicals LLC	Houston, Texas, USA
Coomassie Brilliant Blau G 250	9598.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumtetra Decahydrat			
DMSO, Dimethylsulfoxid	D8418	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>EpiCGS (Epithelial Cell Growth Supplement)</b>	4152	Sciencell	Carlsbad, Kalifornien, USA
<b>EpiCM (Epithelial Cell Medium)</b>	4101	Sciencell	Carlsbad, Kalifornien, USA
<b>Essigsäure (100%)</b>	3738.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
<b>Ethanol absolut</b>	A3678	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
<b>FCS, Fetales Kälberserum (Gibco®)</b>	10500-064	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>5-Fluorouracil</b>	F 6627	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>Glutamax I Supplement</b>	35050-038	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>Glutaraldehyd - Lösung</b>	G6257-1L	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>Iscove Basal Medium (500 ml)</b>	F 0465	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
<b>Methanol</b>	1060081000	Merck KgaA	Darmstadt, Deutschland
<b>MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid</b>	M2128-5G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>Nuklease free water UltraPure Distilled Water (Rnase/Rnase free)</b>	10977-035	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
<b>Olaparib</b>	AZD2281	Selleck Chemicals LLC	Houston, Texas, USA

<b>Produkt</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Paclitaxel</b>	NSC 125973	Selleck Chemicals LLC	Houston, Texas, USA
<b>PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub></b>	D8662-500ML	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung ohne MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub></b>	14190-094	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
<b>P/S Solution (Penicillin/Streptomycin Solution)</b>	0503	Sciencell	Carlsbad, Kalifornien, USA
<b>PI (Propidium Iodid)</b>	P1304MP	Molecular Probes	Eugene, USA
<b>RNase A</b>	R5125-25MG	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>Salzsäure HCl (1 N)</b>	K025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
<b>Salzsäure HCl (5 M)</b>	1,821,091,211	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
<b>SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)</b>	1610302	Bio-Rad Laboratories	Hercules, Kalifornien, USA
<b>terralin® liquid</b>	102001	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
<b>terralin® protect</b>	181604	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
<b>Triton X-100</b>	A4975,0100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
<b>Trypanblau (0,4%)</b>	T8154-100ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<b>Trypsin EDTA (0,25%)</b>	T4049	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

### 3.1.5 Kits

Tabelle 7: verwendete Kits

Name	Produkt-Nr.	Firma	Firmensitz
<b>BrdU Cell Proliferation Kit</b>	QIA58	Merck KgaA	Darmstadt, Deutschland
<b>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I</b>	556547	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA

### 3.1.6 Zelllinien

#### 3.1.6.1 PeC3

Die humane PeC-Zelllinie UKF-PeC3 (PeC3) stammt aus einem Patientenisolat, welches von der Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt wurde. Histopathologische Untersuchungen führten zu der folgenden Einstufung: pT3 pN0 L0 G2 R0 (siehe hierzu Tabelle 1, R0: kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar). Die Tumorprobe wurde positiv auf den high risk HPV DNA (hrHPV DNA) Subtyp 16 getestet. Im Rahmen der Exom-Sequenzierung wurde eine heterozygote Frameshift-Mutation (Glu23Valfx16) im BRCA1-Gen festgestellt. Diese Frameshift-Mutation führte zur Entstehung eines Stopcodons durch vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette und somit zur Bildung eines funktionsunfähigen Proteins.

#### 3.1.6.2 PeC4

Die humane PeC-Zelllinie UKF-PeC4 (PeC4) stammt aus einem Patientenisolat, welches von der Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt wurde. Histopathologische Untersuchungen führten zu der folgenden Einstufung: pT2 pN1 (1/27) L0 V0 PN0 G2 R0 (siehe Abschnitt 3.1.6.1). Die Probe wurde negativ auf hrHPV DNA getestet. Im Rahmen der Exom-Sequenzierung wurde in dieser Zelllinie ein Wildtyp (nicht mutiertes) BRCA1-Gen festgestellt.

## 3.2 **Methoden**

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Verhältnissen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die Kultivierung der Zelllinie PeC3 erfolgte mit dem Iscove's modifizierten Dulbecco's Medium

---

(IMDM). Dieses basiert auf Dulbeccos's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukosegehalt und enthält neben zusätzlichen Aminosäuren und Vitaminen auch Selen, HEPES-Puffer und statt Eisen Kalium in Form von Kaliumnitrat. IMDM beinhaltet ein Natriumbicarbonat-Puffersystem und erhält den physiologischen pH-Wert in einer 5-10%igen CO<sub>2</sub>-Umgebung. Das Medium enthält keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren und wurde deswegen mit 10% fötalem Rinderserum (FCS) versetzt. Weiterhin wurden 2% Glutamax und 1% Antibiotika-Antimykotikum (Anti-Anti) hinzugefügt.

Die Zelllinie PeC4 wurde im epithelialen Zellmedium (EpiCM) kultiviert. Dieses wurde mit einer epithelialen Zellwachstums-Ergänzung (EpiCGS), einer Penicillin- und Streptomycin-enthaltenden Kochsalzlösung (P/S solution) sowie 10% FCS komplementiert. In der ergänzten Form enthielt das Medium gesättigte und ungesättigte Aminosäuren, Vitamine, organische und anorganische Verbindungen, Hormone, Wachstumsfaktoren und Spurenelemente. Das Medium beinhaltet einen HEPES- und Bikarbonatpuffer.

### 3.2.2 Umsetzen von Tumorzellen zur Zellvermehrung - Zellpassagierung

Um eine ausreichende Nährstoffzufuhr und ein ausreichendes Platzangebot für die Tumorzellen zu sichern, ist eine regelmäßige Passagierung der Zellen notwendig. Hierzu wurde zunächst die Konfluenz der Zellen in der Zellkulturflasche unter dem Mikroskop beurteilt. Eine Zellpassagierung wurde bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90% durchgeführt. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium abgesaugt. Um Mediums- und Zellreste zu entfernen, wurde der Zellrasen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS<sup>-</sup>) gewaschen. Anschließend wurden, je nach Größe der Zellkulturflasche, 0,5-2 ml Trypsin hinzugegeben und für 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Trypsin ist eine Serinprotease, die durch ihre stark Protein-spaltende Wirkung die adhärenen Zellen vom Flaschenboden ablöst. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von Nährmedium gestoppt. Das Gemisch wurde anschließend homogenisiert und die Zellsuspension in einer neuen Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium in einem Verhältnis von 1:6-1:12 ausgesät. Die Kultivierung erfolgte anschließend im Inkubator.

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des Zellzählers (Luna™ *Automated Cell Counters*). Dies geschah unter Verwendung des anionischen Azonfarbstoffes Trypanblau, der an Zellproteine bindet. Trypanblau ist nicht membrangängig und färbt daher nur tote Zellen. Somit erscheinen tote Zellen nach der Färbung dunkelblau, wohingegen vitale Zellen ungefärbt bleiben. Zur Anwendung des Verfahrens wurden die Zellen nach einem Waschgang mit PBS<sup>-</sup> durch Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Nachdem das Trypsin mit Nährmedium abgestoppt wurde, wurden die Zellsuspension und das Trypanblau im Verhältnis

---

1:1 gemischt und 10 µl dieser Mischung in eine Einmalzählkammer überführt. Der Zellzähler (Luna™ Automated Cell Counter) gab nach Insertion in die Zählkammer und dem Start des Zählvorgangs die Gesamtzellzahl und die Anzahl vitaler und toter Zellen in Zellen/ml an.

### 3.2.4 MTT-Zellviabilitätsassay - Tumorzellwachstum

Das Wachstumsverhalten und die optimale Dosis der Chemotherapeutika wurden mittels des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)-Zellviabilitätsassays ermittelt. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird dabei durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein wasserunlösliches blaues Formazan umgewandelt (117). Mithilfe eines Solubilisierungspuffers (99% 10%iges SDS, 1% 1N HCl) kann dieses wasserunlösliche Salz aus den Zellen gelöst und anschließend am Lesegerät (Tecan US Inc. Spark 10M) photometrisch gemessen werden. Die Umwandlung von MTT findet nur in vitalen Zellen statt und die Menge des produzierten Formazans ist proportional zur Anzahl vorhandener Zellen, sodass eine Aussage zur Anzahl stoffwechselaktiver Zellen und somit indirekt für das Zellwachstum durch das Assay möglich ist.

#### 3.2.4.1 Erstellen einer Standardkurve

Zu Beginn wurde jeweils eine Standardkurve für die Zelllinien PeC3 und PeC4 erstellt. Hierzu wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Anschließend wurden die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3) und die Zellkonzentration mit Nährmedium auf 1.600.000 Zellen/ml eingestellt. Es wurden nun 6 weitere Zentrifugenröhrchen vorbereitet und in diesen jeweils 0,5 ml Nährmedium vorgelegt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden 0,5 ml Zellen aus dem vorherigen Zentrifugenröhrchen in das nächste überführt. Von jeder Verdünnung wurden anschließend 100 µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert, wobei für jede Verdünnung ein 3-facher Ansatz erstellt wurde. In diesem Versuchsaufbau wurden somit 160.000, 80.000, 40.000, 20.000, 10.000, 5.000 und 2.500 Zellen pro Well ausgesät. Als Hintergrundkontrolle (Blank) wurde zudem ein 3-fach-Ansatz ausschließlich mit Nährmedium mitgeführt.

Zu jedem Well wurden 10 µl MTT hinzugegeben und die Platten dann bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurden 100 µl Solubilisierungspuffer pro Well hinzupipettiert. Die Platten wurden über Nacht im Inkubator gelagert und am nächsten Tag am Plattenlesegerät (Tecan US Inc. Spark 10M) bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenz 700 nm) gemessen. Die Formazanmenge wurde hierbei als optische Dichte angegeben, wobei durch die so erstellte Standardkurve eine Zuordnung der optischen Dichte zu einer Zellzahl der jeweiligen Zelllinie möglich war.

---

#### 3.2.4.2 Evaluation der optimalen Dosis und des Wachstums bei der Einzelbehandlung

Zunächst wurde der MTT-Test nach Behandlung der Zellen mit den Therapeutika Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel oder Olaparib allein durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach Kultivierung aus der Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3) und die Zellkonzentration mit Nährmedium auf 100.000 Zellen/ml eingestellt. Für jede Zelllinie und jedes Therapeutikum wurde jeweils eine 96-Well-Platte für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h ausgesät, wobei pro Well 50 µl (entspricht 5.000 Zellen) Zellsuspension pipettiert wurden. Die gewünschten Therapeutikakonzentrationen wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe angesetzt (doppelt konzentriert) und je 50 µl hinzupipettiert, wobei für jede Behandlungskonzentration Triplikate angefertigt wurden. Die dabei verwendeten Konzentrationen sind für PeC3 in Tabelle 8 und für PeC4 in Tabelle 9 aufgeführt. Die Platten wurden für 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden in jedes Well 10 µl MTT pipettiert. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem beim Erstellen der Standardkurve (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Mithilfe der zuvor erstellten Standardkurve (siehe Abschnitt 3.2.4.1) wurde die gemessene optische Dichte in eine Zellzahl umgerechnet. Für eine zeitkinetische Darstellung wurden die Daten einer Behandlungskonzentration auf die für 24 h bestimmte Zellzahl normalisiert. Weiterhin wurden die Daten eines Zeitpunktes für eine konzentrationskinetische Darstellung auf den zu diesem Zeitpunkt gemessenen Kontrollwert (unbehandelte Kontrolle) normalisiert. Beide Darstellungsformen wurden mithilfe von GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) graphisch wiedergegeben und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11). Für jedes Therapeutikum wurde jeweils für PeC3 und PeC4 die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>-Wert) bestimmt.

Tabelle 8: Übersicht über die im MTT-Test verwendeten Konzentrationen zur Behandlung der Zelllinie PeC3 mit Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel und Olaparib

Cisplatin	5-FU	Paclitaxel	Olaparib
0 µM	0 µM	0 nM	0 µM
0,33 µM	0,38 µM	0,39 nM	0,39 µM
0,66 µM	0,6 µM	0,78 nM	1,56 µM
1,29 µM	0,77 µM	1,56 nM	2,34 µM
1,97 µM	1,2 µM	2 nM	4,69 µM
3,9 µM	1,54 µM	3,13 nM	12,5 µM
5,2 µM	2,4 µM	4 nM	25 µM
10,43 µM	3,08 µM	5 nM	37,5 µM
15,63 µM	4,8 µM	6,25 nM	50 µM
20,83 µM	6,15 µM	7,81 nM	75 µM
31,26 µM	9,61 µM	10 nM	100 µM
41,66 µM	12,3 µM	12,5 nM	150 µM
62,49 µM	19,22 µM	15,63 nM	200 µM
83,32 µM	24,6 µM	25 nM	250 µM
	38,44 µM	50 nM	300 µM
	49,2 µM	100 nM	
	76,88 µM		
	98,4 µM		
	153,75 µM		
	307,5 µM		

Tabelle 9: Übersicht über die im MTT-Test verwendeten Konzentrationen zur Behandlung der Zelllinie PeC4 mit Cisplatin, 5-FU, Paclitaxel und Olaparib

Cisplatin	5-FU	Paclitaxel	Olaparib
0 µM	0 µM	0 nM	0 µM
0,39 µM	0,38 µM	1 nM	4,69 µM
0,52 µM	0,6 µM	1,5 nM	6,25 µM
0,78 µM	0,76 µM	5 nM	12,5 µM
1,04 µM	1,2 µM	7,5 nM	15 µM
1,56 µM	1,54 µM	10 nM	20 µM
2,08 µM	3,07 µM	12,5 nM	25 µM
3,13 µM	6,15 µM	25 nM	37,5 µM
4,17 µM	12,3 µM	50 nM	50 µM
6,25 µM	76,88 µM	100 nM	100 µM
8,33 µM	153,75 µM	200 nM	150 µM
12,5 µM	307,5 µM		200 µM
16,66 µM	615 µM		250 µM
25 µM	1.230,01 µM		300 µM
			400 µM

### 3.2.4.3 Evaluation der optimalen Dosis und des Wachstums bei der Kombination von zwei Therapeutika

Zunächst wurden jeweils zwei der Therapeutika Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel im MTT-Test

kombiniert, um die optimale Dosis bei Kombination zu bestimmen. Der Versuchsablauf entsprach dem bei Einzelbehandlung (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Für die Kombination aus zwei Stoffen wurden die Konzentrationen zunächst vierfach konzentriert angesetzt und jeweils 25 µl pro Well pipettiert. Das allgemeine Pipettierschema orientierte sich an den zuvor ermittelten IC50-Werten und wird in Tabelle 10 aufgeführt. Um eine möglichst optimale Kombination zu finden, wurde dieses Pipettierschema teilweise in einer abgeänderten Form angewendet. Mithilfe der von Ting-Chao Chou entwickelten Software CompuSyn (ComboSyn Incorporated) wurde die Wechselwirkung der Therapeutika quantitativ bestimmt (12). Hierzu wurde der Kombinationsindex (CI)-Wert errechnet, welcher angab, ob es sich um eine synergistische (CI<1), eine additive (CI=1) oder eine antagonistische (CI>1) Wechselwirkung handelte. Von jeder untersuchten Kombination aus zwei Stoffen wurde jeweils eine für die weiteren Untersuchungen zur Kombination von drei Therapeutika ausgewählt.

Tabelle 10: allgemeines Pipettierschema für die Kombination von zwei Therapeutika im MTT-Test

Therapeutikum 1	Therapeutikum 2	Kombination aus Therapeutikum 1 + 2
0 µM	0 µM	0 µM
0,25 x IC50	0,25 x IC50	0,25 x IC50 (1) + 0,25 x IC50 (2)
0,5 x IC50	0,5 x IC50	0,5 x IC50 (1) + 0,5 x IC50 (2)
IC50	IC50	IC50 (1) + IC50 (2)
2 x IC50	2 x IC50	2 x IC50 (1) + 2 x IC50 (2)
4 x IC50	4 x IC50	4 x IC50 (1) + 4 x IC50 (2)

#### 3.2.4.4 Evaluation der optimalen Dosis und des Wachstums bei der Kombination von drei Therapeutika

Zur Evaluation der optimalen Dosis bei der Kombination von drei Therapeutika wurde ebenfalls ein MTT-Test durchgeführt. Verwendet wurden hierbei die drei zuvor ausgewählten Kombinationen aus zwei Stoffen und mit aufsteigenden Konzentrationen des jeweils dritten Therapeutikums, die sich am IC50-Wert orientierten, kombiniert. Tabelle 11 zeigt das Pipettierschema bei dieser Versuchsreihe. Der Grundaufbau des Assays entsprach dem bei der Einzelbehandlung (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Der Versuchsablauf für die zum Vergleich heranzuziehenden Einzelbehandlungen und Zweierkombinationen war der gleiche wie unter Abschnitt 3.2.4.2 und 3.2.4.3 beschrieben. Für die Kombination aus drei Stoffen wurde die Zellzahl auf 200.000 Zellen/ml eingestellt und 25 µl (entspricht 5.000 Zellen) dieser Zellsuspension in die 96-Well-Platte pipettiert. Die drei Therapeutika wurden, wie auch unter Abschnitt 3.2.4.3 beschrieben, vierfach konzentriert angesetzt. Von diesen Ansätzen wurden jeweils 25 µl in jedes Well hinzugegeben. Zur Beurteilung der Kombinationseffekte wurden die Einzelbehandlungen und die ausgewählte Zweierkombination mithilfe des CI-Wertes mit der Dreierkombination verglichen. Nach Berechnung der CI-Werte wurde aus den in Frage

kommenden Kombinationen die synergistischste für die weiteren Versuche ausgewählt.

Tabelle 11: allgemeines Pipettierschema bei der Kombination von drei Therapeutika im MTT-Test

Therapeutikum 3	Therapeutikum 1+2	Kombination aus Therapeutikum 1 + 2 + 3
0 µM	0 µM	0 µM
0,25 x IC50	Ausgewählte Kombination aus Therapeutikum 1+2	(1+2) + 0,25 x IC50 (3)
0,5 x IC50		(1+2) + 0,5 x IC50 (3)
IC50		(1+2) + IC50 (3)
2 x IC50		(1+2) + 2 x IC50 (3)
4 x IC50		(1+2) + 4 x IC50 (2)

### 3.2.4.5 Dosierungsschemata

Aus den MTT-Tests ergaben sich folgende Behandlungskonzentrationen, die bei den weiteren Untersuchungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 Anwendung fanden:

Tabelle 12: Behandlungsschema für die Zelllinien PeC3 und PeC4 für alle nachfolgenden Untersuchungen

Therapeutikum	PeC3	PeC4
Cisplatin	9,6 µM (IC50)	0,3 µM (0,25 x IC50)
5-FU	5,73 µM (0,5 x IC50)	1,5 µM (IC50)
Paclitaxel	0,8 nM (0,25 x IC50)	1,95 nM (0,25 x IC50)
Therapeutikum 1+2	5,37 µM 5-U + 0,8 nM Paclitaxel	0,3 µM Cisplatin + 1,95 nM Paclitaxel
Therapeutikum 1+2+3	5,37 µM 5-FU + 0,8 nM Paclitaxel + 9,6 µM Cisplatin +	0,3 µM Cisplatin + 1,95 nM Paclitaxel + 1,5 µM 5-FU
Olaparib	100 µM	37,5 µM

### 3.2.5 Bestimmung des BrdU-Einbaus

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin und kann an dessen Stelle während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut werden. Im BrdU-Assay lässt sich dabei mithilfe einer Antikörper-vermittelten enzymatischen Reaktion die Menge an eingebautem BrdU bestimmen (118). Das eingebaute BrdU wird zunächst durch einen monoklonalen Anti-BrdU Antikörper detektiert. An diesen bindet ein Sekundäntikörper, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Die Zugabe des chromogenen

---

Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) führt in Kombination mit HRP zu einem Farbumschlag. Die zuvor klare Lösung wird durch das durch HRP katalysierte TMB proportional zum eingebauten BrdU bläulich. Durch die Zugabe der Stopp-Lösung (16 M Schwefelsäure) wird die HRP-Reaktion beendet und es kommt zur Bildung eines gelben Endproduktes. Dessen optische Dichte kann anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im Plattenlesegerät (Tecan US Inc. Spark 10M) gemessen werden.

Für den Versuch wurde für beide Zelllinien je eine 96-Well-Platte für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h vorbereitet. Am Versuchstag wurden die kultivierten Tumorzellen abgelöst und in Nährmedium aufgenommen (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Zellzahl wurde bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3) und auf 100.000 Zellen/ml eingestellt. Hiervon wurden pro Well 50 µl ausgesät. Für die Kombination aus drei Therapeutika wurde die Zellzahl auf 200.000 Zellen/ml eingestellt und 25 µl von dieser Zellsuspension in die entsprechenden Wells gegeben. Die Behandlungskonzentrationen (siehe Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5) wurden für die Einzelbehandlungen in doppelter Konzentration und für die Kombinationen in vierfacher Konzentration angesetzt. Von ersteren wurden dann 50 µl und von letzteren 25 µl in die entsprechenden Wells gegeben. Es wurden zwei unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Für jede Behandlung sowie die Kontrollen wurde ein dreifacher Ansatz vorbereitet.

Anschließend wurde das BrdU-Label in einem Verhältnis von 1:2.000 mit Medium verdünnt und nach Absetzen der Zellen je 20 µl davon in jedes Well der 24 h-Platte pipettiert. Eine Kontrollreihe wurde dabei ohne BrdU belassen. Die Platten wurden dann für 24 h im Inkubator gelagert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die 48 h-Platte mit 20 µl des verdünnten BrdU-Labels behandelt. Zeitgleich wurde die 24 h-Platte fixiert. Hierzu wurde die Platte zunächst schnell über Kopf gedreht und auf Papiertüchern trocken geklopft. Dann wurden 200 µl Fixierungspuffer in jedes Well pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte erneut über Kopf auf Papiertüchern trocken geklopft. Die Platte wurde anschließend bei 4°C gelagert und war bei dieser Temperatur bis zu einer Woche haltbar. Nach 48 h wurde die 48 h-Platte wie oben beschrieben fixiert und die 72 h-Platte mit BrdU versehen und am Folgetag fixiert.

Zur Messung am Plattenlesegerät (Tecan US Inc. Spark 10M) wurde zunächst 100x Anti-BrdU Antikörper im Verhältnis 1:100 mit Antikörperpuffer verdünnt. Hiervon wurden 100 µl in jedes Well der fixierten Platten gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden dann dreimal mit 1x Waschpuffer (25 ml der 20-fach konzentrierten Lösung mit 475 ml Wasser vermischt) gewaschen und jedes Mal auf Papiertüchern trocken geklopft. Das Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG HRP Konjugat, welches als Pulver vorlag, wurde in 1x PBS<sup>-</sup> aufgelöst, die benötigte Menge im Verhältnis 1:1.000 mit dem *Conjugate Diluent* verdünnt und mithilfe einer Spritze durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Von dieser Lösung

---

wurden dann 100 µl in jedes Well pipettiert und für 30 min inkubiert. Die Platten wurden anschließend dreimal mit 1x Waschpuffer und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und dabei nach jedem Waschschrift auf Papiertüchern trocken geklopft. Dann wurden in jedes Well 100 µl der *Substrat Solution* pipettiert und für 15 min im Dunkeln und bei RT inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl der *Stop Solution* in jedes Well gegeben. Die Messung am Tecan (Tecan US Inc. Spark 10M) erfolgte innerhalb von 30 min. Die ermittelte optische Dichte wurde jeweils mithilfe von Excel (Office Professional Plus 2010) zur Kontrolle normalisiert und in GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11).

### 3.2.6 Bestimmung der Zellzyklusphasen

Der Zellzyklus bezeichnet bei eukaryotischen Zellen den sich wiederholenden Ablauf von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen (119). Er setzt sich aus der Interphase und der Mitose (M)-Phase zusammen, wobei die Interphase weiter in die G0-, G1-, S- und G2-Phase unterteilt wird. Die G0/G1-Phase repräsentiert die Zelle mit einfachem Chromosomensatz. In der Synthese (S)-Phase findet die Replikation der DNA statt. In der G2-Phase bereiten sich die Zellen auf die bevorstehende Teilung vor, wobei die DNA verdoppelt vorliegt. In der folgenden M-Phase finden die Zellteilung sowie die Kernteilung statt.

Um eine Zellzyklusanalyse durchführen zu können, wurden die Zellen mit dem BrdU und dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt, ein fluoreszierendes Molekül, welches Nukleinsäuren bindet. Die anschließend mittels des Durchflusszytometers (BD LSR Fortessa X-20) detektierte Signalintensität ist proportional zur DNA-Menge, sodass über diese Signalstärke zwischen Zellen in der G0/G1- und G2/M-Phase unterschieden werden konnte. Als Marker der S-Phase wurde weiterhin BrdU in den Versuch integriert.

Die PeC3- und PeC4-Zellen wurden in den jeweiligen Versuchsansätzen für 48 h behandelt (siehe Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5).

1 h vor Behandlungsstopp wurden die Zellen in der Kulturflasche mit 20 µM BrdU behandelt und für 1 h im Inkubator gelagert. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Es wurden je 9 ml Medium hinzugefügt und in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml überführt. Dieses wurde dann 5 min mit 500 G und bei 4°C zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der durch das Zentrifugieren entstandene Überstand wurde restlos abgezogen und das Zellpellet mit 300 µl kaltem PBS<sup>-</sup> in ein Reaktionsgefäß von 1,5 ml überführt. Anschließend wurden 700 µl eisgekühltes 100%iges Ethanol tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden auf dem Thermoschüttler (ThermoCell MixingBlock) für 1 h unter Schütteln bei 4°C fixiert. Danach wurden sie mit 1.000 G bei 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Zu

---

jedem Zellpellet wurden dann 500 µl einer Lösung bestehend aus 6 ml PBS<sup>-</sup>, 4 ml 5N HCl und 50 ml Triton X-100 gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde 5 min bei 4°C mit 1.000 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 µl 0,1 M Natrium Tetraborat (0,38 g Natrium Tetraborat und 10 ml PBS<sup>-</sup>) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min in dieser Lösung wurden die Zellen erneut bei 4°C mit 1.000 G für 5 min zentrifugiert und dann mit einer 1%igen Bovinen Serumalbumin (BSA)-Lösung (0,1 g BSA und 9.900 µl PBS<sup>-</sup>) gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurde das Zellpellet jeweils mit 20 µl Anti-BrdU-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Pellet einmal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Dann wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl RNase A (10 mg/ml) gegeben, resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im abgedunkelten Raum wurden nach der Inkubationszeit in jedes Reaktionsgefäß 200 µl PI (50 µg/ml) gegeben und für 10 min bei RT gefärbt. Die Proben wurden jeweils in ein FACS-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (BD LSR Fortessa X-20) mittels des Programms FACS Diva (BD FACSDiva™), wobei für jede Probe 10.000 Ereignisse erfasst wurden. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo (Becton, Dickinson and Company), wobei der prozentuale Anteil an Zellen in der G0/G1-, G2/M- und S-Phase bestimmt wurde. Mithilfe von GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11).

### 3.2.7 Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der durch bestimmte morphologische Veränderungen der Zelle charakterisiert ist. Eine dieser Veränderungen ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Plasmamembran während der frühen Phase der Apoptose, wodurch PS auf der äußeren Oberfläche der Zelle exponiert wird (120). Dies macht man sich bei Verwendung des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson) zunutze. Das namensgebende Annexin V ist ein 35-36 kDa Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, welches eine hohe Affinität zu PS aufweist und somit an Zellen mit externalisiertem PS bindet. Annexin V ist an das Fluorochrom FITC konjugiert. So kann der Anteil der Zellen in der frühen Apoptose mithilfe des Durchflusszytometers bestimmt werden. Zur zusätzlichen Abgrenzung von spätapoptotischen sowie nekrotischen Zellen wird PI verwendet. Vitale Zellen mit einer intakten Membran sowie Zellen in der frühen Phase der Apoptose nehmen dieses nicht auf, wohingegen die DNA der toten und defekten Zellen angefärbt wird. Spätapoptotische und nekrotische Zellen erscheinen somit im Durchflusszytometer PI-positiv, wobei die spätapoptotischen Zellen zusätzlich FITC Annexin V-positiv, die nekrotischen Zellen allerdings FITC Annexin V-negativ erscheinen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Differenzierung zwischen vitalen, frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen im Durchflusszytometer mithilfe des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I

	FITC Annexin V	Propidiumiodid
vitale Zellen	-	-
frühapoptotische Zellen	+	-
spätapoptotische Zellen	+	+
nekrotische Zellen	-	+

Als Vorbereitung auf die Messung der Apoptose- und Nekroserate wurden die PeC-Zellen in Zellkulturflaschen behandelt (siehe Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5) und für 72 h im Inkubator gelagert. Am Versuchstag wurden das verbrauchte Medium sowie das zum Waschen verwendete PBS<sup>-</sup> in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml überführt. Dann wurden die Tumorzellen, je nach Größe der Zellkulturflasche, mit 1,5-3 ml Accutase versehen und 7-10 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Proben bei 4°C mit 1.050 *rounds per minute* (rpm) für 5 min zentrifugiert. Die Proben wurden danach auf Eis gestellt, wo sie für die nachfolgenden Schritte verblieben. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Dann wurde es in 1 ml 1x Bindepuffer (10x Bindepuffer mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt) aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und in 1x Bindepuffer auf 200.000 Zellen pro 100 µl eingestellt. Diese 100 µl wurden in FACS-Röhrchen überführt und im Dunkeln behandelt. Für die Herstellung der eigentlichen Messproben wurden jeweils 5 µl FITC Annexin V und 5 µl PI hinzugegeben. Für die Kontrollen erfolgte die Vorbereitung von drei weiteren Proben mit jeweils 100 µl der Zellsuspension. Eine dieser Proben blieb unbehandelt, eine wurde mit 5 µl FITC Annexin V und eine mit 5 µl PI behandelt. Die FACS-Röhrchen wurden vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und zu diesen jeweils 400 µl 1x Bindepuffer hinzu pipettiert. Innerhalb von 1 h erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (BD LSR Fortessa X-20) mithilfe des Programms FACS Diva (BD FACSDiva™). Die vier Proben, die für die Kontrollen vorbereitet wurden, ermöglichten eine exakte Ermittlung der Apoptose- und Nekroserate in den unbehandelten Zellen. Pro Messprobe wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo (Becton, Dickinson and Company), wobei in jeder Probe der prozentuale Anteil an vitalen, frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen bestimmt wurde. Diese Daten wurden mit GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11).

### 3.2.8 Bestimmung der chemotaktischen Aktivität

Die Ausbreitung von neoplastischen Zellen vom primären Tumor in entfernte Organe (Metastasierung) ist für die Mehrzahl der Todesfälle im Zusammenhang mit Krebs

---

verantwortlich. Es handelt sich dabei um einen komplexen Prozess, bei dem unter anderem die Motilität der Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Aufschluss über die Motilität von Zellen kann die Untersuchung der chemotaktischen Aktivität entlang eines Stimulus geben. Dies erfolgt im Versuch in einem statischen Doppelkammersystem (Boyden-Kammer), welches Aspekte der komplexen Abläufe modelhaft nachempfunden. Die Zellen wurden für diesen Versuch mit GreenDye (Cell Tracker™ Green 5-Chlormethylfluoresceindiacetat (CMFDA) Dye (Thermo Fisher Scientific)) eingefärbt. Bei GreenDye handelt es sich um einen fluorogenen Lebendfarbstoff, der durch die Zellmembran in das Zytoplasma eindringen kann und dort in ein nicht zellmembrangängiges Fluoreszenzprodukt umgewandelt wird (121). Die migrierten Zellen können so bei einer Wellenlänge von 588 nm sichtbar gemacht werden.

Die PeC3- und PeC4-Zellen wurden mit den in Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5, aufgeführten Konzentrationen in Zellkulturflaschen behandelt und für 72 h inkubiert. Zur Herstellung des Doppelkammersystems wurden Filtereinsätze (Inserts) mit einer Porengröße von 8 µm in jedes Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Danach wurde die Zellzahl auf 1.000.000 Zellen/ml eingestellt und für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml serumfreiem Medium resuspendiert. Auf diese Zellsuspension wurden im Dunkeln 4 µl GreenDye gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension erneut 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurden 800 µl des zuvor hergestellten Chemoattraktants (Nährmedium mit 30% FCS) in jedes Well unter das Insert der 24-Well-Platte pipettiert. Dann wurden 300 µl der Zellsuspension (60.000 Zellen) in die Filtereinsätze gegeben, wobei für jede Probe Triplikate angefertigt wurden. Die Platten wurden anschließend im Inkubator für 24 h inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium in den Wells und den Inserts abgesaugt. Beide Bereiche wurden mit jeweils 500 µl PBS<sup>+</sup> gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS<sup>+</sup> wurden 800 µl Fixierlösung (2%ige Glutaraldehyd-Lösung) in jedes Well pipettiert, um die Zellen für 15 min bei RT zu fixieren. Danach wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Inserts am Rand mit einem Filterpapier abgetrocknet. Die anschließende Messung erfolgte am Sapphire Biomolecular Imager (Azure Biosystems) bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Laserstärke von 7. Mithilfe des Programms AzureSpot (Azure Biosystems) wurde das entstandene Bild ausgewertet, wobei die Anzahl der fluoreszierenden Punkte an der Unterseite der Inserts bestimmt wurde. Die Ergebnisse wurden in Excel (Office Professional Plus 2010) zur Kontrolle normalisiert und dann mit GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11).

---

### 3.2.9 Bestimmung des Migrationsverhaltens mittels *Scratch-Wound-Migration-Assay*

Neben der Motilität zeigt auch das Migrationsverhalten der Tumorzellen Einfluss auf das Metastasierungspotential. Die Migrationseigenschaften wurden mittels des *Scratch-Wound Migration-Assays* untersucht. Hierzu wurden in einem konfluenten Zellrasen die adhärent wachsenden Zellen in einem definierten Bereich entfernt. Es entstand eine „Wunde“. Der Zellrasen wurde nach 0 h und 24 h unter dem Mikroskop fotografiert und die Fläche des zellfreien Bereiches mithilfe eines Bildanalyseprogramms ausgemessen.

Zur Herstellung der „Wunde“ wurde eine zuvor im urologischen Labor etablierte Magnet-*Scratch*-Vorrichtung verwendet (122). In dieser befinden sich Rundmagnete auf dem Deckel einer 12-Well-Platte am Rand jedes Wells (Leitplatte). Ein zweiter Deckel, der im 90° Winkel zur Leitplatte steht, dient als Leitschiene. Zum *Scratchen* wurde eine Versuchsplatte so auf der Leitplatte platziert, dass die Rundmagnete an einem Rand der Wells zu sehen sind und die Versuchsplatte an der Leitschiene anliegt. Dann wurden Scheibenmagnete in die Wells der Versuchsplatte eingelassen und durch das Führen der Versuchsplatte über die Leitplatte entlang der Leitschiene eine möglichst einheitliche „Wunde“ *gescratcht*. Anschließend wurde die Versuchsplatte senkrecht nach oben von der Leitplatte gehoben und die Scheibenmagnete mithilfe eines weiteren Magneten aus den Wells entfernt.

Der Versuch wurde für die beiden Zelllinien PeC3 und PeC4 auf unterschiedliche Weise durchgeführt.

#### 3.2.9.1 Durchführung des *Scratch-Wound-Migration-Assays* bei der Zelllinie PeC3

Die Zellen wurden mit Trypsin vom Zellkulturflaschenboden abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Zellen wurden dann in Nährmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.3) und auf 500.000 Zellen/ml eingestellt. In jedes Well einer 12-Well-Platte (Versuchsplatte) wurde anschließend 1 ml der Zellsuspension gegeben. Dabei wurden für jede Behandlung sowie für eine unbehandelte Kontrolle jeweils ein Well vorbereitet. Die Platte wurde dann im Inkubator gelagert. Nachdem die Zellen Zeit hatten sich abzusetzen, wurde am selben Tag und 12 h vor dem *Scratch* die Behandlung der Zellen in den Wells vorgenommen. Diese erfolgte wie in Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5, aufgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurde der *Scratch* mithilfe der oben beschriebenen Magnet-*Scratch*-Vorrichtung durchgeführt. Anschließend wurde das Medium aus jedem Well entnommen und jeweils in ein Eppendorf-Gefäß von 1,5 ml überführt. Die Gefäße wurden dann 5 min bei 1.200 rpm und bei RT zentrifugiert. Währenddessen wurden die Wells einmal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS<sup>+</sup> wurde das jeweilige Medium aus den zentrifugierten Eppendorf-Gefäßen, unter Belassen der abgesetzten Zellreste am Boden, wieder in die Wells pipettiert. Zur Festlegung der Ausgangsfläche wurden diese unter dem

---

Mikroskop (Inverses Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG)) mittels der Software Zen (Carl Zeiss Microscopy GmbH) fotografiert. Nach der Migrationszeit von 11 h wurden erneut Fotos erstellt. Für jedes Well erfolgte die Aufnahme von drei Bildern. Die JPEG-Dateien dieser Bilder wurden in das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Wayne Rasband/National Institutes of Health) geladen und mittels des *Wound healing size Tools* die Fläche in Quadratpixel ( $\text{px}^2$ ) gemessen. Aus den drei Aufnahmen, die pro Well erstellt wurden, wurde mit Excel (Office Professional Plus 2010) der Mittelwert bestimmt. Dann wurde der Anteil der Endfläche von der jeweiligen Ausgangsfläche ermittelt und in Prozent angegeben. Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung (siehe Abschnitt 3.2.11) erfolgten mit GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.).

### 3.2.9.2 Durchführung des *Scratch-Wound-Migration*-Assays bei der Zelllinie PeC4

Die Zellen der Zelllinie PeC4 wurden nach dem Ablösen (siehe Abschnitt 3.2.2) auf eine Zellzahl von 100.000 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde dann jeweils 1 ml in jedes Well einer 12-Well-Platte pipettiert. Diese Platte wurde dann für etwa 60 h im Inkubator gelagert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellen, wie in Tabelle 12, Abschnitt 3.2.4.5, aufgeführt, in den Wells behandelt. Die Platten wurden erneut für 12 h inkubiert und der *Scratch* mithilfe der Magnet-*Scratch*-Vorrichtung durchgeführt. Der weitere Ablauf entsprach dem für die Zelllinie PeC3 (siehe Abschnitt 3.2.9.1), wobei der Migrationsversuch bei der Zelllinie PeC4, im Gegensatz zu PeC3 (11 h), erst nach 24 h gestoppt wurde.

### 3.2.10 Bestimmung des klonogenen Wachstums

Weitere Aussagen zum Metastasierungs- sowie Wachstumsverhalten lassen sich aus der Fähigkeit zur Koloniebildung ableiten. Diese lässt sich mit dem klonogenen Wachstums-Assay untersuchen. Dieses Assay gibt Auskunft über die Fähigkeit der Einzelzellen sich anzusiedeln und zu wachsen. Hierzu werden die Tumorzellen in geringer Anzahl ausgesät, mit Stoffen in gewünschter Konzentration versehen, für 7-10 Tage kultiviert und die Anzahl der Kolonien bestimmt. Als Kolonie wurde eine Zellansammlung >50 Zellen gewertet.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen zunächst mit Trypsin abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2) und gezählt (siehe Abschnitt 3.2.3). Für die Zelllinie PeC3 wurde die Zellzahl auf 400 Zellen/ml und für die Zelllinie PeC4 auf 500 Zellen/ml eingestellt. Es wurde dann in jedes Well einer 6-Well-Platte 1 ml der jeweiligen Zellsuspension pipettiert. Jedes Well wurde anschließend weiterhin mit 1 ml Nährmedium versehen. Die in den folgenden Tabellen 14-19 aufgeführten Konzentrationen wurden dreifach konzentriert angesetzt und hiervon jeweils 1 ml zu den Zellen pipettiert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Zusammengefasst wurden die Zellen wie folgt behandelt:

Tabelle 14: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Cisplatin innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

Cisplatin		
	PeC3	PeC4
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	9,6 µM (IC50)	0,3 µM (0,25 x IC50)
$\frac{1}{2}$	4,8 µM	0,15 µM
$\frac{1}{4}$	2,4 µM	0,08 µM
$\frac{1}{8}$	1,2 µM	0,04 µM
$\frac{1}{10}$	0,6 µM	0,03 µM
$\frac{1}{16}$	0,96 µM	0,02 µM

Tabelle 15: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit 5-FU innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

5-FU		
	PeC3	PeC4
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	5,73 µM (0,5 x IC50)	1,5 µM (IC50)
$\frac{1}{2}$	2,87 µM	0,75 µM
$\frac{1}{4}$	1,43 µM	0,38 µM
$\frac{1}{8}$	0,72 µM	0,19 µM
$\frac{1}{10}$	0,57 µM	0,15 µM
$\frac{1}{16}$	0,36 µM	0,09 µM

Tabelle 16: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Paclitaxel innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

Paclitaxel		
	PeC3	PeC4
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	0,8 nM (0,25 x IC50)	1,95 nM (0,25 x IC50)
$\frac{1}{2}$	0,4 nM	0,98 nM
$\frac{1}{4}$	0,2 nM	0,49 nM
$\frac{1}{8}$	0,1 nM	0,24 nM
$\frac{1}{10}$	0,08 nM	0,2 nM
$\frac{1}{16}$	0,05 nM	0,12 nM

Tabelle 17: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit der Kombinationstherapie bestehend aus zwei Therapeutika innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

Therapeutikum 1 + 2		
	PeC3: 5-Fluorouracil + Paclitaxel	PeC4: Cisplatin + Paclitaxel
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	5,73 µM 5-FU + 0,8 nM Paclitaxel	0,3 µM Cisplatin + 1,95 nM Paclitaxel
$\frac{1}{2}$	2,87 µM 5-FU + 0,4 nM Paclitaxel	0,15 µM Cisplatin + 0,98 nM Paclitaxel
$\frac{1}{4}$	1,43 µM 5-FU + 0,2 nM Paclitaxel	0,08 µM Cisplatin + 0,49 nM Paclitaxel
$\frac{1}{8}$	0,72 µM 5-FU + 0,1 nM Paclitaxel	0,04 µM Cisplatin + 0,24 nM Paclitaxel
$\frac{1}{10}$	0,57 µM 5-FU + 0,08 nM Paclitaxel	0,03 µM Cisplatin + 0,2 nM Paclitaxel
$\frac{1}{16}$	0,36 µM 5-FU + 0,05 nM Paclitaxel	0,02 µM Cisplatin + 0,12 nM Paclitaxel

Tabelle 18: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit der Kombinationstherapie bestehend aus 5-Fluorouracil, Paclitaxel und Cisplatin innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

Cisplatin + Paclitaxel + 5-Fluorouracil		
	PeC3	PeC4
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	5,73 µM 5-FU + 0,8 nM Paclitaxel + 9,6 µM Cisplatin	0,3 µM Cisplatin + 1,95 nM Paclitaxel + 1,5 µM 5-FU
$\frac{1}{2}$	2,87 µM 5-FU + 0,4 nM Paclitaxel + 4,8 µM Cisplatin	0,15 µM Cisplatin + 0,98 nM Paclitaxel + 0,75 µM 5-FU
$\frac{1}{4}$	1,43 µM 5-FU + 0,2 nM Paclitaxel + 2,4 µM Cisplatin	0,08 µM Cisplatin + 0,49 nM Paclitaxel + 0,38 µM 5-FU
$\frac{1}{8}$	0,72 µM 5-FU + 0,1 nM Paclitaxel + 1,2 µM Cisplatin	0,04 µM Cisplatin + 0,24 nM Paclitaxel + 0,19 µM 5-FU
$\frac{1}{10}$	0,57 µM 5-FU + 0,08 nM Paclitaxel + 0,6 µM Cisplatin	0,03 µM Cisplatin + 0,2 nM Paclitaxel + 0,15 µM 5-FU
$\frac{1}{16}$	0,36 µM 5-FU + 0,05 nM Paclitaxel + 0,96 µM Cisplatin	0,02 µM Cisplatin + 0,12 nM Paclitaxel + 0,09 µM 5-FU

Tabelle 19: Dosierungen für die Behandlung der Zelllinien PeC3 und PeC4 mit Olaparib innerhalb des klonogenen Wachstums-Assays

Olaparib		
	PeC3	PeC4
1 (im MTT ermittelte Konzentration)	100 µM	37,5 µM
$\frac{1}{2}$	50 µM	18,75 µM
$\frac{1}{4}$	25 µM	9,38 µM
$\frac{1}{8}$	12,5 µM	4,69 µM
$\frac{1}{10}$	10 µM	3,75 µM
$\frac{1}{16}$	6,25 µM	2,34 µM

Die Zellen wurden für 10 Tage bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert. Nach dieser

---

Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und jedes Well einmal mit jeweils 3 ml PBS<sup>+</sup> gewaschen. Das PBS<sup>+</sup> wurde abgesaugt. Anschließend wurde jedes Well mit 2 ml Fixierlösung (15% Essigsäure und 85% Methanol) versehen und für 5 min inkubiert. Die Fixierlösung wurde dann verworfen und die Färbelösung (0,5 g Coomassie Blue G250, 75 ml Essigsäure, 200 ml Methanol und 725 ml destilliertes Wasser) in die Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde diese Färbelösung ebenfalls verworfen und die gefärbten und fixierten Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen, bis keine störenden Farbreste mehr vorhanden waren. Sobald die Platten getrocknet waren, wurden diese mit dem Sapphire Biomolecular Imager (Azure Biosystems) gescannt und mithilfe von ImageJ (Wayne Rasband/National Institutes of Health) ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl von Kolonien pro Well sowie die Fläche, die diese einnehmen, bestimmt. Die ermittelte Fläche wurde zur Kontrolle normalisiert und diese Werte mithilfe von GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abschnitt 3.2.11).

### 3.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Die Versuche wurden hierfür mindestens 3-mal wiederholt.

Für den MTT-Test (siehe Abschnitt 3.2.4), die Bestimmung der Zellzyklusphasen (siehe Abschnitt 3.2.6) und die Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate (siehe Abschnitt 3.2.7) wurde eine two-way ANOVA durchgeführt. Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Referenzgruppe wurde jeweils mithilfe des Dunnett-Tests vorgenommen. Bei dem MTT-Test erfolgte dabei eine Anpassung des Signifikanzniveaus mittels einer Bonferroni-Korrektur. Für den *Scratch-Wound-Migration-Assay* (siehe Abschnitt 3.2.9) sowie den klonogenen Wachstums-Assay (siehe Abschnitt 3.2.10) wurde eine one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test durchgeführt. Bei der Bestimmung des BrdU-Einbaus (siehe Abschnitt 3.2.5) und der Bestimmung der chemotaktischen Aktivität (siehe Abschnitt 3.2.8) erfolgte die statistische Auswertung mittels eines t-Tests.

Eine Abweichung galt dabei als signifikant, wenn  $p < 0,05$  war.

---

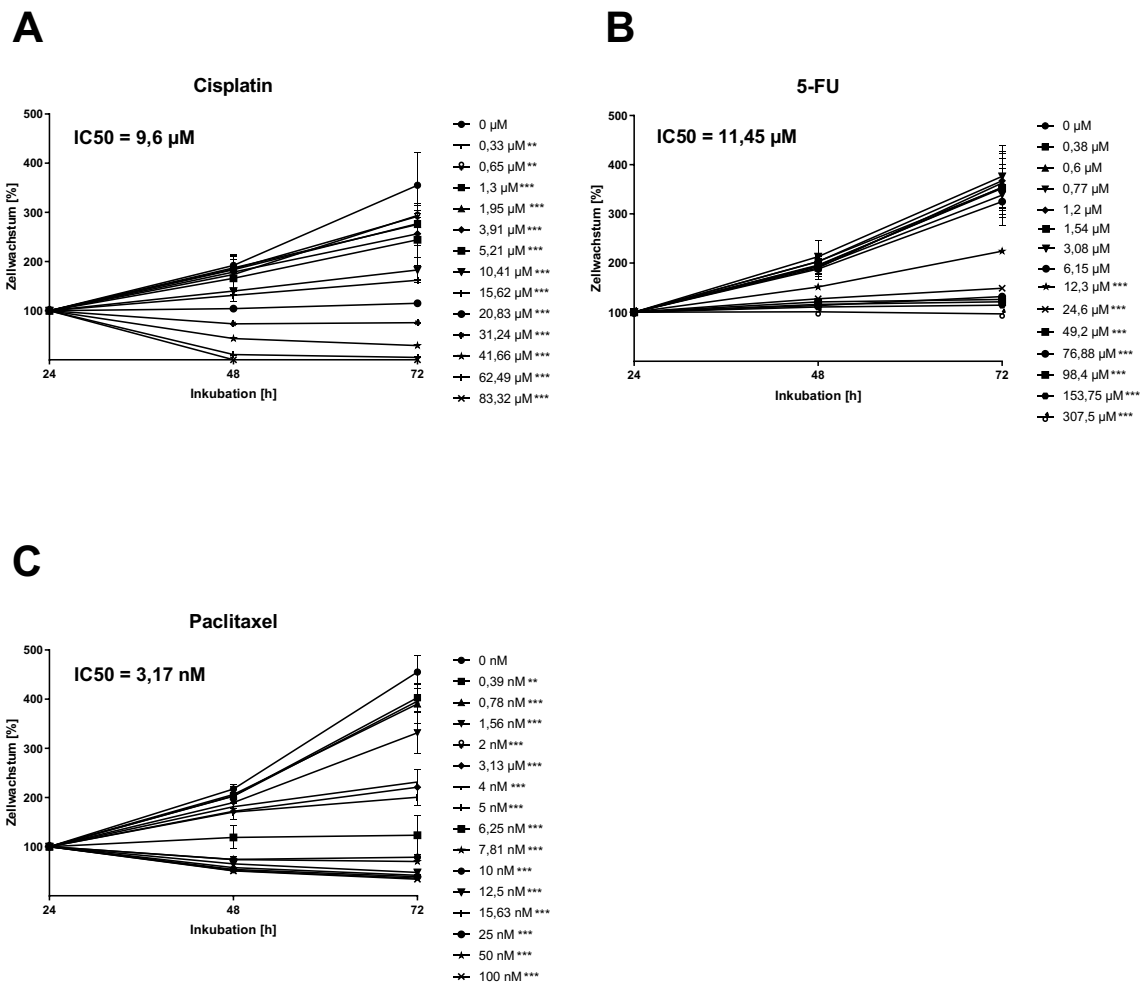
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Evaluation der optimalen Dosis und des Tumorzellwachstums mittels des MTT-Tests

#### 4.1.1 In vitro Etablierung der Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel

##### 4.1.1.1 Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel inhibieren als Einzelbehandlung das Tumorzellwachstum

In den beiden Zelllinien PeC3 und PeC4 konnte bei der Einzelbehandlung mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel eine zeit- und dosisabhängige Wachstumsinhibition detektiert werden (Abbildung (Abb.) 1 und 2). Bei den PeC3-Zellen war für die Kontrolle im Vergleich zum 24 h-Wert (100%) ein Wachstum der Zellen auf ~350-450% nach einer Inkubation von 72 h nachweisbar. Bereits durch die Gabe von 0,33  $\mu\text{M}$  Cisplatin konnte nach 72-stündiger Behandlung mit einem Abfall von ~100% im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Inhibition des Wachstums erzielt werden (Abb. 1A). Der IC<sub>50</sub>-Wert von Cisplatin betrug bei den PeC3-Zellen dabei 9,6  $\mu\text{M}$  (72 h). Mit der maximalen Konzentration von 83,32  $\mu\text{M}$  konnte durch Cisplatin bereits nach 48 h eine vollständige Zellreduktion induziert werden. Die Einzelgabe von 5-FU führte in den PeC3-Zellen nach 72 h ab einer Konzentration von 12,3  $\mu\text{M}$  zu einer statistisch signifikanten Inhibition des Wachstums um 130% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 1B). Die maximal angewendete 5-FU-Konzentration führte sowohl nach einer Inkubationszeit von 48 h als auch von 72 h zu einer Reduktion des Wachstums auf ~100%. Diese Stagnation des Wachstums zeichnete sich auch schon bei den geringeren Konzentrationen, etwa ab 24,6  $\mu\text{M}$  5-FU, ab, sodass eine weitere Konzentrationssteigerung keine entsprechende Steigerung der Wachstumsinhibition in den PeC3-Zellen mehr zu bewirken schien. Der für 5-FU ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert betrug für die PeC3-Zellen 11,45  $\mu\text{M}$  (72 h). Paclitaxel bewirkte bei den PeC3-Zellen ab einer Konzentration von 0,39 nM nach 72 h eine statistisch signifikante Inhibition des Zellwachstums (Abb. 1C). Dabei war im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion des Zellwachstums um 52% zu verzeichnen. Die maximale Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  reduzierte das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle um 421%. Der errechnete IC<sub>50</sub>-Wert von Paclitaxel lag für die PeC3-Zellen bei 3,17 nM (72 h).



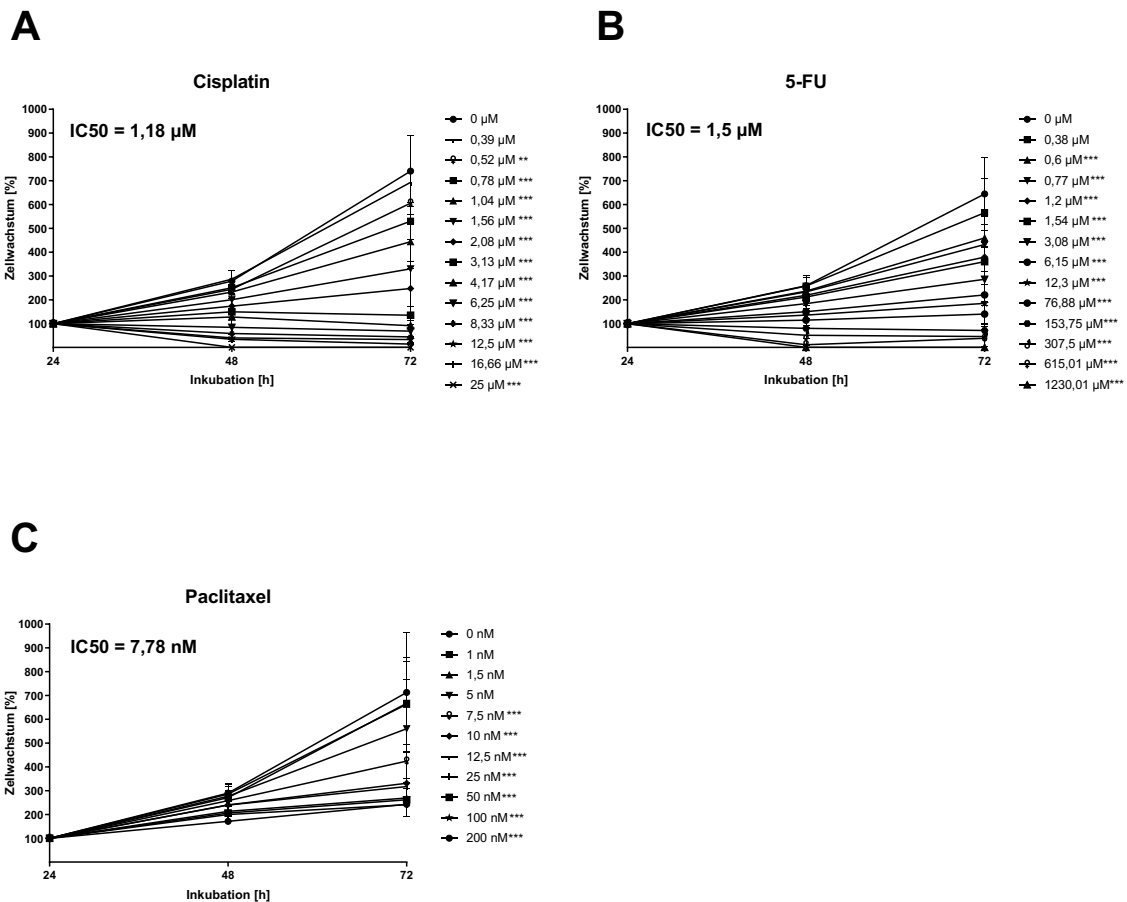
**Abbildung 1: Dosis-Wirkungskurven für PeC3-Zellen nach Einzelbehandlung mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel**

Kinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach einer Inkubation von 24 h, 48 h und 72 h bei Einzelbehandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Cisplatin [0-83,32  $\mu\text{M}$ ] (A), 5-FU [0-307,5  $\mu\text{M}$ ] (B) oder Paclitaxel [0-100 nM] (C). Unbehandelte PeC3-Zellen dienen als Kontrollen. Die Normalisierung erfolgte jeweils zum Wert nach 24 h (100%). X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle:  $** = p < 0,01$ ;  $*** = p < 0,001$ . **A:** n = 4, **B:** n = 4, **C:** n = 3.

Bei den PeC4-Zellen konnte in der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zum 24 h-Wert (100%) nach 48 h zunächst ein Zellwachstum auf ~250-300% festgestellt werden, das dann nach 72 h auf ~700% anstieg. Im Vergleich zu den PeC3-Zellen wiesen die PeC4-Zellen somit ein deutlich schnelleres Zellwachstum auf. Mit einer Reduktion des Zellwachstums um etwa 130% im Vergleich zur Kontrolle führte Cisplatin ab einer Konzentration von 0,52  $\mu\text{M}$  nach 72 h zu einer statistisch signifikanten Inhibition (Abb. 2A). Bei den PeC4-Zellen konnte durch eine Cisplatin-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  bereits nach 48 h eine vollständige Zellreduktion erreicht

---

werden. Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert für Cisplatin betrug in den PeC4-Zellen 1,18 µM (72 h). 5-FU bewirkte in den PeC4-Zellen nach 72 h ab einer Konzentration von 0,6 µM eine statistisch signifikante Inhibition des Wachstums um 184,43% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2B). Die Applikation von 1.230,01 µM 5-FU führte nach 48 h zu einer vollständigen Zellreduktion. Die Konzentration von 1,5 µM 5-FU (72 h) entsprach bei den PeC4-Zellen dem IC<sub>50</sub>-Wert. Mit Paclitaxel ließ sich nach 72 h ab einer Konzentration von 7,5 nM eine statistisch signifikante Inhibition des Wachstums erreichen (Abb. 2C). Bei Gabe von 200 nM Paclitaxel wurde das Zellwachstum nach 72 h um 470% im Vergleich zur Kontrolle (~700%) reduziert. An dieser Stelle erreichte die Wachstumsinhibition in den PeC4-Zellen ein Plateau. Somit konnte durch eine weitere Konzentrationssteigerung von Paclitaxel keine weitere Inhibition erreicht werden. Für Paclitaxel wurde in den PeC4-Zellen ein IC<sub>50</sub>-Wert von 7,78 nM (72 h) errechnet.



**Abbildung 2: Dosis-Wirkungskurven für PeC4-Zellen nach Einzelbehandlung mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel**

Kinetische Darstellung des Wachstums der Zelllinie PeC4 nach einer Inkubation von 24 h, 48 h und 72 h bei Einzelbehandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Cisplatin [0-25 µM] (A), 5-FU [0-1.230,01 µM] (B) oder Paclitaxel [0-200 nM] (C). Unbehandelte PeC4-Zellen dienen als Kontrollen. Die Normalisierung erfolgte jeweils zum Wert nach 24 h (100%). X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001. A: n = 4, B: n = 5, C: n = 4.

Die ermittelten IC50-Werte zeigten, dass die PeC4-Zellen im Vergleich zu den PeC3-Zellen in Bezug auf die Wachstumsinhibition eine höhere Sensitivität gegenüber Cisplatin und 5-FU aufwiesen (Abb. 1 und 2). Gegenüber Paclitaxel zeigten sich hingegen die PeC3-Zellen sensitiver.

#### 4.1.1.2 Eine Zweierkombinationstherapie mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel verstärkt die Wachstumsinhibition

Weiterführend wurde zunächst jeweils eine Zweierkombination der Therapeutika Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel untersucht. Hier wurden nur die für die weiteren Untersuchungen

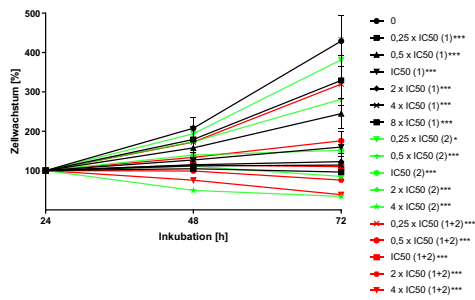
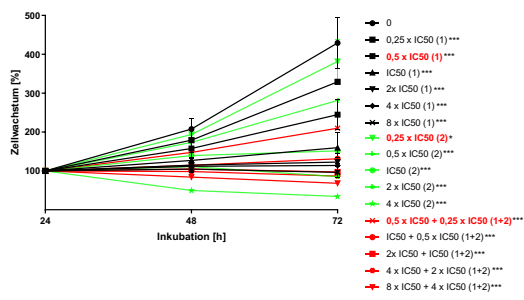
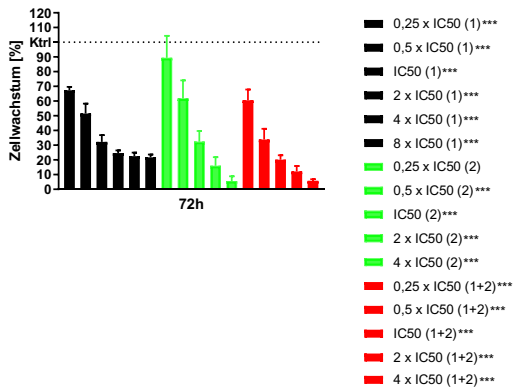
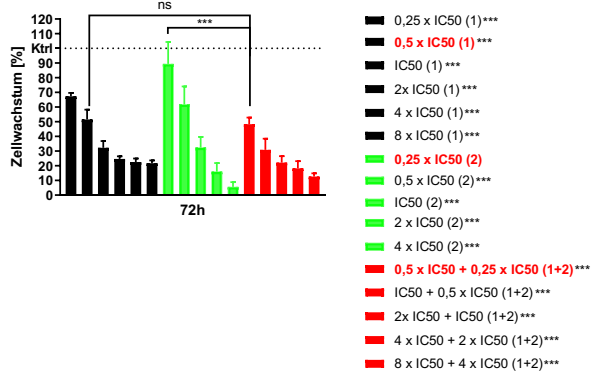
---

ausgewählten Kombinationen aufgeführt. Für die restlichen Daten wird auf den Anhang dieser Arbeit verwiesen.

Für die PeC3-Zellen wurde die kombinierte Gabe von 5-FU (IC<sub>50</sub>-Wert = 11,45 µM) und Paclitaxel (IC<sub>50</sub>-Wert = 3,17 nM) ausgewählt. Es wurden sowohl die gleichen Anteile der jeweiligen IC<sub>50</sub>-Werte (Abb. 3A) als auch unterschiedliche Anteile der IC<sub>50</sub>-Werte (Abb. 3B) der beiden Stoffe kombiniert. In beiden Fällen war eine verstärkte Wachstumsinhibition durch die kombinierte Gabe der Stoffe zu beobachten. Eine statistisch signifikante Inhibition war sowohl durch die Einzelgabe als auch durch die Kombinationstherapie gegeben. Die Kombination aus 0,25 x IC<sub>50</sub> von 5-FU und Paclitaxel resultierte in der zeitkinetischen Darstellung mit einem Wert von 319,85% im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit Paclitaxel in einer Inhibitionssteigerung von 61,8%, im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit 5-FU allerdings nur in einer Steigerung der Wachstumshemmung von 9,24% (Abb. 3A1). In der konzentrationskinetischen Darstellung nach 72 h zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei durch die Kombination der beiden Stoffe verglichen mit der Einzelbehandlung mit 5-FU eine Inhibitionssteigerung von 6,79% und verglichen mit der Einzelbehandlung mit Paclitaxel von 28,93% erzielt werden konnte (Abb. 3A2). Der errechnete CI-Wert für diese Kombination betrug 1,47 und lag damit im antagonistischen Bereich (Abb. 5A, Tabelle 20). Die Kombination aus 0,5 x IC<sub>50</sub> von 5-FU und 0,5 x IC<sub>50</sub> von Paclitaxel führte in der zeitkinetischen Darstellung mit einem Wachstum auf 175,56% zu einer Verringerung des Wachstums um 105,56% verglichen mit der Einzelgabe von Paclitaxel und um 69,16% verglichen mit der Einzelgabe von 5-FU (Abb. 3A1). In der dosisabhängigen Darstellung der PeC3-Zellen, mit Normalisierung auf den Wert der Kontrolle, zeigte sich nach 72 h bei Gabe von 0,5 x IC<sub>50</sub> Paclitaxel eine Wachstumsreduktion auf 61,81% und nach der Gabe von 0,5 x IC<sub>50</sub> 5-FU eine Hemmung auf 51,55% (Abb. 3A2). Die Kombination der beiden Stoffe in diesen Konzentrationen resultierte in einer weiteren Wachstumsinhibition auf 33,81%. Mit einem CI-Wert von 0,73 war diese Kombination in den PeC3-Zellen moderat synergistisch (Abb. 5A, Tabelle 20). Da im Weiteren eine dritte Substanz zu der Kombination hinzugefügt werden sollte, war die Wachstumsinhibition bei Verwendung von 0,5 x IC<sub>50</sub> der beiden Substanzen bereits sehr hoch. Da allerdings bei Verwendung von jeweils 0,25 x IC<sub>50</sub> eine antagonistische Beziehung der beiden Therapeutika festgestellt worden war, wurde für die PeC3-Zellen zusätzlich die Wachstumsinhibition bei kombinierter Gabe unterschiedlicher Anteile der IC<sub>50</sub>-Werte untersucht (Abb. 3B). Dabei wurde die Dosis von 5-FU um 0,25 x IC<sub>50</sub> im Vergleich zu Paclitaxel erhöht, da es bei dessen Einzelgabe zu einer Plateaubildung kam, während für Paclitaxel der gesamte Inhibitionsbereich abgedeckt war (Abb. 3A2). Nach der kombinierten Gabe von 0,5 x IC<sub>50</sub> von 5-FU und 0,25 x IC<sub>50</sub> von Paclitaxel erreichte das Wachstum der PeC3-Zellen im Verhältnis zum 24 h-Wert von 100% nach einer Inkubationszeit von 72 h 209,67% (Abb. 3B1). Im Vergleich zur Einzelgabe von Paclitaxel ergab sich damit nach 72 h

---

eine Inhibitionssteigerung von 171,97%, im Vergleich zur Einzelgabe von 5-FU von 35,05%. In der Konzentrationskinetischen Darstellung resultierte diese Kombination nach 72 h in einer Reduktion des Wachstums auf 48,36% (Abb. 3B2). Mit einer Vergrößerung der Wachstumsinhibition um 41,11% konnte somit im Vergleich zu Paclitaxel alleine ein statistisch hochsignifikanter Unterschied erzielt werden. Nach Einzelgabe von 5-FU wurde eine Verminderung des Zellwachstums auf 51,55% erreicht. Somit konnte durch die kombinierte Gabe im Vergleich zur Einzelgabe von 5-FU kein statistisch signifikanter Effekt erzielt werden. Der berechnete CI-Wert betrug 1,04 und lag hiermit im fast additiven Bereich (Abb. 5A, Tabelle 20). Aufgrund der vergleichsweise geringen Wachstumsinhibition wurde, um auch nach Zugabe der dritten Substanz noch einen Effekt detektieren zu können, die Kombination bestehend aus 0,5 x IC50 von 5-FU und 0,25 x IC50 von Paclitaxel für die PeC3-Zellen ausgewählt.

**A1****B1****A2****B2**

### Abbildung 3: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel

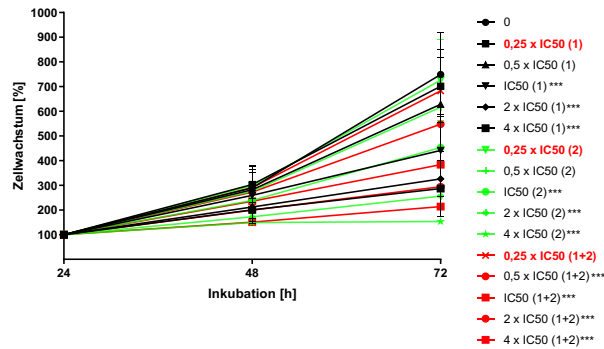
Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums von PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe mit gleichen Anteilen vom IC50 (0,25 x IC50 + 0,25 x IC50 – 4 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Zeitkinetische (B1) und konzentrationskinetische (B2) Darstellung des Wachstums von PeC3 nach kombinierter Gabe mit unterschiedlichen Anteilen vom IC50 (0,5 x IC50 + 0,25 x IC50 – 8 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, gepunktete Linie; hier 72 h). Schwarz: 5-FU, grün: Paclitaxel, rot: Kombination, rote Schrift (B1, B2): ausgewählte Kombination. Konzentrationen werden als Anteile IC50-Werte angegeben. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. in Abb. B2 beim Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Kombination: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant.  $n = 3$ .

Für die PeC4-Zellen wurde als Zweierkombinationstherapie die kombinierte Gabe von Paclitaxel (IC50-Wert = 7,78 nM) und Cisplatin (IC50-Wert = 1,18  $\mu$ M) ausgesucht (Abb. 4). In der zeitkinetischen Darstellung wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erst oberhalb des IC50-Wertes von Paclitaxel und oberhalb des IC50-Wertes von Cisplatin nach 72 h eine

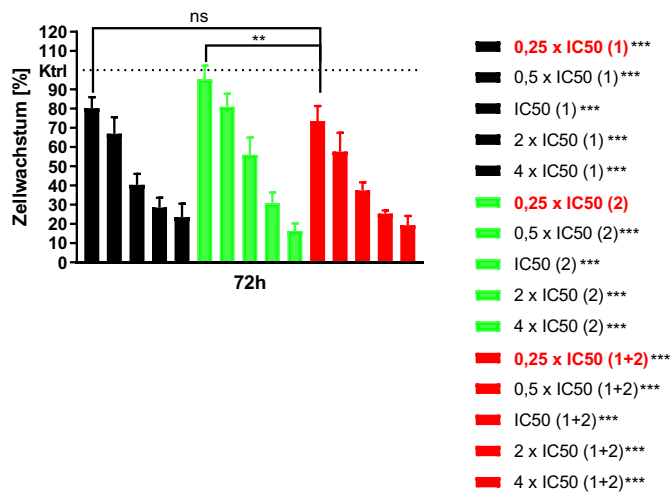
---

statistisch signifikante Wachstumsinhibition erlangt (Abb. 4A1). Bei kombinierter Gabe von Cisplatin und Paclitaxel konnte in den PeC4-Zellen bereits bei Verwendung von 0,5 x IC50 der beiden Stoffe eine statistisch signifikante Inhibition des Tumorzellwachstums erzielt werden. Normalisiert auf den Wert der unbehandelten Kontrolle nach 72 h ist sogar bei jeder Einzelgabe und kombinierter Gabe der Therapeutika in der Konzentrationskinetischen Darstellung ein statistisch hochsignifikantes Ergebnis messbar (Abb. 4A2). In der zeitkinetischen Darstellung führte die Kombination aus 0,25 x IC50 von Paclitaxel und 0,25 x IC50 von Cisplatin nach 72 h im Vergleich zu der Einzelgabe von Paclitaxel zu einer Steigerung der Wachstumsinhibition um 18,23% und im Vergleich zu der Einzelgabe von Cisplatin um 43,02% (Abb. 4A1). In der Konzentrationskinetischen Darstellung wurde für die PeC4-Zellen nach Verwendung der Kombinationstherapie nach 72 h eine Reduktion des Zellwachstums auf 73,58% erreicht. Im Vergleich zu dem bei Einzelgabe von Cisplatin erreichten Wert von 80,2% war dies nicht signifikant. Zur alleinigen Gabe von Paclitaxel, die zu einer Verminderung des Zellwachstums auf 95,34% führte, ergab sich allerdings ein statistisch signifikanter Unterschied. Die Kombination aus 0,5 x IC50 von Cisplatin und Paclitaxel resultierte in der Zeitkinetik nach 72 h verglichen mit der Einzeltherapie mit Paclitaxel in einer Inhibitionssteigerung von 80,46%, verglichen mit der Einzeltherapie mit Cisplatin in einer Steigerung der Wachstumshemmung von 68,66% (Abb. 4A1). In der Konzentrationskinetik nach 72 h wurde bei dieser Kombinationstherapie eine Reduktion des Zellwachstums auf 57,66% erreicht, welches einer weiteren Wachstumshemmung um 9,29% im Vergleich zur Paclitaxel-Behandlung und 23,32% im Vergleich zur Cisplatin-Behandlung entsprach (Abb. 4A2). Der CI-Wert für die Kombination aus 0,25 x IC50 von beiden Therapeutika betrug 0,98 und lag damit im fast additiven Bereich (Abb. 5B, Tabelle 20). Für die Kombination aus 0,5 x IC50 von Cisplatin und Paclitaxel wurde ein Wert von 1,11 berechnet, womit diese Kombination bereits im leicht antagonistischen Bereich lag. Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen führte zu einem weiteren Anstieg des CI-Wertes. Des Weiteren waren die Werte für die Reduktion des Zellwachstums, die mit den höheren Konzentrationen erreicht wurden, zu hoch, um noch Effekte einer dritten Substanz nachweisen zu können. Für die Kombination aus den IC50-Werten von 5-FU und Paclitaxel lag die Verminderung des Zellwachstums nach 72 h in der Konzentrationskinetischen Darstellung beispielsweise bereits bei 37,42%. So kamen nur die Kombinationen aus 0,25 und 0,5 x IC50 als Basis für die Kombinationen von drei Therapeutika in Frage. Da bereits bei den Zweierkombinationen der CI-Wert mit 0,98 bei der Kombination aus 0,25 x IC50 von Cisplatin und Paclitaxel am niedrigsten war und dies auch nach Zugabe von 5-FU als drittes Therapeutikum mit Werten von 1,02 und 0,91 (Abb. 9) der Fall war, wurde für die PeC4-Zellen die Kombination mit 0,25 x IC50 von Paclitaxel und 0,25 x IC50 von Cisplatin ausgewählt.

# A1



# A2



**Abbildung 4: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe mit gleichen Anteilen vom IC50 (0,25 x IC50 + 0,25 x IC50 – 4 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, gepunktete Linie; hier 72 h). Schwarz: Paclitaxel, grün: Cisplatin, rot: Kombination, rote Schrift: ausgewählte Kombination. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. in Abb. A2 beim Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Kombination: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant.  $n = 4$ .

Tabelle 20: Arzneimittelinteraktion: Einteilung mithilfe des Kombinationsindex (CI) nach Chou (1991)

Bereich des Kombinationsindex (CI)	Beschreibung
<0,1	Sehr starker Synergismus
0,1 – 0,3	Starker Synergismus
0,3 – 0,7	Synergismus
0,7 – 0,85	Moderater Synergismus
0,85 – 0,9	Leichter Synergismus
0,9 – 1,1	Fast additiv
1,1 – 1,2	Leichter Antagonismus
1,2 – 1,45	Moderater Antagonismus
1,45 – 3,3	Antagonismus
3,3 – 10	Starker Antagonismus
>10	Sehr starker Antagonismus

A				B		
Dose 5FU	Dose Paclitaxel	Effect	CI	Total Dose	Fa	CI Value
0.37238	6.77E-4	0.39194	1.46813	0.09049	0.26423	0.98391
0.74475	0.00135	0.65835	0.72943	0.18097	0.42335	1.11327
1.489	0.00271	0.7976	0.73015	0.36194	0.62582	1.16601
2.979	0.00541	0.88247	0.86813	0.72388	0.74616	1.50587
5.958	0.01083	0.94404	0.98425	1.44777	0.8069	2.29797
0.74475	6.77E-4	0.53471	1.03662			
1.489	0.00135	0.69141	0.84309			
2.979	0.00271	0.77869	1.00394			
5.958	0.00541	0.81759	1.56069			
11.916	0.01083	0.87317	2.09070			

**Abbildung 5: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn für die kombinierte Gabe von zwei Therapeutika**

**A:** CI-Wert Berechnung aus den MTT-Daten der Kombinationstherapie der PeC3-Zellen mit 5-FU und Paclitaxel. Von links nach rechts: Konzentration 5-FU, Konzentration Paclitaxel, Effekt der Kombinationstherapie ((100 - MTT-Wert)/100; MTT-Wert = Wert aus der Konzentrationskinetischen Darstellung nach 72 h für die jeweiligen Konzentrationen (siehe Abb. 3 für A und Abb. 4 für B, Abschnitt 4.1.1.2)), CI-Wert. **B:** CI-Wert Berechnung aus den MTT-Daten der Kombinationstherapie der PeC4-Zellen mit Paclitaxel und Cisplatin. Von links nach rechts: Kombinierte Konzentration aus Paclitaxel und Cisplatin, Effekt der Kombinationstherapie (siehe A), CI-Wert. Konzentrationen in µg/ml. CI-Wert ist einheitenlos. Rot umrandet: ausgewählte Konzentrationen, siehe Abb. 3 für A und Abb. 4 für B.

**4.1.1.3 Eine Dreierkombinationstherapie mit Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel verstärkt weiter die Wachstumsinhibition**

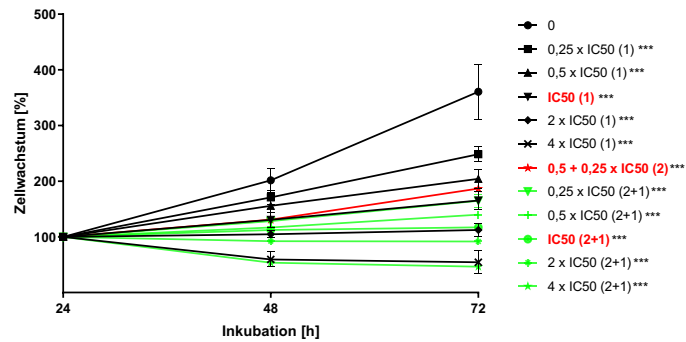
Zu den zuvor ausgewählten Zweierkombinationen (siehe Abschnitt 4.1.1.2) wurde anschließend das dritte Therapeutikum hinzugegeben. In diesem Abschnitt wurden erneut nur die ausgewählten Kombinationen aufgeführt. Für die weiteren Daten wird auf den Anhang

---

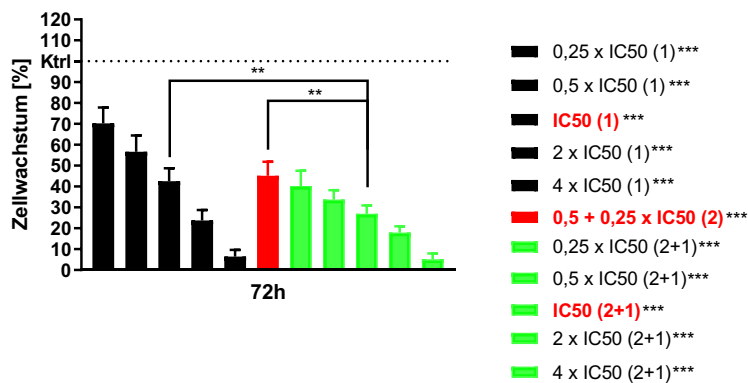
verwiesen.

In PeC3-Zellen wurde zu der vorausgewählten Zweierkombination mit  $0,5 \times IC_{50}$  von 5-FU und  $0,25 \times IC_{50}$  von Paclitaxel als drittes Therapeutikum Cisplatin ( $IC_{50}$ -Wert =  $9,6 \mu M$ ) in den Konzentrationen  $0,25 \times IC_{50}$  –  $4 \times IC_{50}$  hinzugegeben (Abb. 6). Sowohl in der zeitkinetischen als auch in der konzentrationskinetischen Darstellung wurde nach 72 h im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nach Einzelgabe von Cisplatin, kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel und Gabe der Kombinationstherapie aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin eine statistisch signifikante Wachstumsinhibition erreicht. Für die PeC3-Zellen wurde die Kombination aus drei Therapeutika gewählt, bei der der  $IC_{50}$ -Wert von Cisplatin zu der Zweierkombination hinzugegeben wurde. In der zeitkinetischen Darstellung führte diese Kombination nach 72 h zu einer Hemmung des Zellwachstums auf 117,12% (Abb. 6A1). Dies bedeutete eine Inhibitionssteigerung von 48,15% im Vergleich zu der alleinigen Gabe von Cisplatin und 69,74% im Vergleich zu der Zweierkombination mit 5-FU und Paclitaxel. Auch in der konzentrationskinetischen Darstellung war nach 72 h bei Verwendung dieser Dreierkombination ein statistisch signifikanter Unterschied im Zellwachstum im Vergleich zu der entsprechenden Einzelgabe von Cisplatin und der Zweierkombination detektierbar (Abb. 6A2). Es zeigte sich dabei in den PeC3-Zellen eine Verminderung des Zellwachstums auf 26,97%. Für die Dreierkombination ergab sich sowohl im Vergleich mit den Einzelgaben von 5-FU, Paclitaxel oder Cisplatin als auch im Vergleich mit der Zweierkombination aus 5-FU und Paclitaxel ein CI-Wert von 0,91 (Abb. 7, Tabelle 20). Mit dieser Dreierkombination wurde somit eine Verstärkung der Wachstumsinhibition erzielt, die jedoch genügend Zellen für weitere Versuche ließ.

# A1



# A2



**Abbildung 6: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. Cisplatin wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (siehe Abschnitt 4.1.1.2) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Cisplatin und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, gepunktete Linie; hier 72 h). Schwarz: Cisplatin, rot: Zweierkombination aus 5-FU und Paclitaxel, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin, rote Schrift: ausgewählte Kombination. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. beim Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Dreierkombination sowie Zweierkombination und Dreierkombination: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.

## A1

Dose Pac	Dose 5-FU	Dose Cis	Effect	CI
6.77E-4	0.74475	0.71975	0.58911	1.16419
6.77E-4	0.74475	1.4395	0.66294	0.91180
6.77E-4	0.74475	2.879	0.73032	0.91156
6.77E-4	0.74475	5.758	0.82067	0.91493
6.77E-4	0.74475	11.516	0.94865	0.49035

## A2

Dose Cis	Dose K5FPac	Effect	CI
0.71975	0.74543	0.58911	1.12827
1.4395	0.74543	0.66294	0.91503
2.879	0.74543	0.73032	0.90629
5.758	0.74543	0.82067	0.88377
11.516	0.74543	0.94865	0.45236

### Abbildung 7: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn bei den PeC3-Zellen für die kombinierte Gabe von drei Therapeutika

CI-Wert Berechnung aus den MTT-Daten der Kombinationstherapie der PeC3-Zellen mit 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin.

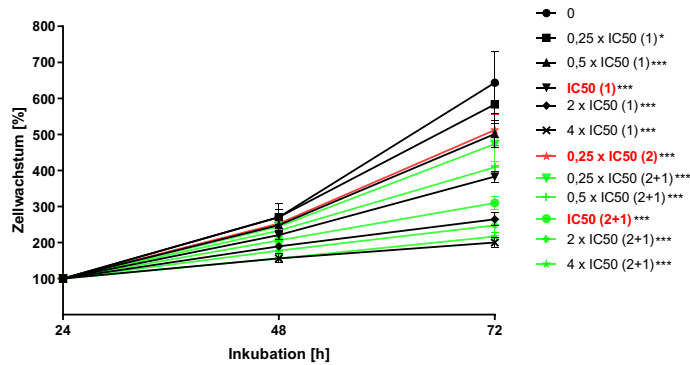
**A1:** CI-Werte für den Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Kombination aus drei Therapeutika, von links nach rechts: Konzentration Paclitaxel, Konzentration 5-FU, Konzentration Cisplatin, Effekt der Kombinationstherapie ( $(100 - \text{MTT-Wert})/100$ ; MTT-Wert = Wert aus der konzentrationskinetischen Darstellung nach 72 h für die jeweiligen Konzentrationen (siehe Abb. 6, Abschnitt 4.1.1.3)), CI-Wert. **A2:** CI-Werte für den Vergleich zwischen der Zweierkombination und der Kombination aus drei Therapeutika, von links nach rechts: Konzentration Cisplatin, addierte Konzentrationen von 5-FU und Paclitaxel, Effekt der Kombinationstherapie (siehe **A1**), CI-Wert. Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ . CI-Wert ist einheitenlos. Rot umrandet: ausgewählte Konzentrationen, siehe Abb. 6.

Für die PeC4-Zellen wurde zu der vorausgewählten Zweierkombination mit  $0,25 \times \text{IC}_{50}$  von Paclitaxel und  $0,25 \times \text{IC}_{50}$  von Cisplatin als drittes Therapeutikum 5-FU ( $\text{IC}_{50}$ -Wert =  $1,5 \mu\text{M}$ ) in den Konzentrationen von  $0,25 \times \text{IC}_{50} - 4 \times \text{IC}_{50}$  hinzugefügt (Abb. 8). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnten nach 72 h alle Konzentrationen bei Einzelgabe von 5-FU, der Zweierkombination sowie bei der Kombination aus drei Stoffen in der zeit- und konzentrationskinetischen Darstellung eine statistisch signifikante Wachstumsinhibition induzieren. Für die PeC4-Zellen wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 5-FU als Zusatz zu der Zweierkombination ausgewählt. Während die Kombination aus Paclitaxel und Cisplatin in der zeitkinetischen Darstellung nach 72 h im Vergleich zur Kontrolle (643,71%) eine Wachstumshemmung um 131,47% und die Einzelgabe von 5-FU eine Hemmung um 260,68% ermöglichte, betrug die Inhibition des Zellwachstums bei Kombination dieser Komponenten

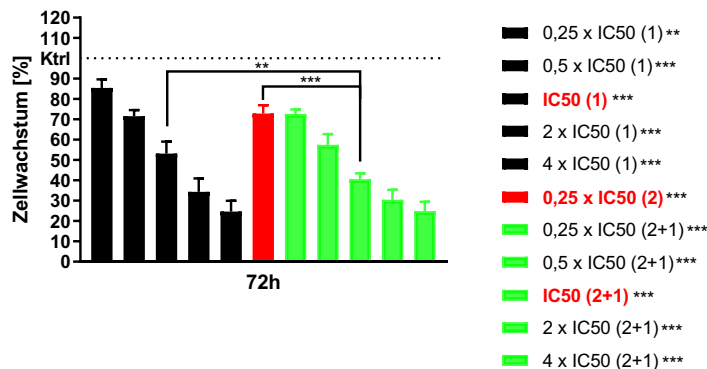
---

334,1% (Abb. 8A1). In der Konzentrationskinetischen Darstellung war im Vergleich zur Kontrolle mit einer Reduktion des Zellwachstums um 59,43% nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU nach 72 h im Vergleich zur Einzelgabe von 5-FU mit einer Inhibition um 46,85% und zur Gabe der Zweierkombination mit einem Wert von 27,14% eine statistisch signifikante Wachstumsinhibition zu verzeichnen (Abb. 8A2). Für die Kombination aus den drei Therapeutika ergab sich im Vergleich mit den Einzelgaben von Paclitaxel, Cisplatin oder 5-FU für die PeC4-Zellen ein CI-Wert von 1,02 und im Vergleich mit der Zweierkombination aus Paclitaxel und Cisplatin und der Einzelgabe von 5-FU ein CI-Wert von 0,91 (Abb. 9). Wie in den PeC3-Zellen, wurden auch in den PeC4-Zellen Konzentrationen der Therapeutika gewählt, die in Kombination eine möglichst effektive Wachstumsinhibition erzeugten und gleichzeitig ausreichend viele Zellen beließen, um weitere Versuchsreihen zu ermöglichen.

# A1



# A2



**Abbildung 8: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU. 5-FU wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (siehe Abschnitt 4.1.1.2) hinzugegeben. Als Vergleich dienen die Einzelbehandlung von Cisplatin und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h). Schwarz: 5-FU, rot: Zweierkombination aus Paclitaxel und Cisplatin, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin, rote Schrift: ausgewählte Kombination. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Dreierkombination sowie Zweierkombination und Dreierkombination: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.

## A1

Dose Pac	Dose 5FU	Dose Cis	Effect	CI
0.00332	0.04885	0.17765	0.48215	1.28459
0.00332	0.0977	0.17765	0.54771	1.22841
0.00332	0.1954	0.17765	0.63686	1.15605
0.00332	0.3908	0.17765	0.70357	1.26722
0.00166	0.04885	0.08883	0.27315	1.80632
0.00332	0.7816	0.17765	0.75133	1.61017
0.00166	0.0977	0.08883	0.42583	1.31432
0.00166	0.1954	0.08883	0.59429	1.02142
0.00166	0.3908	0.08883	0.69537	1.07262
0.00166	0.7816	0.08883	0.75121	1.41602

## A2

Dose 5FU	Dose KPacCi	Effect	CI
0.04885	0.18097	0.48215	1.07738
0.0977	0.18097	0.54771	1.01162
0.1954	0.18097	0.6368	0.94801
0.3908	0.18097	0.70357	1.07593
0.7816	0.18097	0.75133	1.43537
0.04885	0.09049	0.27315	1.84606
0.0977	0.09049	0.42583	1.22351
0.1954	0.09049	0.59429	0.91403
0.3908	0.09049	0.69537	0.97573
0.7816	0.09049	0.75121	1.32860

### Abbildung 9: Ergebnisse der CI-Wert Berechnung durch CompuSyn bei den PeC4-Zellen für die kombinierte Gabe von drei Therapeutika

CI-Wert Berechnung aus den MTT-Daten der Kombinationstherapie der PeC4-Zellen mit Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU.

**A1:** CI-Werte für den Vergleich zwischen Einzelbehandlung und Kombination aus drei Therapeutika, von links nach rechts: Konzentration Paclitaxel, Konzentration 5-FU, Konzentration Cisplatin, Effekt der Kombinationstherapie  $((100 - \text{MTT-Wert})/100$ ; MTT-Wert = Wert aus der konzentrationskinetischen Darstellung nach 72 h für die jeweiligen Konzentrationen (siehe Abb. 7, Abschnitt 4.1.1.3)), CI-Wert. **A2:** CI-Werte für den Vergleich zwischen der Zweierkombination und der Kombination aus drei Therapeutika, von links nach rechts: Konzentration 5-FU, addierte Konzentrationen von Paclitaxel und Cisplatin, Effekt der Kombinationstherapie (siehe **A1**), CI-Wert. Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ . CI-Wert ist einheitenlos. Rot umrandet: ausgewählte Konzentrationen, siehe Abb. 8.

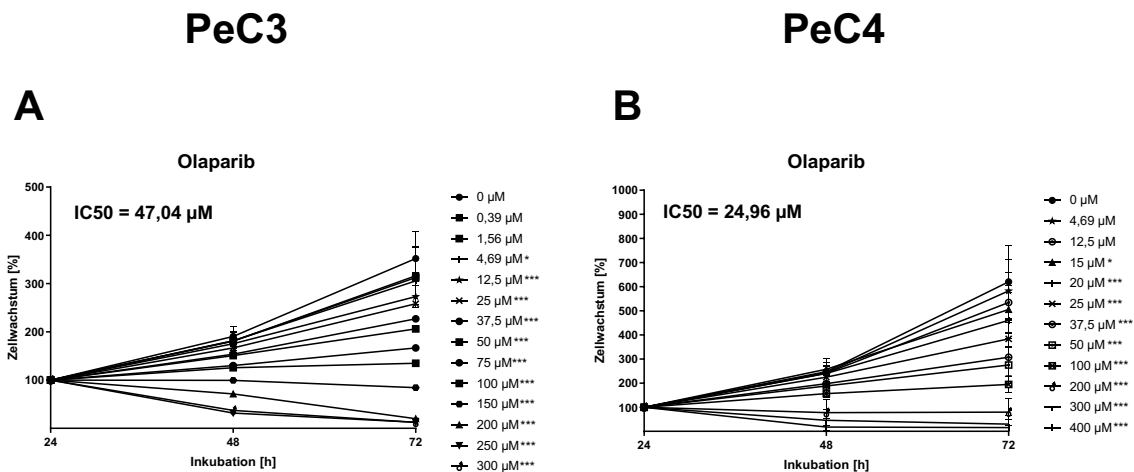
#### 4.1.2 Olaparib inhibiert als Einzeltherapie das Tumorzellwachstum der PeC-Zellen

Durch die Einzelgabe von Olaparib konnte eine dosis- und zeitabhängige Wachstumsinhibition der PeC3- und PeC4-Zellen induziert werden.

In den PeC3-Zellen wurde bei der Applikation von Olaparib nach 72 h mit einer Konzentration von  $4,69 \mu\text{M}$  das Zellwachstum auf 305,64% reduziert und im Vergleich zur Kontrolle (351,85%) eine signifikante Inhibition erzielt (Abb. 10A). Mit der höchsten angewendeten

Olaparib-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  wurde das Zellwachstum nach 72 h auf 12,29% reduziert. Für die PeC3-Zellen wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 47,04  $\mu\text{M}$  Olaparib (72 h) ermittelt.

In den PeC4-Zellen resultierte nach 72 h eine Olaparib-Konzentration ab 15  $\mu\text{M}$  in einer statistisch signifikanten Wachstumsinhibition (Abb. 10B). Die Gabe mit der maximalen Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  Olaparib führte zu einer Reduktion des Zellwachstums auf 15,8%. Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert für Olaparib betrug für die PeC4-Zellen 24,96  $\mu\text{M}$  (72 h).

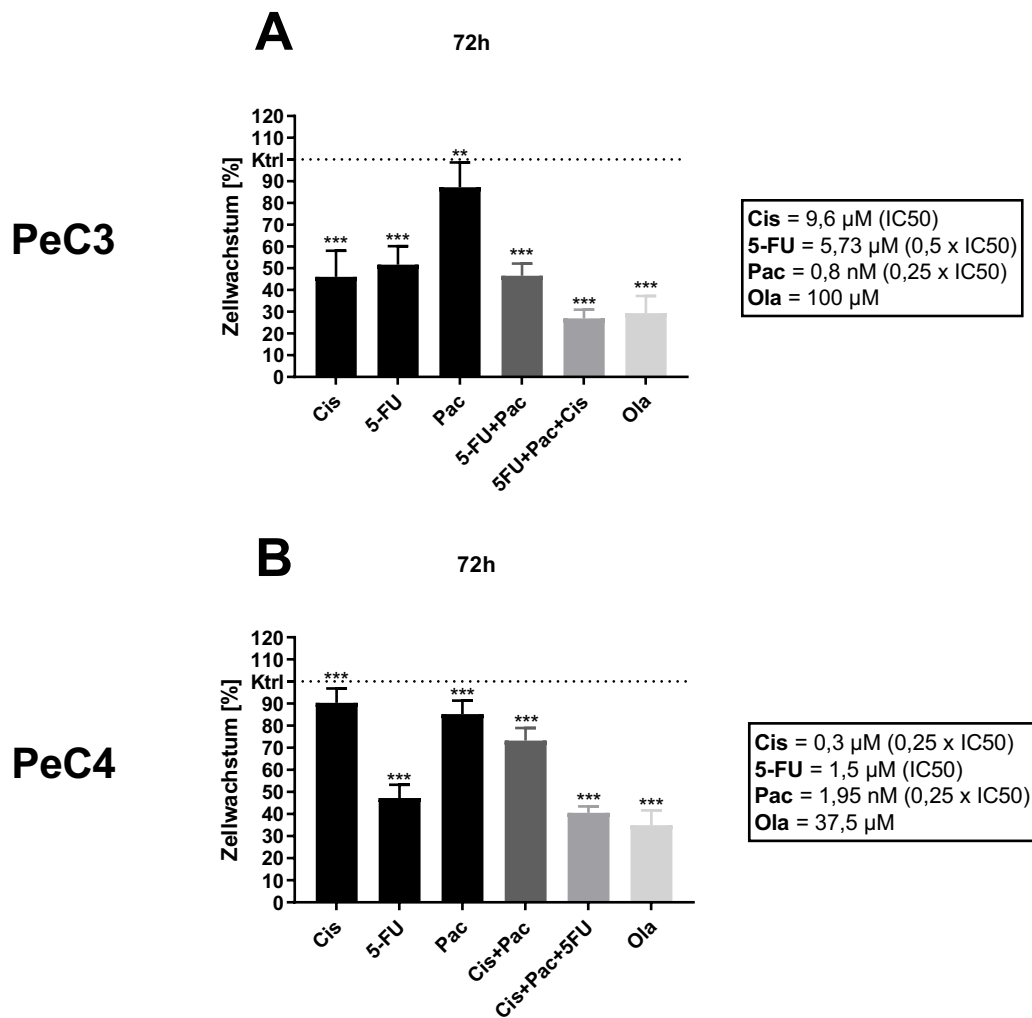


**Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve für PeC3- und PeC4-Zellen nach Einzelbehandlung mit Olaparib**

Kinetische Darstellung des Wachstums der PeC3- (A) und PeC4-Zellen (B) nach einer Inkubation von 24 h, 48 h und 72 h bei Einzelbehandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Olaparib (PeC3 [0-300  $\mu\text{M}$ ], PeC4 [0-400  $\mu\text{M}$ ]). Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen. Die Normalisierung erfolgte jeweils zum Wert nach 24 h (100%). X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .  $n = 4$ .

PeC4-Zellen weisen somit eine etwa doppelt so hohe Sensitivität gegenüber Olaparib auf wie PeC3-Zellen.

Für beide PeC-Zelllinien wurde für Olaparib eine Konzentration gewählt, die einen ähnlichen Effekt auf das Wachstum zeigte, wie die vorher selektierte Kombination aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel (Abb. 11). In den PeC3-Zellen entsprach dies einer Olaparib-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 11A) und in den PeC4-Zellen einer Konzentration von 37,5  $\mu\text{M}$  (Abb. 11B). Dies sollte einen adäquaten Vergleich der beiden Therapiestrategien bei Untersuchung der weiteren Parameter ermöglichen.



**Abbildung 11: Wachstum nach Behandlung mit den ausgewählten Konzentrationen für die Kombinationstherapie aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin sowie der Einzelbehandlung mit Olaparib**

Konzentrationskinetische Darstellung der Wachstums-Daten der ausgewählten Konzentrationen und deren Kombinationen bzw. der Einzelbehandlung mit Olaparib für die Zelllinien PeC3 (A) und PeC4 (B) nach 72 h. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel, Ola = Olaparib. X-Achse: Angabe der Therapeutika. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktrl = Kontrolle, auf 100% gesetzt, gepunktete Linie): \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .  $n = 11$ .

#### 4.2 Die Standardtherapie und Olaparib induzieren zelltypspezifisch einen Zellzyklusarrest

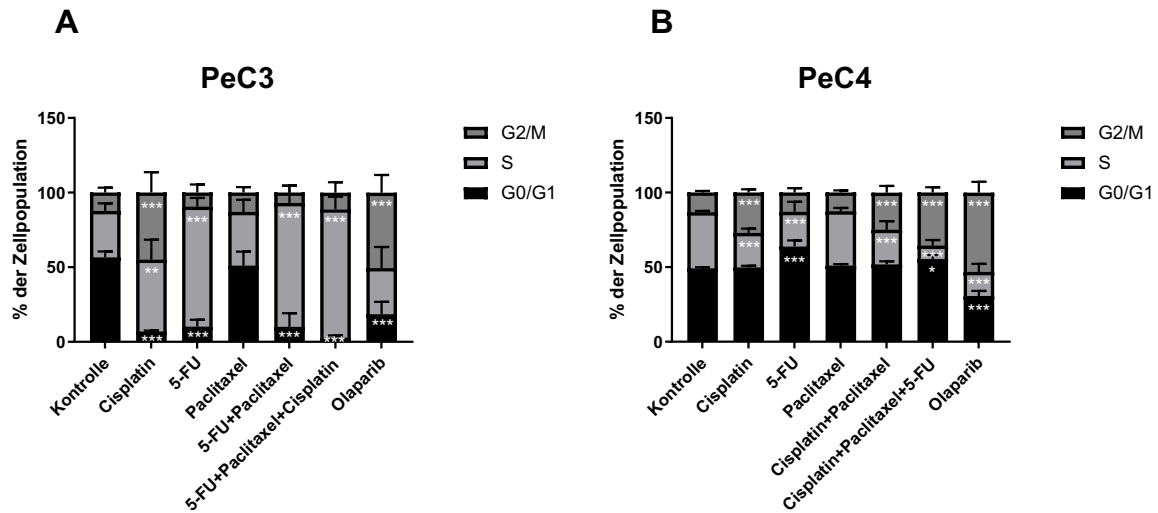
Eine Behandlung mit der Standardtherapie oder Olaparib bewirkte zelltypabhängig eine Verschiebung der Zellzyklusphasen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 12 und 13).

In den PeC3-Zellen führte die Einzelgabe von Cisplatin nach 48 h zu einem signifikanten

---

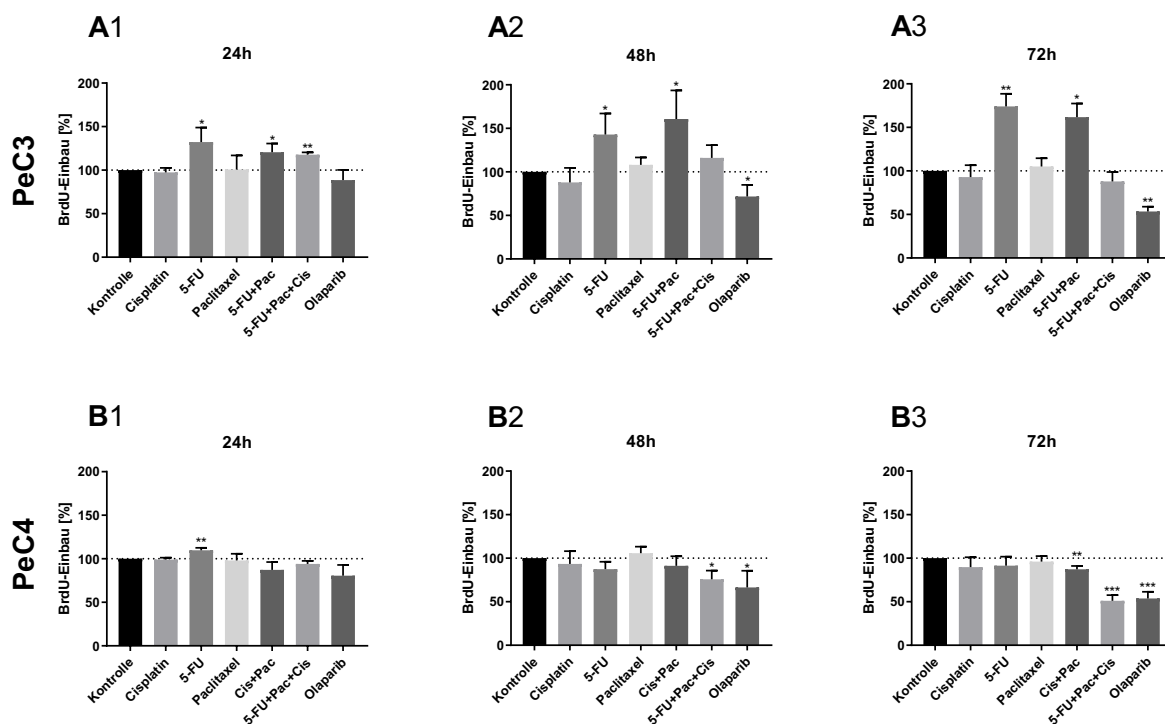
Zellzyklusarrest in der G2/M- und S-Phase (Abb. 12A). Der prozentuale Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase wurde dabei statistisch signifikant verringert. Die Einzeltherapie mit 5-FU induzierte einen Arrest in der S-Phase, wobei der Anteil an S-Phase-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h signifikant erhöht war (Abb. 12A, 13A). Paclitaxel alleine bewirkte in den PeC3-Zellen keine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen. Nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel ergab sich in der Verteilung der Zellzyklusphasen ein vergleichbares Bild wie bei Einzelgabe von 5-FU (Abb. 12A). Auch die Standardtherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel induzierte nach 48 h einen vergleichbar starken S-Phase-Arrest. Die Zellen befanden sich dabei mit einem prozentualen Anteil von 88,85% fast vollständig im Zellzyklusarrest. Gleichzeitig wurde der prozentuale Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase signifikant verringert. Die Gabe von Olaparib führte hingegen nach 48 h zu einem signifikanten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, der ebenfalls mit einer Reduktion der Zellen in der G0/G1-Phase einherging (Abb. 12A). Bei Einzelbetrachtung der S-Phase wurde zudem der Anteil an PeC3-Zellen in dieser Phase durch Olaparib nach 48 h und stärker nach 72 h reduziert (Abb. 13A2, A3).

In den PeC4-Zellen wurde nach 48 h durch eine Einzelgabe von Cisplatin ein G2/M-Phase-Arrest induziert bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils an Zellen in der S-Phase (Abb. 12B). Eine Behandlung mit 5-FU arretierte die Zellen nach 48 h in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, was sich durch einen signifikanten prozentualen Anstieg der Zellen in dieser Phase äußerte. Der Anteil an Zellen in der S-Phase war nach der Behandlung mit 5-FU verringert. Paclitaxel bewirkte in den PeC4-Zellen nach 48 h bei Einzelgabe, wie in den PeC3-Zellen, keine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen. In Kombination mit Cisplatin induzierte es hingegen nach 48 h einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, wobei die Verteilung der Zellzyklusphasen nach kombinierter Gabe von Cisplatin und Paclitaxel insgesamt der Verteilung nach Einzelgabe von Cisplatin gleich. Die Standardtherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel bewirkte in den PeC4-Zellen nach 48 h einen Arrest von Zellen in der G2/M-Phase sowie zusätzlich einen Arrest von Zellen in der G0/G1-Phase. Der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase wurde dabei in geringerem Maße als der Anteil der G2/M-Phase-Zellen vergrößert. Bei der Einzelbetrachtung der S-Phase wurde zudem der Anteil an S-Phase-Zellen nach 48 h und 72 h reduziert (Abb. 13B). Die Exposition mit Olaparib führte nach 48 h in den PeC4-Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, wobei der prozentuale Anteil an Zellen in dieser Phase nach der Gabe von Olaparib größer war als nach der Standardtherapie (Abb. 12B). Der Anteil an Zellen in der S- und G0/G1-Phase wurde durch Olaparib zeitgleich signifikant verringert. In der isolierten Betrachtung konnte der Anteil an Zellen in der S-Phase durch Olaparib in den PeC4-Zellen ähnlich stark wie durch die Standardtherapie verringert werden. Nach 48 h betrug er verglichen mit der Kontrolle 66,5% und nach 72 h 53,72%.



**Abbildung 12: Verteilung der PeC-Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Standardtherapie oder Einzelbehandlung mit Olaparib**

Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2/M) in den PeC3- (**A**) und PeC4-Zellen (**B**) nach 48-stündiger Behandlung nach dem Behandlungsschema entsprechend Tabelle 12 unter Abschnitt 3.2.4.5. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. X-Achse: Angabe der Therapeutika. Y-Achse: % der Zellpopulation in den jeweiligen Zellzyklusphasen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . **A**:  $n = 4$ , **B**:  $n = 3$ .



**Abbildung 13: Anteil an der S-Phase der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib**  
 BrdU-Einbau der PeC3- (A) und PeC4-Zellen (B) nach einer Behandlung von 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3) nach dem Behandlungsschema entsprechend Tabelle 12 unter Abschnitt 3.2.4.5. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (gepunktete Linie). Die Werte wurden zur Kontrolle (100%) normalisiert. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Therapeutika, Y-Achse: BrdU-Einbau in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . **A1:**  $n = 3$ , **A2:**  $n = 4$ , **A3:**  $n = 3$ , **B1:**  $n = 3$ , **B2:**  $n = 4$ , **B3:**  $n = 4$ .

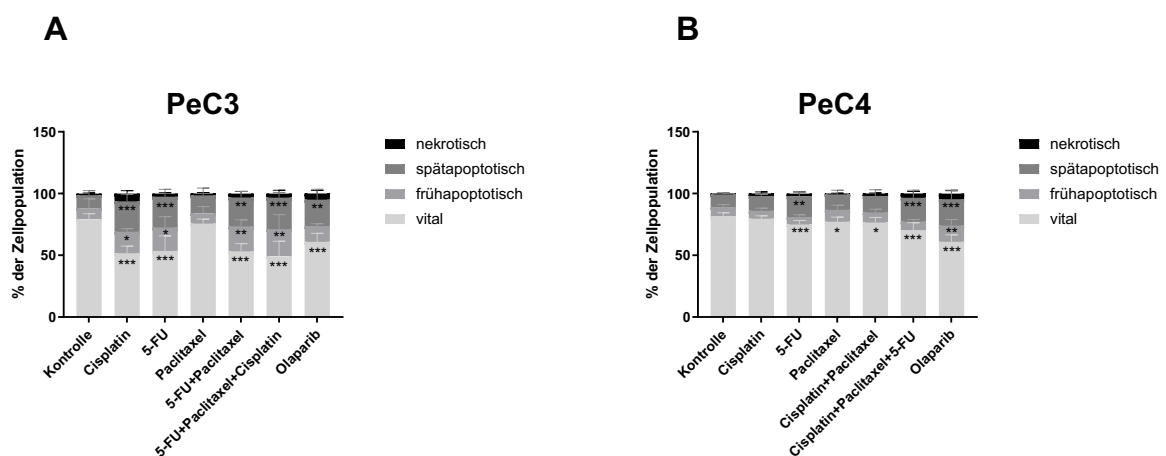
### 4.3 Die Standardtherapie und Olaparib erhöhen die Anzahl apoptotischer Zellen

In den PeC3- und PeC4-Zellen wurde die Anzahl apoptotischer Zellen durch eine 72-stündige Behandlung mit der Standardtherapie oder mit Olaparib erhöht (Abb. 14).

Im Vergleich zur basalen Apoptoserate der Kontrollzellen konnte in den PeC3-Zellen bereits durch die Einzelgabe von Cisplatin der Anteil an früh- und spätapoptotischen Zellen statistisch signifikant erhöht werden (Abb. 14A). Der Anteil vitaler Zellen wurde dabei signifikant reduziert. Die Einzeltherapie mit 5-FU führte ebenfalls zu einer erhöhten Apoptoserate, während Paclitaxel die Apoptoserate nicht signifikant veränderte. Die Verteilung nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel entsprach dementsprechend annähernd der Verteilung nach Einzelgabe von 5-FU. Die zusätzliche Gabe von Cisplatin im Rahmen der Standardtherapie resultierte in einer moderaten weiteren Erhöhung der Apoptoserate. Olaparib induzierte in den PeC3-Zellen einen statistisch signifikanten Anstieg des Anteils an spätapoptotischen Zellen

unter gleichzeitiger signifikanter Abnahme vitaler Zellen. In den PeC3-Zellen war die Wirkung von Olaparib insgesamt schwächer ausgeprägt als die der Standardtherapie.

In den PeC4-Zellen erhöhte lediglich 5-FU als Einzelbehandlung den Anteil an spätapoptotischen Zellen statistisch signifikant und reduzierte dabei den Anteil an vitalen Zellen signifikant (Abb. 14B). Nach der Einzelgabe von Cisplatin war keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Durch die Behandlung mit Paclitaxel wurde die Apoptoserate zwar nicht signifikant verändert, jedoch kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Anteils an vitalen Zellen. Nach kombinierter Gabe von Cisplatin und Paclitaxel zeigte sich ein vergleichbarer Effekt, somit schien die Kombination dieser beiden Therapeutika im Vergleich zu der Einzelanwendung keine Veränderung der Apoptoserate zu bewirken. Die Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU führte zu einem signifikanten prozentualen Anstieg der spätapoptotischen Zellen verbunden mit einer signifikanten Reduktion der vitalen Zellen, wobei in diesem Fall der Effekt von 5-FU dominant zu sein schien. Eine Behandlung der PeC4-Zellen mit Olaparib erhöhte den Anteil an früh- und spätapoptotischen Zellen ebenfalls statistisch signifikant. Der Anteil an vitalen Zellen wurde dementsprechend durch die Therapie reduziert. In den PeC4-Zellen war die Wirkung von Olaparib insgesamt stärker als die der Standardtherapie.



**Abbildung 14: Apoptose- und Nekroserate der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzelbehandlung mit Olaparib**

Anteil vitaler, frühapoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Zellen in den PeC3- (A) und PeC4-Zellen (B) nach 72-stündiger Behandlung nach dem Behandlungsschema entsprechend Tabelle 12 unter Abschnitt 3.2.4.5. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. X-Achse: Angabe der Therapeutika. Y-Achse: % der Zellpopulation an vitalen, frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

**A:**  $n = 4$ , **B:**  $n = 5$ .

Nekrotische Effekte waren kaum detektierbar und erhöhten sich durch die Behandlungen in der Regel nicht signifikant.

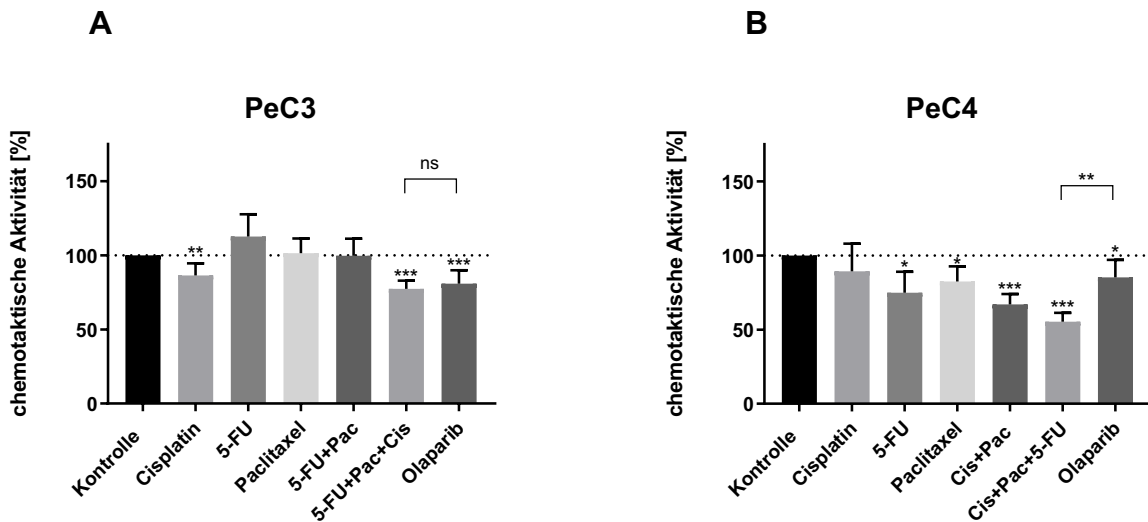
---

#### 4.4 Die Standardtherapie und Olaparib hemmen zelltypspezifisch die chemotaktische Aktivität

Eine 72-stündige Behandlung mit der Standardtherapie oder Olaparib bewirkte zelltypspezifisch eine Reduktion der chemotaktischen Aktivität von PeC3- (Abb. 15A) und PeC4-Zellen (Abb. 15B).

Die Einzelgabe von Cisplatin resultierte in den PeC3-Zellen in einer signifikanten Reduktion der chemotaktischen Aktivität, während die Einzelgabe von 5-FU oder Paclitaxel keine signifikante Veränderung erbrachte (Abb. 15A). Auch die Kombinationstherapie mit 5-FU und Paclitaxel zeigte keinen signifikanten Effekt. Die Standardtherapie bestehend aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin bewirkte hingegen eine signifikante Reduktion der chemotaktischen Aktivität, wobei im Vergleich zur Einzelgabe von Cisplatin die Aktivität um weitere 8,99% verringert werden konnte. Olaparib verminderte in den PeC3-Zellen ebenfalls signifikant die Fähigkeit der Zellen, einem chemotaktischen Stimulus zu folgen. Der Effekt der Standardtherapie und von Olaparib war dabei vergleichbar groß und resultierte im Vergleich zu den Kontrollzellen in einer Reduktion der chemotaktischen Aktivität um etwa 20%.

In den PeC4-Zellen hatte die Einzelgabe von Cisplatin keinen signifikanten Effekt auf die Chemotaxis. Als Einzeltherapie reduzierte 5-FU die chemotaktische Aktivität verglichen mit der Kontrolle signifikant auf 74,88% und Paclitaxel auf 82,44% (Abb. 15B). Eine kombinierte Gabe von Cisplatin und Paclitaxel verminderte die Fähigkeit von PeC4-Zellen einem chemotaktischen Stimulus zu folgen weiter auf 67,06%. Die Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU reduzierte die chemotaktische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle schließlich um fast 50%. Olaparib hatte einen signifikant geringeren Effekt auf die Chemotaxis von PeC4-Zellen als die Standardtherapie, führte aber gegenüber der Kontrolle dennoch zu einer signifikanten Reduktion der chemotaktischen Aktivität auf 85,22%.



**Abbildung 15: chemotaktische Aktivität der PeC3-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib**

Chemotaktische Aktivität der PeC3- (A) und PeC4-Zellen (B) nach einer 72-stündigen Behandlung nach dem Behandlungsschema entsprechend Tabelle 12 unter Abschnitt 3.2.4.5. Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen (gepunktete Linie). Die Werte wurden zur Kontrolle (100%) normalisiert. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Therapeutika. Y-Achse: chemotaktische Aktivität [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. beim Vergleich zwischen Standardtherapie und Olaparib: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant. A:  $n = 7$ , B:  $n = 5$ .

#### 4.5 Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die Migration

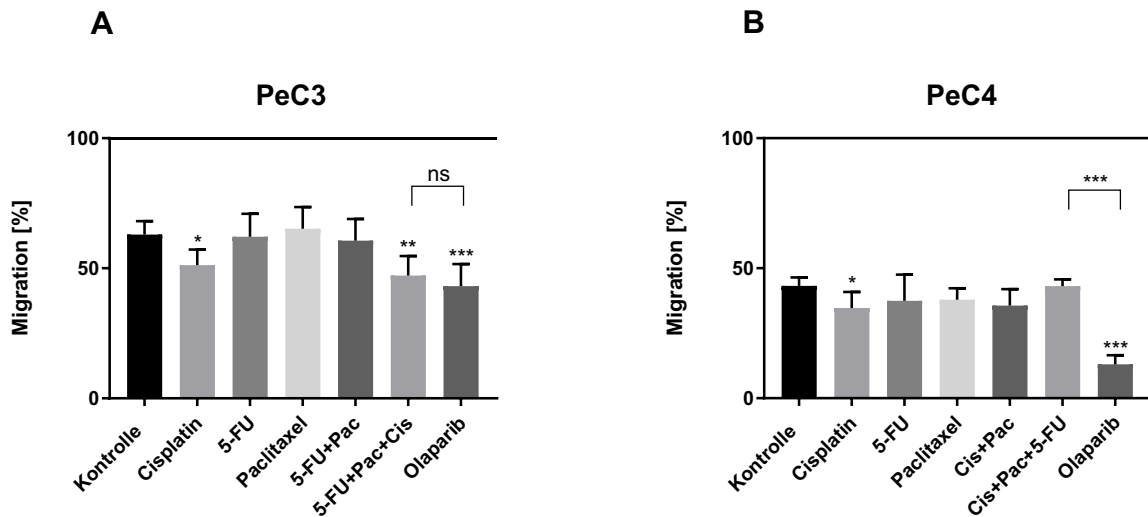
Eine Behandlung mit der Standardtherapie oder Olaparib beeinflusste zelltypspezifisch die Migration der PeC-Zellen (Abb. 16). Bereits bei Etablierung des *Scratch-Wound-Migration*-Assays wurde ersichtlich, dass die Zelllinien unbehandelt ein unterschiedlich schnelles Migrationsverhalten aufwiesen. Aus diesem Grund wurde nach einer Vorbehandlung von 12 h für die PeC3-Zellen eine Migrationszeit von 11 h (Gesamtbehandlungszeit somit 23 h) und für die PeC4-Zellen eine Migrationszeit von 24 h (Gesamtbehandlungszeit somit 36 h) gewählt. Weiterhin war auch optisch ein Unterschied zwischen den PeC3- und PeC4-Zellen erkennbar. Die PeC3-Zellen migrierten zusammenhängend und mit einer klar abgrenzbaren Front, während die PeC4-Zellen vereinzelt oder in kleinen Gruppen in die freie Fläche migrierten und diese so verkleinerten.

Die unbehandelten PeC3-Zellen zeigten eine Migration, die in einer Schließung der „Wunde“ zu 62,94% im Vergleich zur Ausgangsfläche der „Wunde“ (100%) resultierte (Abb. 16A). Nach Einzelgabe von Cisplatin schloss sich die „Wunde“ nur noch zu 51,22% und erzeugte damit im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Verminderung der Migration. Die Einzeltherapie mit 5-

---

FU oder Paclitaxel führte zu keiner signifikanten Veränderung der Migration. Auch die kombinierte Gabe dieser Therapeutika änderte dieses Ergebnis nicht. Die Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin im Rahmen der Standardtherapie verringerte die Migration allerdings signifikant, wobei die Ausgangsfläche auf 47,21% verkleinert wurde. Olaparib verminderte die Migration der PeC3-Zellen auf 43,1%. Die Effekte der Standardtherapie und von Olaparib auf die Migration von PeC3-Zellen unterschieden sich damit nicht signifikant und waren vergleichbar.

Unbehandelte PeC4-Zellen migrierten in die „Wunde“ und schlossen diese zu 43,22% (Abb. 16B). In den PeC4-Zellen reduzierte Cisplatin die Migration verglichen mit der Kontrolle signifikant um weitere 8,51% der Ausgangsfläche. Die Einzelgabe von 5-FU oder Paclitaxel hatte keinen signifikanten Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen. Die Kombinationstherapie aus Paclitaxel und Cisplatin führte ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion der Migration im Vergleich zur Kontrolle. Nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU war die „Wunde“ zu 43,09% geschlossen, die Migration war somit vergleichbar den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu schloss Olaparib die „Wunde“ zu 13% und bewirkte damit gegenüber der Kontrolle und der Standardtherapie eine signifikant stärkere Reduktion der Migration der PeC4-Zellen.



**Abbildung 16: Migration der PeC-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib**

Scratch-Wound-Migration-Assay der PeC3-Zellen nach einer Vorbehandlung von 12 h und einer Weiterbehandlung und Migrationszeit von weiteren 11 h (A). Scratch-Wound-Migration-Assay der PeC4-Zellen nach einer Vorbehandlung von 12 h und einer Weiterbehandlung und Migrationszeit von weiteren 24 h (B). Die Migration wird definiert als geschlossene Fläche im Verhältnis zur Ausgangsfläche (= „Wunde“; 100%, durchgezogene Linie). Das Behandlungsschema entsprach dem in Tabelle 12 unter Abschnitt 3.2.4.5 angegebenen. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Therapeutika. Y-Achse: Migration [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bzw. beim Vergleich zwischen Standardtherapie und Olaparib: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant.

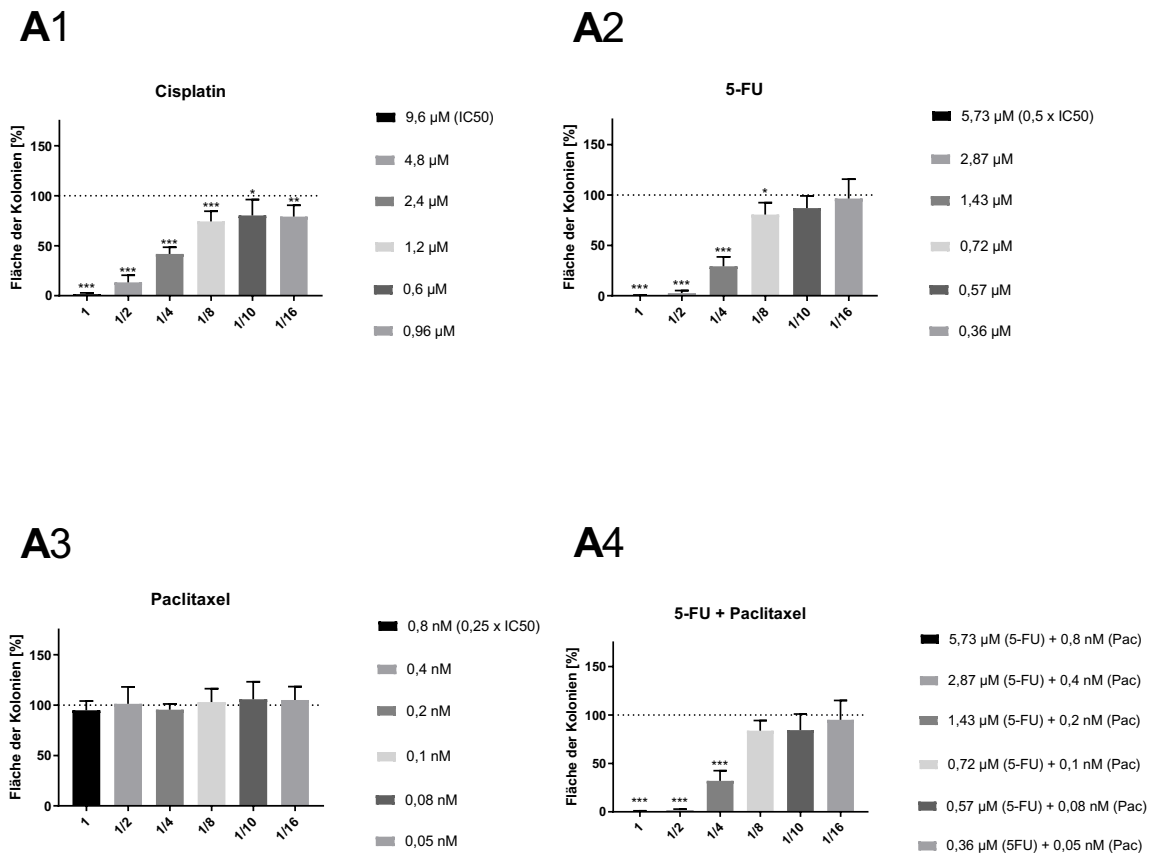
A:  $n = 5$ , B:  $n = 4$ .

#### 4.6 Die Standardtherapie und Olaparib inhibieren das klonogene Wachstum

Das klonogene Wachstum von PeC3- und PeC4-Zellen konnte konzentrationsabhängig durch die Standardtherapie und Olaparib gehemmt werden (Abb. 17-20).

In den PeC3-Zellen konnte die Einzelbehandlung mit Cisplatin in allen untersuchten Konzentrationen das klonogene Wachstum signifikant reduzieren (Abb. 17A1). Bei Exposition der beim Wachstum ausgewählten Konzentration von 9,6  $\mu\text{M}$  Cisplatin ( $\text{IC}_{50}$  nach 72 h) war lediglich noch ein klonogenes Wachstum von 1,47% im Vergleich zur Kontrolle (100%) messbar. Die Koloniebildung war somit fast vollständig unterbunden. Auch nach einer 16-fachen Verdünnung der Cisplatin-Konzentration war eine signifikante Verringerung der Koloniefäche zu beobachten, wobei die Koloniefäche noch 79,1% im Vergleich zur Kontrolle betrug. 5-FU inhibierte als Einzeltherapie bis zu einer 8-fachen Verdünnung das klonogene Wachstum der PeC3-Zellen signifikant, wobei die ursprüngliche Konzentration von 5,73  $\mu\text{M}$  5-FU ( $0,5 \times \text{IC}_{50}$  nach 72 h) das Wachstum fast vollständig verhinderte (Abb. 17A2). Während

Paclitaxel allein keinen signifikanten Einfluss auf die Koloniebildung hatte, führte es in Kombination mit 5-FU bis zu einer vierfachen Verdünnung der Ursprungskonzentration zu einer signifikanten Inhibition (Abb. 17A3, A4).



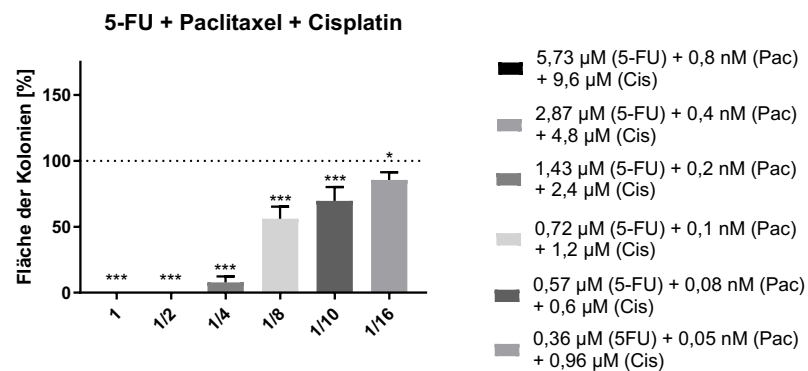
**Abbildung 17: klonogenes Wachstum der PeC3-Zellen nach Einzeltherapie mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel und der Kombinationstherapie aus 5-FU und Paclitaxel**

Fläche der PeC3-Kolonien nach einer Einzeltherapie mit Cisplatin (A1), 5-FU (A2) oder Paclitaxel (A3) und der Kombinationstherapie aus 5-FU und Paclitaxel (A4). Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Die Legenden zeigen die verwendeten Konzentrationen. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Die Werte wurden zur Kontrolle (100%, gepunktete Linie) normalisiert. Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Verdünnung mit entsprechender Konzentrationsangabe in der Legende. Y-Achse: Fläche der Kolonien [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . A1, A2, A3: n = 5, A4: n = 4.

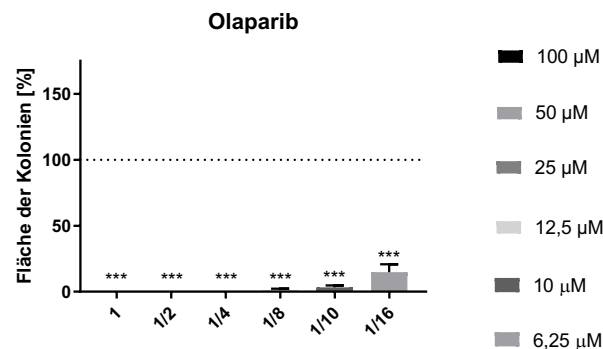
Im Vergleich zur Zweierkombination konnte die Standardtherapie mit Paclitaxel, 5-FU und Cisplatin das klonogene Wachstum noch weiter vermindern (Abb. 18A5). Bei Applikation mit den ursprünglichen Konzentrationen sowie bei deren Halbierung konnte kein Wachstum mehr detektiert werden. Nach vierfacher Verdünnung war mit einer Koloniefläche von 7,81% nach wie vor eine starke Inhibition zu verzeichnen, die dann bei einer 8-fach Verdünnung der Konzentrationen auf eine Koloniefläche von 56,08% anwuchs. Bei 16-facher Verdünnung der Ausgangskonzentrationen der Dreierkombination wurde die Koloniefläche auf 85,52%

reduziert und wies damit immer noch einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Nach Gabe von Olaparib war das klonogene Wachstum der PeC3-Zellen kaum detektierbar (Abb. 18A6). Bei Anwendung der Ursprungskonzentration von 100  $\mu\text{M}$  sowie nach deren Halbierung und vierfachen Verdünnung konnte keine Koloniebildung festgestellt werden. Bei 8-facher Verdünnung betrug die Fläche der Kolonien 1,22% und bei 10-facher Verdünnung 3,29%. Auch nach 16-facher Verdünnung der ursprünglichen Olaparib-Konzentration war die Koloniebildung mit einer Fläche von 14,73% noch signifikant inhibiert.

### A5



### A6

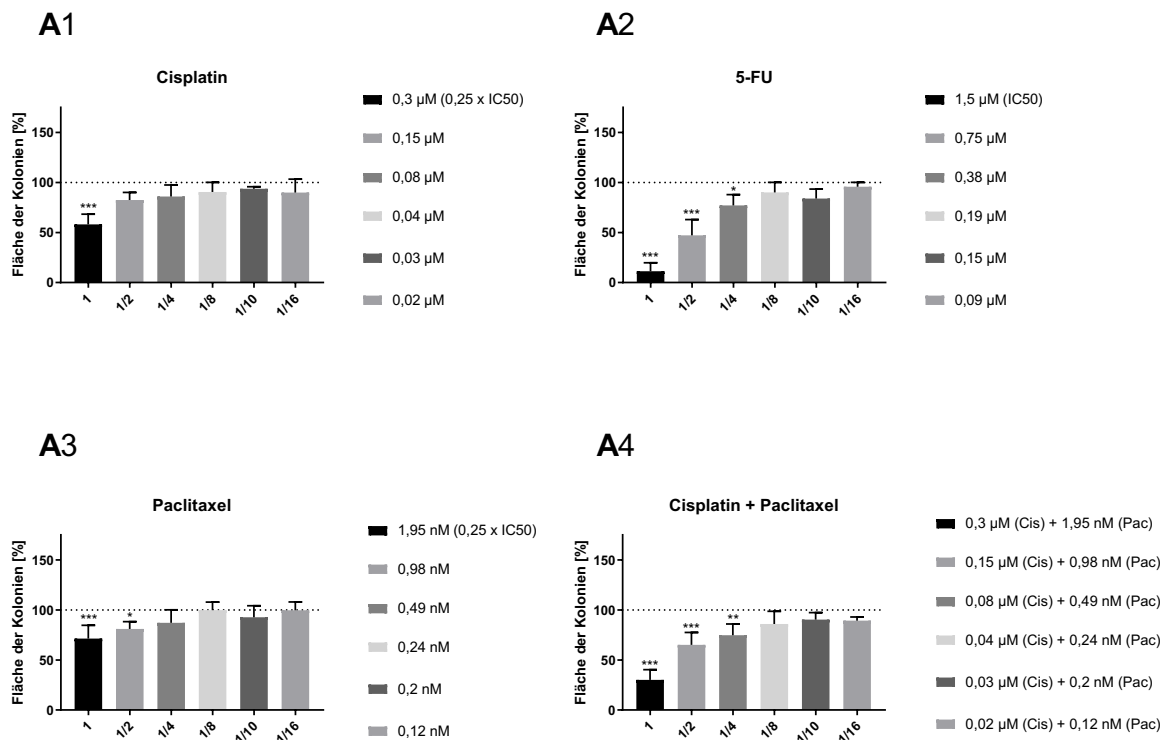


**Abbildung 18: klonogenes Wachstum der PeC3-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib**

Fläche der PeC3-Kolonien nach einer Behandlung mit der Standardtherapie aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin (A5) oder der Einzeltherapie mit Olaparib (A6). Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Die Legenden zeigen die verwendeten Konzentrationen. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Die Werte wurden zur Kontrolle (100%, gepunktete Linie) normalisiert. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Verdünnung mit entsprechender Konzentrationsangabe in der Legende. Y-Achse: Fläche der Kolonien [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . A5:  $n = 4$ , A6:  $n = 5$ .

In den PeC4-Zellen konnte eine Einzelgabe von Cisplatin ausschließlich mit der aus dem Wachstum gewählten Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  (0,25 x IC50 nach 72 h) eine signifikante

Verminderung der Koloniebildung bewirken und führte dabei zu einer Koloniefäche von 58,1% (Abb. 19A1). Eine Einzeltherapie mit 5-FU konnte hingegen bis zu einer vierfachen Verdünnung der ursprünglichen Konzentration eine signifikante Reduktion des klonogenen Wachstums erzeugen (Abb. 19A2). Die Ausgangskonzentration von 5-FU (IC50 nach 72 h) reduzierte die Fläche der Kolonien auf 11,24%. Paclitaxel inhibierte das klonogene Wachstum nur in den beiden höchsten Konzentrationen signifikant, wobei es die Fläche der Kolonien in seiner höchsten Konzentration von 1,95 nM (0,25 x IC50 nach 72 h) auf 71,4% und mit einer Konzentration von 0,98 nM auf 81,01% senkte (Abb. 19A3). In der Kombination mit Cisplatin bewirkte Paclitaxel bei Verwendung der Ausgangskonzentrationen eine Reduktion der Koloniebildung auf 30,12% und resultierte bis zu einer vierfachen Verdünnung mit einer Fläche von 74,69% in einem signifikanten Effekt (Abb. 19A4).



**Abbildung 19: klonogenes Wachstum der PeC4-Zellen nach Einzeltherapie mit Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel und der Kombinationstherapie aus Cisplatin und Paclitaxel**

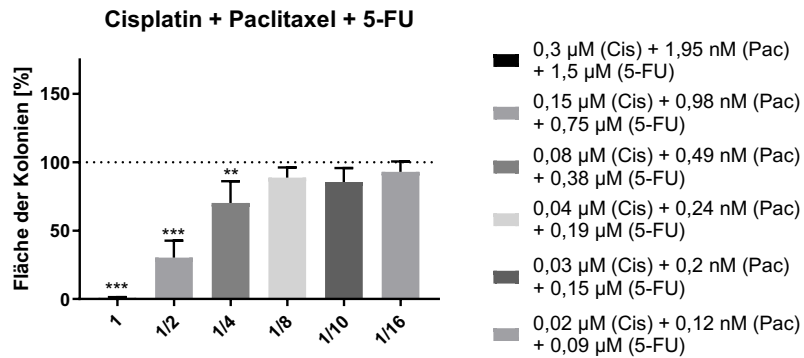
Fläche der PeC4-Kolonien nach einer Einzeltherapie mit Cisplatin (A1), 5-FU (A2) oder Paclitaxel (A3) und der Kombinationstherapie aus Cisplatin und Paclitaxel (A4). Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Die Legenden zeigen die verwendeten Konzentrationen. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Die Werte wurden zur Kontrolle (100%, gepunktete Linie) normalisiert. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Verdünnung mit entsprechender Konzentrationsangabe in der Legende. Y-Achse: Fläche der Kolonien [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . A1, A2, A4:  $n = 4$ , A3:  $n = 5$ .

Die Standardtherapie aus Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU führte in den PeC4-Zellen ebenfalls

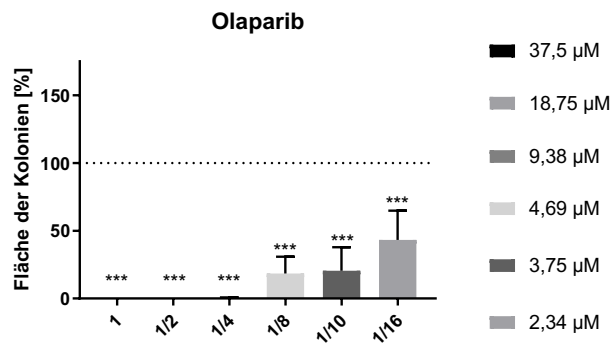
---

bis zu einer vierfachen Verdünnung der Ausgangskonzentrationen zu einem signifikanten Effekt, wobei die Fläche der Kolonien weiter auf 70,27% reduziert wurde (Abb. 20A5). Mit einer Koloniefäche von 0,82% bewirkten die Ausgangskonzentrationen allerdings eine fast vollständige Inhibition des klonogenen Wachstums. Die halbierten Konzentrationen verminderten die Fläche noch auf 30,23%. Die Exposition mit Olaparib verhinderte in seiner höchsten Konzentration von 37,5  $\mu\text{M}$  sowie deren Hälfte vollständig das klonogene Wachstum der PeC4-Zellen (Abb. 20A6). Mit einer Koloniefäche von 0,38% ergab sich auch mit der vierfachen Verdünnung noch eine fast vollständige Inhibition des klonogenen Wachstums. Eine weitere Verdünnung auf 1/8 der Ausgangskonzentration reduzierte die Fläche der Kolonien auf 18,41% und eine Verdünnung von 1/10 auf 20,47%. Auch bei 16-facher Verdünnung der ursprünglichen Olaparib-Konzentration war mit einer Verminderung der Koloniebildung auf 43,26% noch ein signifikanter Effekt vorhanden.

## A5



## A6



### Abbildung 20: klonogenes Wachstum der PeC4-Zellen nach Standardtherapie oder Einzeltherapie mit Olaparib

Fläche der PeC4-Kolonien nach einer Behandlung mit der Standardtherapie aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin (A5) oder der Einzeltherapie mit Olaparib (A6). Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Die Legenden zeigen die verwendeten Konzentrationen. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Die Werte wurden zur Kontrolle (100%, gepunktete Linie) normalisiert. Cis = Cisplatin, Pac = Paclitaxel. X-Achse: Angabe der Verdünnung mit entsprechender Konzentrationsangabe in der Legende. Y-Achse: Fläche der Kolonien [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . A5:  $n = 4$ , A6:  $n = 5$ .

Beide PeC-Zelllinien zeigten somit eine stärkere Inhibition des klonogenen Wachstums nach Applikation mit Olaparib im Vergleich zur Standardtherapie mit Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel.

## 5 Diskussion

Das metastasierte PeC stellt den behandelnden Arzt vor das Problem, dem Patienten weder in der Erst- noch in der Zweitlinie eine anhaltend wirksame Therapie anbieten zu können (2, 4-6, 75). Bei der Suche nach neuen Therapiestrategien könnte das PeC dabei von bereits in anderen Krebsarten erfolgreich eingesetzten Therapeutika profitieren (7). Die in der PeC-

---

Zelllinie PeC3 festgestellte Mutation im BRCA1-Gen warf die Frage auf, ob die für andere Krebsarten zugelassenen PARP-Inhibitoren eine solche neue Therapie darstellen könnten. Basierend auf dem Konzept der synthetischen Letalität haben PARP-Inhibitoren eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber Tumoren mit Defiziten in der DNA-Reparatur durch HR und damit auch gegenüber BRCA-mutierten Tumoren (123-126). Da bereits festgestellt wurde, dass auch Patienten ohne eine solche Mutation auf die Therapie mit PARP-Inhibitoren ansprechen (127, 128), wurde eine zweite PeC-Zelllinie, PeC4, für einen Vergleich mit PeC3 hinzugezogen, die keine Veränderungen in den die HR-betreffenden Genen aufwies. Hierdurch konnte evaluiert werden, ob und inwieweit die BRCA-Mutation für die Wirksamkeit des PARP-Inhibitors Olaparib erforderlich ist. Das Potential einer Therapie mit Olaparib wurde durch einen Vergleich mit der zurzeit als systemische Standardtherapie geltenden Kombinationstherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel bestimmt. Für das PeC liegen zu dieser Kombinationstherapie lediglich publizierte Daten aus klinischen Studien vor (3, 26, 37). In dieser Arbeit wurden somit erstmalig *in vitro* Untersuchungen zu der Therapie an primären PeC-Zellen durchgeführt. Durch ein schrittweises Vorgehen und die quantitative Bestimmung der Wechselwirkungen mittels des Programms CompuSyn war sowohl eine Aussage zur Wirksamkeit der einzelnen Therapeutika als auch ein Vergleich der Einzelgabe mit den Zweier- und Dreierkombinationen der Therapeutika möglich.

## 5.1 Evaluation der optimalen Dosis und des Tumorzellwachstums

### 5.1.1 In vitro Etablierung der Standardtherapie bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel

#### 5.1.1.1 Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel inhibieren als Einzelbehandlung das Tumorzellwachstum

Durch Cisplatin, 5-FU oder Paclitaxel ließ sich in der Einzeltherapie das Tumorzellwachstum der PeC3- und PeC4-Zellen signifikant hemmen. Für Cisplatin und 5-FU wurde an Zelllinien, die aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Nackenbereichs (HNSCC) stammten, vergleichbare Versuche durchgeführt (129). Im MTT-Test wurden dabei in mehreren Zelllinien für Cisplatin IC50-Werte in einem Bereich von 0,44 – 3,4 µg/ml und für 5-FU in einem Bereich von 2,3 – 4,67 µg/ml ermittelt. Mit den umgerechneten IC50-Werten für Cisplatin lagen sowohl die PeC3-Zellen mit 2,88 µg/ml als auch die PeC4-Zellen mit 0,36 µg/ml in diesem Bereich. Die Effekte in den PeC-Zellen waren somit vergleichbar mit denen in den SCC-Zellen anderen Ursprungs, wobei insbesondere die PeC4-Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Cisplatin aufwiesen. Verglichen mit dem für HNSCC-Zellen ermittelten Bereich für 5-FU waren sowohl die PeC3-Zellen mit 1,49 µg/ml und die PeC4-Zellen mit 0,2 µg/ml sensitiver gegenüber 5-FU. Die PeC3- und PeC4-Zellen zeigten weiterhin mit IC50-Werten für Paclitaxel von 3,17 nM und 7,78 nM schon bei einer vergleichsweise geringen Konzentration eine Wachstumsinhibition.

---

Die in anderen MTT-Versuchen an HNSCC-Zellen ermittelten IC50-Werte für Paclitaxel lagen mit 30 nM bzw. 41 nM deutlich höher (130).

Die PeC3- und PeC4-Zellen zeigten eine unterschiedliche Sensitivität im MTT-Test. Die PeC4-Zellen waren dabei gegenüber Cisplatin und 5-FU etwa 8-mal sensitiver als die PeC3-Zellen. Im Gegensatz dazu waren die PeC3-Zellen etwa doppelt so anfällig für eine Inhibition durch Paclitaxel wie die PeC4-Zellen. Eine Resistenz von BRCA1-defizienten Zellen gegen Mikrotubuli-Gifte wie Paclitaxel, wie sie in wenigen *in vitro* Studien festgestellt wurde, ließ sich demnach aus den Ergebnissen nicht ableiten (131). Diese Resistenz wird mit dem Fehlen des BRCA1-vermittelten G2/M-Phase-Arrest erklärt, dementsprechend wurde ebenfalls eine Sensitivitätssteigerung gegenüber Paclitaxel von Zellen mit funktionsfähigem BRCA1 beobachtet. Im Vergleich zwischen den PeC3- und PeC4-Zellen zeigten sich jedoch gegenteilige Ergebnisse, wobei die BRCA-mutierten PeC3-Zellen sensitiver auf Paclitaxel reagierten als die PeC4-Zellen. Für Zellen mit Defekten unter anderem in den BRCA-Genen ist eine hohe Sensitivität gegenüber Substanzen, die wie Cisplatin DNA-Cross-Links erzeugen, charakteristisch (132). Eine Cisplatinsensitivität wird weiterhin auch als Biomarker für PARP-Inhibitor-sensitive Tumore ohne bekannte Defekte in der Reparatur durch HR diskutiert (8, 133, 134). Zwar führte Cisplatin in der BRCA-mutierten Zelllinie PeC3 zu einer Wachstumsinhibition, jedoch war diese in den PeC4-Zellen um ein Vielfaches stärker und PeC4-Zellen zeigten auch gegenüber Olaparib eine höhere Sensitivität als die PeC3-Zellen. Hier schien demnach eine Cisplatinsensitivität mit einer Sensitivität gegenüber dem PARP-Inhibitor Olaparib einherzugehen, wobei allerdings der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien in Bezug auf Olaparib um den Faktor 2 deutlich geringer war als bei Cisplatin.

#### 5.1.1.2 Eine Kombinationstherapie mit den drei Substanzen Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel verstärkt die Wachstumsinhibition

Da als Standardtherapie beim fortgeschrittenen PeC zurzeit die Kombinationstherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel zum Einsatz kommt, wurde diese Kombination im MTT-Test untersucht. Hierbei konnte im Vergleich zu der Gabe der Einzelstoffe sowohl bei Kombination von zwei Stoffen als auch von drei Stoffen eine weitere Steigerung der Wachstumsinhibition erzielt werden. Dabei waren Verstärkungseffekte detektierbar, die einem additiven Effekt der Therapeutika in Kombination entsprachen. Dies konnte mithilfe des CI-Wertes, der sich für alle gewählten Kombinationen in einem Bereich um 1 bewegte, bestätigt werden. Wie bereits beschrieben, basiert die Empfehlung einer systemischen Therapie mit der Kombination aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel auf retrospektiven Daten aus kleinen klinischen Studien (3, 26, 37). Die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen der Kombinationstherapie der drei Stoffe an PeC-Zellen waren somit weltweit die ersten ihrer Art. Da die Kombinationstherapie auch in SCC anderen Ursprungs eingesetzt wird, gibt es allerdings bereits publizierte *in vitro* Daten zu

---

dieser Therapie in Zellen anderer Tumorentitäten. An HNSCC-Zellen wurde im MTT-Test die kombinierte Therapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel untersucht, wobei Cisplatin als Einzeltherapie zum Vergleich mitgeführt wurde (135). Cisplatin und die Kombinationstherapie wirkten in dieser Studie auf alle verwendeten Zelllinien zytotoxisch, dabei war zwischen Cisplatin und der Kombination kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Weiterhin war die Untersuchung von Zweierkombinationen mit quantitativer Bestimmung der Wechselwirkung schon Gegenstand publizierter Studien, wobei in HNSCC-Zellen synergistische Effekte bei der Kombination aus Paclitaxel und Cisplatin sowie additive Effekte bei der Kombination aus Paclitaxel und 5-FU beschrieben wurden (136). In guter Übereinstimmung mit diesen Daten konnten auch in der vorliegenden Studie an PeC-Zellen insbesondere additive Effekte bei Kombination der Substanzen festgestellt werden. Eine weitere Studie an je einer humanen Lungenkarzinom-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und Ovarialkarzinom-Zelllinie, evaluierte die Interaktion zwischen Cisplatin und Paclitaxel bei sequentieller und simultaner Anwendung, wobei sich die sequentielle Gabe von Paclitaxel gefolgt von Cisplatin als besser erwies, da dort in allen Zelllinien additive Effekte auftraten (137). Die Wechselwirkung zwischen Cisplatin und Paclitaxel war somit therapieplan- und zelllinienabhängig.

Eine kombinierte Therapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel wird in der Klinik beim PeC angewendet, da es so in klinischen Studien im Vergleich zu Einzeltherapie-Studien in einer verbesserten Ansprechrates resultierte (46, 47). Auch in den *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten, bei einem insgesamt guten Ansprechen der Zelllinien auf die Einzelkomponenten, im direkten Vergleich zwischen den Einzelkomponenten und dem kombinierten Einsatz additive Effekte nachgewiesen werden. Obwohl die Chemotherapie in den *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit eine gute Wirkung zeigte, bestehen in der klinischen Anwendung unter chronischer Behandlung Einschränkungen durch entstehende Resistenzen (2, 4-6). Da somit zurzeit in der Klinik keine anhaltend wirksame Therapie für das fortgeschrittene PeC zur Verfügung steht, könnte Olaparib in der klinischen Praxis eine Verbesserung für die Therapie bringen, sofern sich bei den *in vitro* Untersuchungen hinreichend starke Effekte zeigen.

Insgesamt war durch alle in der vorliegenden Studie verwendeten Therapeutika eine Wachstumsinhibition nachweisbar. Die nachfolgenden Versuche dienten dazu, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären sowie den Einfluss der Therapeutika auf weitere Parameter zu untersuchen.

#### 5.1.2 Olaparib inhibiert als Einzelbehandlung das Tumorzellwachstum

Durch Olaparib ließ sich als Einzeltherapie das Tumorzellwachstum von PeC3- und PeC4-Zellen signifikant hemmen. Auch in einer Studie mit 14 verschiedenen Brustkrebszelllinien

---

wurden die Effekte von Olaparib auf das Tumorzellwachstum evaluiert, wobei sich nach einer Behandlung von 5 Tagen ein Bereich der IC<sub>50</sub>-Werte von 4,2 – 19,8 µM ergab (138). Aufgrund der abweichenden Behandlungszeit besteht keine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, berücksichtigt man allerdings die Zunahme der Wirksamkeit mit der Zeit, siehe klonogenes Wachstum, dürfte zumindest der 5-Tage-Wert für die Zelllinie PeC4, der nach 72 h 24,96 µM betrug, in diesem Bereich liegen.

Olaparib resultierte in beiden Zelllinien in einer signifikanten Wachstumsinhibition, wobei die PeC4-Zellen etwa doppelt so sensitiv wie die PeC3-Zellen auf Olaparib reagierten. Ein Hinweis, dass die BRCA1-Mutation die Sensitivität gegenüber Olaparib erhöht, konnte anhand der gewonnenen Ergebnisse somit nicht gezeigt werden. Eine Unabhängigkeit der Olaparib-Sensitivität von BRCA1 konnte bereits für verschiedene Brustkrebszelllinien beschrieben werden (138). In Übereinstimmung mit ähnlichen Daten von Lehmann et al. (139) wurde in der Studie von Pierce et al. dabei eine geringe Sensitivität einer Zelllinie mit BRCA1-Mutation gegenüber Olaparib festgestellt. Es wurde daraufhin postuliert, dass das Vorliegen einer solchen Mutation als Biomarker für ein Ansprechen auf PARP-Inhibitoren alleine nicht immer ausreichend ist. Auch in klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nur einige Patienten mit BRCA-mutierten Tumoren auf PARP-Inhibitoren ansprachen (124, 125). Andersherum konnte aber auch nachgewiesen werden, dass Patienten mit Tumoren ohne BRCA-Mutation von der Behandlung mit einem PARP-Inhibitor profitieren können (127, 128). So wurde auch Olaparib auf Grundlage entsprechender klinischer Studien im Jahr 2017 von der FDA zur Erhaltungstherapie von Eierstockkrebs unabhängig von dem BRCA1/2-Mutationsstatus zugelassen (113-116). Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, um molekulare Merkmale von BRCA-mutierten Tumoren zu finden, die als Biomarker dienen und so eine erweiterte Anwendung von PARP-Inhibitoren ermöglichen könnten. Der Begriff „BRCAness“ beschreibt dabei einen molekularen Phänotyp von BRCA-mutierten Tumoren, der durch eine Reihe von genomischen, epigenetischen oder posttranslationalen Veränderungen entstehen kann (140). Es konnte in diesem Zusammenhang bereits nachgewiesen werden, dass eine epigenetische Stilllegung von BRCA1 *in vitro* und *in vivo* eine Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren hervorrufen kann (141). Von Pilié et al. wurde vorgeschlagen, den Begriff „BRCAness“ auf „HRDness“ zu erweitern, um BRCA-unabhängige Defekte der HR miteinzubeziehen (8). Als „PARPness“ bezeichneten sie weiterführend eine Untergruppe an Tumoren, die trotz fehlender Defekte in der HR eine Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren aufwiesen. „PARPness“ könnte dabei durch „PARP trapping“ oder durch das Aufheben der PARP-Aktivität in anderen Prozessen als der BER, wie beispielsweise in der alternativen NHEJ oder dem Schutz der Replikationsgabel, bedingt sein (142, 143). Für „PARPness“ sind schon verschiedene potentielle Biomarker bekannt (144-151). Weiterhin wurden Multigenexpressions-Signaturen auf Grundlage von Sensitivitäts- und Resistenzprofilen von

---

Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs erstellt, die in präklinischen Studien ein Ansprechen gegenüber PARP-Inhibitoren und in retrospektiven klinischen Studien auch gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin vorhersagen konnten (152). Hierüber soll eine bessere Vorhersage von „PARPness“ möglich sein als über den BRCA1/2-Mutationsstatus oder Defekte in der HR. Weitere Mechanismen, durch die eine Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren besteht, müssen noch untersucht werden. Die Zelllinie PeC4 aus der vorliegenden Arbeit wurde mittels Exomsequenzierung untersucht, wobei weder Mutationen in den BRCA1/2-Genen noch in anderen Genen, die einen Defekt in der HR bedingen, gefunden werden konnten. Trotzdem zeigte diese Zelllinie eine doppelt so hohe Sensitivität gegenüber Olaparib wie die BRCA1-mutierte Zelllinie PeC3. Anknüpfend an die vorherigen Ausführungen, könnte eine epigenetische oder posttranskriptionale Veränderung eines BRCA-Gens oder eines anderen Gens, welches die HR beeinträchtigen kann, eine mögliche Ursache sein. Diese Veränderungen wären bei der Exomsequenzierung nicht sichtbar gewesen. Weiterhin ist auch im Sinne einer möglichen „PARPness“ eine Veränderung in einem HR-unabhängigen Bereich möglich. Auch *Off-target*-Effekte von Olaparib wie das „PARP trapping“ oder der Ausfall von PARP1 in anderen Bereichen als in der BER könnten eine solche „PARPness“ in den PeC4-Zellen hervorgerufen haben. Entsprechende weitere Untersuchungen der Zelllinie PeC4 sind notwendig, um dies abschließend zu klären.

Die Untersuchungen dieser Arbeit umfassten einen Vergleich der Zelllinien PeC3 und PeC4. Es ist dabei denkbar, dass statt der besonders hohen Sensitivität der PeC4-Zellen gegenüber Olaparib andersherum die PeC3-Zellen eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Olaparib aufweisen könnten. Bei näherer Betrachtung der BRCA-Mutation der PeC3-Zellen bleibt zu erwähnen, dass es sich um eine heterozygote Frameshift-Mutation im BRCA1-Gen handelte. Generell ist das Potential zur Vorhersage eines Ansprechens gegenüber PARP-Inhibitoren mittels Mutationen noch unklar, da die meisten in den Genen entdeckten Varianten noch von unbestimmter funktioneller Bedeutung sind (8). In diesem Fall lag zwar eine Frameshift-Mutation vor, die zu einem funktionsunfähigen Protein führen kann, jedoch lag diese Mutation bei den PeC3-Zellen in heterozygoter Form vor. Der Ausgleich durch ein zweites unverändertes Allel ist somit möglich. Zwar bleibt eine Haploinsuffizienz, also das Vorkommen eines abnormen Phänotyps bei haploidem Zustand eines Gens, für BRCA1 oder auch BRCA2 noch eine formelle Möglichkeit, allerdings deutet die Mehrheit der hierzu durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass dies insbesondere für die Funktionen in der DNA-Reparatur nicht der Fall ist (153). In den Untersuchungen von Drew et al. wurde die antitumorale Wirkung des PARP-Inhibitors Rucaparib *in vitro* und *in vivo* an unterschiedlichen humanen Mamma-, Pankreas- und Ovarialkarzinomzellen mit verschiedenen Zuständen der BRCA1/2-Gene getestet (141). Während zytotoxische Effekte auf Zellen mit mutierten oder epigenetisch veränderten BRCA1/2-Genen festgestellt werden konnten, waren diese weder in Zellen ohne

---

Mutationen in solchen Genen noch bei Zellen, die eine heterozygote Mutation im BRCA2-Gen aufwiesen, vorhanden. Es ist somit fraglich, inwieweit die Mutation der PeC3-Zellen im BRCA1-Gen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Olaparib nehmen konnte.

Eine weitere mögliche Ursache für die geringere Sensitivität der PeC3-Zellen gegenüber dem PARP-Inhibitor Olaparib könnte eine Resistenz sein. Eine Resistenz gegen PARP-Inhibitoren kann angeboren oder erworben sein (8). Die potentiellen Mechanismen sind vielfältig und können multifaktoriell sein, wobei drei Hauptkategorien abgrenzbar sind: die Wiederherstellung der Reparaturaktivität der HR, die Aktivierung von Signalwegen, die den Progress des Zellzyklus und den Replikationsstress herabsetzen, sowie verschiedene Mechanismen, die nicht einem einzelnen DNA-Reparaturweg zugeordnet werden können. Die DNA-Reparatur durch HR kann mittels direkter Mechanismen, wie der epigenetischen, genomischen oder posttranslationalen Veränderung der HR-Maschinerie selbst, wiederhergestellt werden. So konnten in mehreren Prostata- und Ovarialkarzinomen Sekundärmutationen festgestellt werden, die eine Rückkehr zur Wildtyp-Sequenz und/oder zur ursprünglichen Funktion des Proteins bewirkten, was im Rahmen von HR-Genen eine Wiederherstellung der Reparatur durch HR und damit den Wegfall der synthetischen Letalität bedeutete (154-156). Aufgrund der Exomsequenzierung konnte dies für die PeC3-Zellen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Neben direkten können auch indirekte Mechanismen die Reparatur durch HR wiederherstellen. Beispielsweise kann der Verlust eines anderen Proteins, wie etwa des p53-Binding-Protein 1 (P53BP1), die Verschiebung des Gleichgewichts der DNA-Reparatur von NHEJ zu HR bewirken (157-159). Des Weiteren kann es durch verschiedene Signalwege zur Stabilisierung der Replikationsgabel und damit zu einer Verringerung des Replikationsstress kommen, häufig kombiniert mit einem reduzierten Zellzyklusprogress. Hierdurch kann es unabhängig von der Wiederherstellung der DNA-Reparatur zu einer Resistenz gegen PARP-Inhibitoren kommen (160, 161). Um Resistenzmechanismen zu ermitteln, die nicht einem DNA-Reparaturweg zuordenbar sind, gibt es bereits verschiedene Biomarker. So kann das Protein Schlafen 11 (SLFN11) eine Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren, aber auch eine Resistenz gegen diese anzeigen, wobei eine Inaktivierung von SLFN11 ein Anzeichen für eine Resistenz wäre (162). Wie bei Resistenzen gegen Chemotherapeutika kann weiterhin die erhöhte Expression von P-Glykoprotein, einem Membranprotein, welches Fremdstoffe in den Extrazellularraum befördert, eine Rolle bei der PARP-Inhibitor-Resistenz spielen (163). Zudem können auch Mutationen oder der Verlust von PARP1, die das Binden von Inhibitoren oder das „PARP trapping“ verhindern, die Wirkung von PARP-Inhibitoren unterbinden (164).

Die vorgenannten Studien zeigen, dass es vielfältige Gründe für die unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelllinien PeC3 und PeC4 gegenüber Olaparib geben kann. Weiterführende Untersuchungen könnten Aufschluss über die maßgeblich involvierten

---

Mechanismen geben. In beiden PeC-Zelllinien zeigte sich nach Olaparib-Behandlung eine Wachstumsinhibition, was damit die Forderung unterstützt, den Anwendungsbereich von PARP-Inhibitoren auszuweiten und neben einer BRCA1/2-Mutation noch andere Biomarker miteinzubeziehen (8).

## **5.2 Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die Verteilung der PeC-Zellen auf die Zellzyklusphasen**

Um zu untersuchen, ob die Inhibition des Zellwachstums durch die Standardtherapie und Olaparib auf einem Zellzyklusarrest basieren könnte, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen im Durchflusszytometer evaluiert. Zusätzlich wurde eine isolierte Untersuchung des Anteils der Zellen in der S-Phase mit Hilfe des BrdU-Assays vorgenommen. Im Vergleich der PeC3- und PeC4-Zellen wurde ein zelltypspezifischer Einfluss der Standardtherapie und von Olaparib gemessen.

In den PeC3-Zellen führte die Behandlung mit Olaparib nach 48 h zu einem Arrest in der G2/M-Phase. Durch die Standardtherapie war in den PeC3-Zellen nach einer Behandlung von 48 h hingegen ein S-Phase-Arrest zu verzeichnen. Der S-Phase Arrest nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel schien dabei hauptsächlich durch 5-FU ausgelöst worden zu sein, da bereits die Einzelgabe von 5-FU einen vergleichbaren Anteil an Zellen in der S-Phase bedingte. Cisplatin bewirkte als Einzeltherapie in den PeC3-Zellen einen G2/M- und S-Phase Arrest. Bereits bei der kombinierten Gabe von 5-FU und Paclitaxel dominierte die Wirkung von 5-FU und es war eine ähnliche Verteilung in den Zellzyklusphasen zu sehen. Paclitaxel bewirkte in den PeC3-Zellen hingegen, passend zu diesem Ergebnis, bei Einzelgabe keinen Zellzyklusarrest. Anzumerken bleibt, dass für die PeC3-Zellen eine Konzentration von Paclitaxel gewählt wurde, die noch keine signifikante Wachstumsinhibition bewirkte, somit könnte die Konzentration für eine Auswirkung auf den Zellzyklus zu gering gewesen sein.

In den PeC4-Zellen konnten die Standardtherapie und Olaparib nach 48 h einen G2/M-Phase-Arrest bewirken. Im Gegensatz zu den PeC3-Zellen war bei den PeC4-Zellen durch die Kombination aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel im Vergleich zu den Einzelgaben ein veränderter Effekt auf den Zellzyklus zu sehen. Der Anteil an PeC4-Zellen in der G2/M-Phase wurde vergrößert, wobei dieser G2/M-Phase-Arrest und der zusätzlich signifikant vergrößerte Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase aus einem kombinierten Effekt aus der Einzeltherapie mit Cisplatin und der Einzeltherapie mit 5-FU zu resultieren schien. Wie in den PeC3-Zellen hatte Paclitaxel auch in den PeC4-Zellen als Einzeltherapie keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus, obwohl mit dieser Konzentration eine signifikante Wachstumsinhibition sichtbar war. Hingegen inhibierte Cisplatin das Zellwachstum in der gewählten Konzentration noch

---

nicht signifikant und führte in der Einzelbehandlung trotzdem zu einem G2/M-Phase-Arrest. Weiterhin bewirkte Cisplatin auch in Kombination mit Paclitaxel die Veränderung im Zellzyklus. In humanen Endothelzellen wurde bereits eine Proliferationshemmung durch Paclitaxel in niedrigen Konzentrationen ohne Beeinträchtigung der Mikrotubulstruktur und dementsprechend auch ohne einen G2/M-Phase-Arrest oder eine Apoptoseinduktion beschrieben (165). Daher wird für Paclitaxel ein weiterer, noch nicht identifizierter Wirkungsmechanismus angenommen.

In den meisten Fällen konnten bei isolierter Betrachtung der S-Phase-Anteile mittels BrdU-Assay und der Zellzyklusanalyse vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Methodik und Darstellungsweise kam es jedoch auch zu Abweichungen. So war beispielsweise in der Zellzyklusanalyse in den PeC3-Zellen ein S-Phase-Arrest durch die Behandlung mit der Standardtherapie detektierbar, während der Anteil an Zellen in der S-Phase im BrdU-Assay nach 48 h keine signifikante Veränderung zeigte. Insgesamt ist dabei bei Interpretation des BrdU-Assays zu beachten, dass der Einbau von BrdU abgesehen von der Aktivität der S-Phase auch von der Zellzahl und damit vom Einfluss des Therapeutikums auf das Tumorzellwachstum abhängig ist. In dem oben beschriebenen Fall könnte somit der durch die S-Phase bedingte erhöhte BrdU-Einbau im BrdU-Assay durch die gleichzeitig ausgeprägte Wachstumsinhibition abgeschwächt worden sein.

Aus den Untersuchungen ließ sich insgesamt schließen, dass die zytotoxische Wirkung der Standardtherapie und von Olaparib primär auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist. Die Art des Zellzyklusarrests war bei der Standardtherapie zelllinienspezifisch. In HNSCC-Zellen konnte nach einer Behandlung von 6 h mit dieser Kombinationstherapie ebenfalls ein Zellzyklusarrest, hier in der G0/G1-Phase, festgestellt werden (135). Olaparib bewirkte, in guter Übereinstimmung mit den hier gewonnenen Ergebnissen, einen Arrest in der G2/M-Phase in Ovarialkarzinom-Zellen (166). Eine Studie von Bianchi et al. untersuchte Zervixkarzinom (CC)-Zelllinien, die keinen Defekt in der HR-Reparatur aufwiesen, von denen jedoch einige trotzdem auf Olaparib ansprachen (167). Während die Olaparib-resistenten Zelllinien keine Veränderung des Zellzyklus aufwiesen, konnte in den Zelllinien, die eine Sensitivität gegenüber Olaparib hatten, ein G2/M-Phase-Arrest festgestellt werden, wobei dies auf das „PARP trapping“ zurückgeführt wurde. Weitere Studien beschreiben den Zellzyklusarrest sogar lediglich als *Off-target*-Effekt, also ausgelöst durch Wirkungsweisen von Olaparib, die unabhängig von der Inhibition von PARP1 sind (168-170). Als mögliche *Off-targets* von Olaparib, die den Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bedingen könnten, werden dabei ebenfalls das „PARP trapping“ und die Induktion einer replikativen Stressreaktion aufgeführt (168). Insgesamt deuten die Studien darauf hin, dass die Induktion des G2/M-Phase-Arrests durch Olaparib in beiden PeC-Zelllinien auf *Off-target*-Effekten basieren könnte und damit auch unabhängig von der BRCA1-Mutation in den PeC3-Zellen wäre.

---

### **5.3 Die Standardtherapie und Olaparib erhöhen die Anzahl apoptotischer PeC-Zellen**

Die Standardtherapie und Olaparib resultierten in den beiden PeC-Zelllinien in einer Apoptoseinduktion, aber keiner signifikanten Steigerung der Nekroserate.

In den PeC3-Zellen führte die Standardtherapie zu einem Anstieg des Anteils an früh- und spätapoptotischen Zellen, wobei dies insbesondere auf die Wirkung von 5-FU und Cisplatin zurückzuführen war. Paclitaxel induzierte in den PeC3-Zellen weder als Einzeltherapie einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod, noch hatte es bei Kombination mit 5-FU zusätzliche Auswirkungen auf den Zelltod. Auch in der Standardtherapie zeigte Paclitaxel keinen zusätzlichen Effekt. Die Standardtherapie induzierte in den PeC3-Zellen die Apoptose stärker als Olaparib.

Anders verhielt es sich in den PeC4-Zellen. Hier war offensichtlich primär 5-FU die treibende Kraft in der Standardtherapie für die Apoptoseinduktion. Paclitaxel und Cisplatin induzierten gegenüber der Kontrolle hingegen weder als Einzeltherapie noch in Kombination einen signifikanten Anstieg der Apoptose- oder Nekroserate. Die signifikante Reduktion der vitalen Zellen könnte allerdings ein Hinweis für mögliche zelltodinduzierende Effekte sein. Insgesamt konnte sowohl in den PeC3- als auch in den PeC4-Zellen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, eine Veränderung der Apoptoserate durch eine Behandlung mit der Standardtherapie detektiert werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde die Induktion der Apoptose durch eine Kombinationstherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel bereits an oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC)-Zellen nachgewiesen (135). In SCC-Zellen aus dem Hypopharynx und Larynx konnte nach einer Behandlung mit dieser Kombinationstherapie ebenfalls eine Apoptoseinduktion festgestellt werden (171). Auch für Olaparib konnte ein Effekt auf die Apoptose in anderen Arbeiten bestätigt werden. So konnte in CC-Zellen eine Induktion der Apoptose nach einer Behandlung mit Olaparib nachgewiesen werden (172). In der bereits genannten Studie von Bianchi et al., die CC-Zellen ohne Defekte in der HR untersuchte, konnte Olaparib dosisabhängig ebenfalls eine Apoptose auslösen (167). Auch in den PeC-Zelllinien PeC3 und PeC4 schien die Induktion einer Apoptose unabhängig von der BRCA1-Mutation zu sein.

### **5.4 Die Standardtherapie und Olaparib beeinflussen zelltypspezifisch die chemotaktische Aktivität und die Migration**

Der Einfluss der Standardtherapie und von Olaparib auf die chemotaktische Aktivität der PeC3- und PeC4-Zellen war zelltypspezifisch.

In den PeC3-Zellen hatten die Standardtherapie und Olaparib einen vergleichbaren Effekt auf

---

die Fähigkeit der Zellen einem chemotaktischen Stimulus zu folgen. Dabei schien der größte Teil des Effekts der Kombinationstherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel von Cisplatin auszugehen. In den PeC3-Zellen resultierten die beiden Therapien in einer Reduktion der chemotaktischen Aktivität um etwa 20%.

Im Vergleich dazu war der Effekt der Standardtherapie in der Zelllinie PeC4 mit einer Reduktion der chemotaktischen Aktivität um 50% deutlich größer. Anders als bei den PeC3-Zellen schien der Effekt nicht primär von einem Therapeutikum auszugehen, sondern durch die Kombination der drei Stoffe evoziert worden zu sein. Olaparib hatte in den PeC4-Zellen einen signifikant geringeren Einfluss auf die chemotaktische Aktivität als die Standardtherapie und führte zu einer Reduktion der chemotaktischen Aktivität um etwa 15%.

Auch bei Untersuchung der Migration mittels eines *Scratch-Wound-Migration-Assays* konnten zelltypabhängige Unterschiede festgestellt werden.

In den PeC3-Zellen waren die Effekte der Standardtherapie und Olaparib auf die Migration wieder vergleichbar groß. Dabei bewirkte erneut primär Cisplatin den inhibitorischen Effekt der Standardtherapie. In den PeC4-Zellen hatte die Standardtherapie auf die Migration hingegen keinen signifikanten Einfluss, wobei Cisplatin in der Einzelgabe die Migration zwar geringfügig, jedoch signifikant reduzierte. Olaparib inhibierte die Migration der PeC4-Zellen dafür fast vollständig.

Die Migration von OSCC-Zellen zeigte in einem Doppelkammersystem ohne chemotaktischen Stimulus nach Behandlung mit der Kombinationstherapie aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel ebenfalls eine fast vollständige Inhibition (135). Cisplatin wurde dabei als Einzeltherapie zur Kontrolle mitgeführt und zeigte, wie die Kombinationstherapie, eine fast vollständige Inhibition der Migrationsfähigkeit. Auch die Auswirkung einer Olaparib-Behandlung auf die Migration von OSCC-Zellen mittels *Scratch-Wound-Migration-Assay* wurde untersucht. Dabei konnte eine deutliche Reduktion der Migrationsfähigkeit festgestellt werden (173). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die mRNA-Expression von Markern für die Tumorgenese und die epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) durch Olaparib inhibiert wurden. Die EMT beschreibt die Dedifferenzierung von Epithelzellen zu Mesenchymalzellen, welche im Rahmen der Metastasierung die Lösung der Tumorzellen aus dem Zellverband ermöglicht und somit relevant für die Migration ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch an Nicht-transformierten Epithelzellen der Brustdrüse der Maus (NMuMG) - Zellen, die als Modellsystem für die EMT Anwendung finden (174) - generiert (175). Dabei wurde unter anderem an der sinkenden Migrationsfähigkeit im *Scratch-Wound-Migration-Assay* nachgewiesen, dass Olaparib die EMT verhindern kann. Da die Rolle von PARP1 und der PARylierung bei der EMT umstritten bleibt, können *Off-target*-Effekte von Olaparib hierbei nicht ausgeschlossen werden. Da die NMuMG-Zellen weiterhin keine BRCA-Mutation aufwiesen, wurde aufgrund der Daten dieser

---

Studie postuliert, dass der Wirkungsbereich von Olaparib über BRCA-mutierte Krebsformen und die synthetische Letalität hinausgehen könnte. Tatsächlich schien auch in den PeC3-Zellen der vorliegenden Arbeit die BRCA-Mutation die Wirkung von Olaparib auf die Migration im *Scratch-Wound-Migration-Assay* nicht zu verstärken. Im Gegenteil hatte Olaparib sogar in der PeC4-Zelllinie ohne BRCA-Mutation einen größeren Effekt auf die Migration.

Neben den Unterschieden zwischen den beiden PeC-Zelllinien waren auch in den beiden unterschiedlichen Migrations-Assays differierende Effekte nach der Standardtherapie und der Behandlung mit Olaparib zu beobachten. Tendenziell schien Olaparib dabei die Migration im *Scratch-Wound-Migration-Assay* in beiden Zelllinien effektiver zu inhibieren als die Standardtherapie, wohingegen die Standardtherapie einen größeren Effekt auf die chemotaktische Aktivität aufwies. Dabei ist zu beachten, dass das *Scratch-Wound-Migration-Assay* die Zellmigration in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen den Zellen sowie der Interaktion der Zellen mit der Umgebung untersucht, während das Chemotaxis-Assay mittels Boyden-Kammer eine Migration gelöster Einzelzellen entlang eines Stimulus evaluiert (176, 177). Es ist bekannt, dass die Zell-Zell-Interaktion und die Zellmigration größtenteils von unterschiedlichen Mechanismen kontrolliert werden, sodass es sinnvoll ist, beides getrennt voneinander zu untersuchen (178-182). Durch die Anwendung der beiden unterschiedlichen Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wirkung von Olaparib und der Standardtherapie sich nicht nur zelltypabhängig unterscheiden, sondern auch die Mechanismen, über die sie ihre Wirkung auf die Migration entfalten. Die größeren inhibitorischen Effekte von Olaparib beim *Scratch-Wound-Migration-Assay* könnten darauf hindeuten, dass dieser Wirkstoff einen stärkeren Einfluss auf die Zellinteraktion ausübt als die Standardtherapie. Allgemein kann aus den gewonnenen Daten zur Migration geschlossen werden, dass die Standardtherapie und Olaparib neben dem Einfluss auf das Tumorzellwachstum auch einen signifikanten Einfluss auf die Metastasierung der Tumorzellen haben.

## **5.5 Die Standardtherapie und Olaparib inhibieren das klonogene Wachstum der PeC-Zellen**

In beiden PeC-Zelllinien inhibierten die Standardtherapie und Olaparib dosisabhängig das klonogene Wachstum. In den PeC3- und PeC4-Zellen wurde dabei die Fähigkeit zur Koloniebildung durch Olaparib stärker inhibiert als durch die Standardtherapie. In beiden Zelllinien konnte die Kombinationstherapie das Wachstum im Vergleich zu den Einzeltherapien nochmal stärker verringern. Insgesamt war die Inhibition der Koloniebildung mit deutlich niedrigeren Konzentrationen als eine vergleichbare Wachstumsinhibition im MTT-Test möglich.

---

In guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten konnte auch in SCC-Zellen des Hypopharynx und des Larynx eine Inhibition des klonogenen Wachstums nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel nachgewiesen werden (171). Weiterhin konnte auch an Brustkrebszellen der Einfluss von Olaparib auf das klonogene Wachstum gezeigt werden (138). Dabei war keine erhöhte Sensitivität bei der BRCA-mutierten PeC3-Zelllinie feststellbar. Da Olaparib in beiden Zelllinien eine Reduktion der Koloniebildung bewirkte und dabei effektiver war als die Standardtherapie, zeigte sich auch im klonogenen Wachstums-Assay eine Unabhängigkeit von der BRCA-Mutation. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen in den beiden Zelllinien ist jedoch ein direkter Vergleich der Sensitivität nicht möglich.

Zusammenfassend konnte Olaparib *in vitro* in den PeC3- und PeC4-Zellen einen inhibitorischen Effekt auf das Tumorzellwachstum sowie die Metastasierung induzieren. In beiden Zelllinien bewirkten sowohl die Standardtherapie als auch Olaparib einen Zellzyklusarrest sowie eine Apoptose. In den PeC3-Zellen reduzierten Olaparib und die Standardtherapie die chemotaktische Aktivität und die Migration gleichermaßen. In den PeC4-Zellen inhibierte hingegen die Standardtherapie die chemotaktische Aktivität wirkungsvoller, während Olaparib die Migration nahezu vollständig verhinderte und die Standardtherapie kaum eine Wirkung zeigte. Das klonogene Wachstum wurde in beiden PeC-Zelllinien von Olaparib stärker reduziert als durch die Standardtherapie. Basierend auf diesen ersten *in vitro* Daten postulieren wir, dass Olaparib eine vielversprechende Therapieoption für das PeC darstellen könnte. Da Olaparib auch eine Wirkung auf die PeC4-Zellen ohne BRCA1/2-Mutation hatte, wäre hier, in Übereinstimmung mit Forderungen aus anderen Studien (8), eine Ausweitung des Anwendungsbereichs von PARP-Inhibitoren über BRCA-mutierte Tumore hinaus anzudenken. So war in der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Abhängigkeit von der in den PeC3-Zellen festgestellten Mutation im BRCA1-Gen zu beobachten. Um den Einfluss dieser Mutationen auf die Wirkungsstärke von PARP-Inhibitoren im PeC abschließend zu klären, sind vertiefende Untersuchungen notwendig.

## 6 Zusammenfassung

Peniskarzinome (PeC) sind häufig Plattenepithelkarzinome, die aus den Plattenepithelzellen des *Glans penis*, des *Sulcus coronarius* oder des inneren Blattes des Präputiums hervorgehen. Die Tumorentität ist selten, zeichnet sich jedoch durch ein aggressives Wachstum und eine schnelle Metastasierung in die Lymphknoten aus. Während lokal begrenzte Tumore meist durch einen chirurgischen Eingriff erfolgreich geheilt werden können, stehen für die metastasierte Form des PeC zurzeit keine anhaltend wirksamen Behandlungsstrategien zur Verfügung. Als systemische Therapie wird hier am häufigsten die Kombination aus den Chemotherapeutika Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Paclitaxel

---

angewendet. Diese Therapie ist jedoch lediglich mit einer Ansprechrate von etwa 30% und einem progressionsfreien Überleben von 20 Wochen assoziiert. Auf der Suche nach neuen Behandlungsstrategien, konnten Untersuchungen des Genoms von fortgeschrittenem PeC zeigen, dass mehr als ein Viertel der Patienten mit einem metastasierten Tumor von bereits verfügbaren Therapien profitieren könnten. Nach Fund einer BRCA1-Mutation in der primären PeC-Zelllinie PeC3 wurde in der vorliegenden Studie daher weltweit erstmalig die Wirksamkeit des Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitors Olaparib im Vergleich zu der Standardtherapie mit Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel evaluiert. Olaparib wird bereits erfolgreich bei anderen BRCA-mutierten Krebsformen eingesetzt. Um die Abhängigkeit von der BRCA-Mutation zu überprüfen, wurde zusätzlich die Zelllinie PeC4 ohne eine solche Mutation in die Vergleichsstudien miteinbezogen.

Für die Studien wurde zunächst für die primären PeC-Zelllinien PeC3 und PeC4 *in vitro* eine geeignete Konzentration der Standardtherapie, bestehend aus Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel, sowie von Olaparib etabliert. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten im 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)-Test nach Einzelgabe sowie nach kombinierter Gabe untersucht und die Wechselwirkung mittels des Programms CompuSyn quantifiziert. Nach Etablierung der Standardtherapie erfolgte ein Vergleich der BRCA1-mutierten PeC3-Zellen mit den PeC4-Zellen nach Behandlung mit Olaparib sowie der Standardtherapie. Hierzu wurde das progressive Wachstumsverhalten mithilfe des MTT-Tests evaluiert. Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden die Verteilung in den Zellzyklusphasen sowie die Apoptose- und Nekroserate der PeC-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Das Metastasierungspotential der PeC-Zellen wurde nach den unterschiedlichen Behandlungen mittels des Chemotaxis-, des *Scratch-Wound-Migration*-Assays und des klonogenen Wachstums-Assays untersucht.

Sowohl Olaparib als auch die Standardtherapie konnten das Tumorzellwachstum der PeC-Zelllinien inhibieren. Die Wachstumsinhibition ließ sich dabei auf Veränderungen im Zellzyklus und eine Induktion der Apoptose zurückführen. So bewirkte die Standardtherapie in den PeC3-Zellen einen S-Phase-Arrest. In den PeC4-Zellen induzierte sie einen Arrest in der G2/M- und der G0/G1-Phase. Olaparib induzierte hingegen in beiden Zelllinien einen G2/M-Phase-Arrest. Sowohl die Standardtherapie als auch Olaparib resultierten weiterhin in einer Apoptoseinduktion, während die Nekroserate in keiner Zelllinie statistisch signifikant verändert wurde. Neben dem Einfluss auf das Wachstumsverhalten konnte auch ein Einfluss auf das Metastasierungspotential der PeC3- und PeC4-Zellen durch eine Behandlung mit der Standardtherapie oder Olaparib detektiert werden. In der BRCA-mutierten Zelllinie PeC3 konnte eine vergleichbare Wirkung von Olaparib und der Standardtherapie auf die chemotaktische Aktivität sowie auf die Migration nachgewiesen werden. In der Zelllinie PeC4 inhibierte die Standardtherapie die chemotaktische Aktivität und Olaparib die Migration der

---

Zellen. Das klonogene Wachstum, ein Indikator für die Fähigkeit der Zellen sich als Einzelzellen anzusiedeln und zu wachsen, wurde in beiden Zelllinien effektiver durch Olaparib als durch die Standardtherapie gehemmt.

Zusammengefasst konnten in beiden PeC-Zelllinien antitumorale Effekte auf das Tumorzellwachstum und das Metastasierungsverhalten durch Olaparib nachgewiesen werden. Eine eindeutige Abhängigkeit der Wirksamkeit von der in den PeC3-Zellen detektierten BRCA1-Mutation war dabei nicht feststellbar.

Aufgrund der gewonnenen Daten postulieren wir, dass Olaparib eine vielversprechende Behandlungsoption für das PeC darstellen könnte. Zudem deuten die *in vitro* Ergebnisse darauf hin, dass eine Ausweitung des Anwendungsbereichs von Olaparib über BRCA-mutierte Tumore hinaus sinnvoll sein könnte. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um dies weiter zu verifizieren.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hakenberg OW, Dräger DL, Erbersdobler A, Naumann CM, Jünemann K-P, Protzel C. The diagnosis and treatment of penile cancer. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2018;115(39):646.
2. Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. *Eur Urol*. 2015;67(1):142-50.
3. Thomas A, Necchi A, Muneer A, Tobias-Machado M, Tran ATH, Van Rompuy AS, et al. Penile cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):11.
4. Pagliaro LC, Williams DL, Daliani D, Williams MB, Osai W, Kincaid M, et al. Neoadjuvant paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin chemotherapy for metastatic penile cancer: a phase II study. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3851-7.
5. Agarwal G, Gupta S, Spiess PE. Novel targeted therapies for the treatment of penile cancer. *Expert Opin Drug Discov*. 2014;9(8):959-68.
6. Flaig TW. NCCN Guidelines Version 2.2020 Penile Cancer. 2020.
7. Jacob JM, Ferry EK, Gay LM, Elvin JA, Vergilio J-A, Ramkissoon S, et al. Comparative genomic profiling of refractory and metastatic penile and nonpenile cutaneous squamous cell carcinoma: implications for selection of systemic therapy. *The Journal of urology*. 2019;201(3):541-8.
8. Pilié PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(2):81-104.
9. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Murcia JM-d, Murcia Gd. XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*. 1998;18(6):3563-71.
10. Campalans A, Kortulewski T, Amouroux R, Menoni H, Vermeulen W, Radicella JP. Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(5):3115-29.
11. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(43):5864-74.
12. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-81.
13. Douglawi A, Masterson TA. Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer. *Transl Androl Urol*. 2017;6(5):785-90.
14. Montes Cardona CE, García-Perdomo HA. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica*. 2017;41:e117.
15. Douglawi A, Masterson TA. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. *Current Opinion in Urology*. 2019;29(2):145-9.
16. Olesen TB, Sand FL, Rasmussen CL, Albieri V, Toft BG, Norrild B, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 2019;20(1):145-58.
17. Mentrikoski MJ, Stelow EB, Culp S, Frierson HF, Jr., Cathro HP. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(10):1340-8.
18. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2001;159(4):1211-8.
19. Emmanuel A, Nettleton J, Watkin N, Berney DM. The molecular pathogenesis of penile carcinoma—current developments and understanding. *Virchows Archiv*. 2019;475(4):397-405.
20. Leto M, Santos Júnior GF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):306-17.
21. Alemany L, Cubilla AL, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *European urology*. 2016;69 5:953-61.
22. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal,

---

Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):93-105.

23. Menon S, Moch H, Berney D, Cree I, Srigley J, Tsuzuki T, et al. WHO 2022 classification of penile and scrotal cancers: updates and evolution. *Histopathology.* 2023;82(4):508-20.
24. Sanchez DF, Soares F, Alvarado-Cabrero I, Cañete S, Fernández-Nestosa MJ, Rodríguez IM, et al. Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC). *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(3):222-31.
25. Wittekind C. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*: John Wiley & Sons; 2016.
26. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Peniskarzinoms.* 2020;Langversion 1.0.
27. Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, Giuliano A, Goodman MT, King JB, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998–2003. *Cancer.* 2008;113(S10):2883-91.
28. Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Guiliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2007;25(5):361-7.
29. de Vries HM, Brouwer OR, Heijmink S, Horenblas S, Vegt E. Recent developments in penile cancer imaging. *Curr Opin Urol.* 2019;29(2):150-5.
30. Hanchanale VS, Yeo L, Subedi N, Smith JT, Wah TM, Harnden P, et al. The accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in predicting the invasion of the tunica albuginea and the urethra during the primary staging of penile cancer. *BJU International.* 2016;117.
31. Graafland NM, van Boven HH, van Werkhoven E, Moonen LM, Horenblas S. Prognostic significance of extranodal extension in patients with pathological node positive penile carcinoma. *J Urol.* 2010;184(4):1347-53.
32. Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *Br J Urol.* 1993;72(5 Pt 2):817-9.
33. Hughes BE, Leijte JAP, Kroon BK, Shabbir MA, Swallow TW, Heenan SD, et al. Lymph Node Metastasis in Intermediate-Risk Penile Squamous Cell Cancer: A Two-Centre Experience. *European Urology.* 2010;57(4):688-92.
34. Djajadiningrat RS, Graafland NM, van Werkhoven E, Meinhardt W, Bex A, van der Poel HG, et al. Contemporary management of regional nodes in penile cancer-improvement of survival? *J Urol.* 2014;191(1):68-73.
35. Pagliaro LC, Crook J. Multimodality therapy in penile cancer: when and which treatments? *World J Urol.* 2009;27(2):221-5.
36. Brouwer OR, Albersen M, Parnham A, Protzel C, Pettaway CA, Ayres B, et al. European Association of Urology-American Society of Clinical Oncology Collaborative Guideline on Penile Cancer: 2023 Update. *European Urology.* 2023;83(6):548-60.
37. Protzel C, Hakenberg OW. Chemotherapy in patients with penile carcinoma. *Urol Int.* 2009;82(1):1-7.
38. Sklaroff RB, Yagoda A. Cis-diamminedichloride platinum II (DDP) in the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1979;44(5):1563-5.
39. Hakenberg OW, Protzel C. Chemotherapy in penile cancer. *Ther Adv Urol.* 2012;4(3):133-8.
40. Maiche AG. Adjuvant treatment using bleomycin in squamous cell carcinoma of penis: study of 19 cases. *Br J Urol.* 1983;55(5):542-4.
41. Ahmed T, Sklaroff R, Yagoda A. Sequential trials of methotrexate, cisplatin and bleomycin for penile cancer. *J Urol.* 1984;132(3):465-8.
42. Sklaroff RB, Yagoda A. Methotrexate in the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1980;45(2):214-6.
43. Hakenberg OW, Nippgen JBW, Froehner M, Zastrow S, Wirth MP. Cisplatin, methotrexate and bleomycin for treating advanced penile carcinoma. *BJU International.* 2006;98(6):1225-7.
44. CORRAL DA, SELLA A, PETTAWAY CA, AMATO RJ, JONES DM, ELLERHORST J. COMBINATION CHEMOTHERAPY FOR METASTATIC OR LOCALLY ADVANCED GENITOURINARY SQUAMOUS CELL CARCINOMA: A PHASE II STUDY OF METHOTREXATE, CISPLATIN AND BLEOMYCIN. *Journal of Urology.* 1998;160(5):1770-4.

- 
45. Leijte JA, Kerst JM, Bais E, Antonini N, Horenblas S. Neoadjuvant chemotherapy in advanced penile carcinoma. *European urology*. 2007;52(2):488-94.
  46. Pizzocaro G, Nicolai N, Milani A. Taxanes in Combination with Cisplatin and Fluorouracil for Advanced Penile Cancer: Preliminary Results. *European Urology*. 2009;55(3):546-51.
  47. Giannatempo P, Paganoni A, Sangalli L, Colecchia M, Piva L, Catanzaro M, et al. Survival analyses of adjuvant or neoadjuvant combination of a taxane plus cisplatin and 5-fluorouracil (T-PF) in patients with bulky nodal metastases from squamous cell carcinoma of the penis (PSCC): Results of a single high-volume center. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(4\_suppl):377-.
  48. Bermejo C, Busby JE, Spiess PE, Heller L, Pagliaro LC, Pettaway CA. Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Aggressive Surgical Consolidation for Metastatic Penile Squamous Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*. 2007;177(4):1335-8.
  49. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;478(1):23-43.
  50. Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev*. 1979;6(1):17-39.
  51. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer*. 1998;34(10):1522-34.
  52. Galanski M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2006;1(2):285-95.
  53. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther*. 1987;34(2):155-66.
  54. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467-98.
  55. Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;67:93-130.
  56. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(6):385-92.
  57. Cvitkovic E, Spaulding J, Bethune V, Martin J, Whitmore WF. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer*. 1977;39(4):1357-61.
  58. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573-84.
  59. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990;48(3):381-95.
  60. Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen WL, Maxwell PJ, Johnston PG. The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. *Seminars in Oncology*. 2003;30(3, Supplement 6):3-9.
  61. Han R, Yang YM, Dietrich J, Luebke A, Mayer-Pröschel M, Noble M. Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. *Journal of Biology*. 2008;7(4):12.
  62. Koenig H, Patel A. Biochemical Basis for Fluorouracil Neurotoxicity: The Role of Krebs Cycle Inhibition by Fluoroacetate. *Archives of Neurology*. 1970;23(2):155-60.
  63. Koenig H, Patel A. The acute cerebellar syndrome in 5-fluorouracil chemotherapy: a manifestation of fluoroacetate intoxication. *Neurology*. 1970;20(4):416.
  64. Yamashita K, Yada H, Ariyoshi T. Neurotoxic effects of alpha-fluoro-beta-alanine (FBAL) and fluoroacetic acid (FA) on dogs. *J Toxicol Sci*. 2004;29(2):155-66.
  65. Arellano M, Malet-Martino M, Martino R, Spector T. 5-Ethynyluracil (GW776): effects on the formation of the toxic catabolites of 5-fluorouracil, fluoroacetate and fluorohydroxypropionic acid in the isolated perfused rat liver model. *Br J Cancer*. 1997;76(9):1170-80.
  66. Arellano M, Malet-Martino M, Martino R, Gires P. The anti-cancer drug 5-fluorouracil is metabolized by the isolated perfused rat liver and in rats into highly toxic fluoroacetate. *Br J Cancer*. 1998;77(1):79-86.
  67. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends in pharmacological sciences*.

---

1992;13:134-6.

68. Spencer CM, Faulds D. Paclitaxel. *Drugs*. 1994;48(5):794-847.
69. Alshowaier I, Nicholls P. The management of breast cancer. *HOSPITAL PHARMACIST-LONDON*. 1997;4:10-21.
70. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(15):1247-59.
71. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(3):1561-5.
72. Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *The Journal of cell biology*. 1981;91(2):479-87.
73. Hamel E, Del Campo A, Lowe M, Lin C. Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(22):11887-94.
74. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. 1979;277(5698):665-7.
75. Wang J, Pettaway CA, Pagliaro LC. Treatment for Metastatic Penile Cancer After First-line Chemotherapy Failure: Analysis of Response and Survival Outcomes. *Urology*. 2015;85(5):1104-10.
76. Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol*. 2007;8(5):420-9.
77. Sand FL, Rasmussen CL, Frederiksen MH, Andersen KK, Kjaer SK. Prognostic Significance of HPV and p16 Status in Men Diagnosed with Penile Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2018;27(10):1123-32.
78. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):10914-21.
79. Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, et al. Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Annals of Oncology*. 2004;15:i7-i13.
80. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with *BRCA1* or *BRCA2* Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(5):1117-30.
81. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*. 2008;359(20):2143-53.
82. Welcsh PL, King MC. *BRCA1* and *BRCA2* and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):705-13.
83. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter Hypermethylation and *BRCA1* Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(7):564-9.
84. Meric-Bernstam F. Heterogenic Loss of *BRCA* in Breast Cancer: The "Two-Hit" Hypothesis Takes a Hit. *Annals of Surgical Oncology*. 2007;14(9):2428-9.
85. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*. 1990;250(4988):1684-9.
86. Savage KI, Harkin DP. *BRCA1*, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS Journal*. 2015;282(4):630-46.
87. Baldeyron C, Jacquemin E, Smith J, Jacquemont C, De Oliveira I, Gad S, et al. A single mutated *BRCA1* allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene*. 2002;21(9):1401-10.
88. Zhong Q, Chen C-F, Chen P-I, Lee W-H. *BRCA1* Facilitates Microhomology-mediated End Joining of DNA Double Strand Breaks\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:28641 - 7.
89. Coupier I, Baldeyron C, Rousseau A, Mosseri V, Pages-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, et al. Fidelity of DNA double-strand break repair in heterozygous cell lines harbouring *BRCA1* missense mutations. *Oncogene*. 2004;23(4):914-9.
90. Bau D-T, Fu Y-p, Chen ST, Cheng T-C, Yu Jc, Wu P-E, et al. Breast Cancer Risk and

---

the DNA Double-Strand Break End-Joining Capacity of Nonhomologous End-Joining Genes Are Affected by BRCA1. *Cancer Research*. 2004;64:5013 - 9.

91. Bau D-T, Mau YC, Shen C-Y. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer letters*. 2006;240 1:1-8.
92. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*. 1999;4(4):511-8.
93. Snouwaert JN, Gowen LC, Latour AM, Mohn AR, Xiao A, DiBiase L, et al. BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene*. 1999;18(55):7900-7.
94. Wang H, Zeng ZC, Bui TA, DiBiase SJ, Qin W, Xia F, et al. Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res*. 2001;61(1):270-7.
95. Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes & development*. 2006;20(1):34-46.
96. Sy SM-H, Huen MS, Chen J. MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(32):21127-31.
97. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Molecular Cancer Research*. 2009;7(7):1110-8.
98. Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current Biology*. 2009;19(6):524-9.
99. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell*. 2006;22(6):719-29.
100. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*. 2017;355(6330):1152-8.
101. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035):917-21.
102. Murai J, Huang S-yN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*. 2012;72(21):5588-99.
103. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*. 2016;8(362):362ps17.
104. Murai J, Huang SY, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(2):433-43.
105. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005;434(7035):913-7.
106. Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, et al. Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(15):2512-9.
107. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell*. 2011;145(1):30-8.
108. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol*. 2015;33(3):244-50.
109. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523-33.
110. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2495-505.
111. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance

- 
- Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(4):317-27.
112. Brown JS, Kaye SB, Yap TA. PARP inhibitors: the race is on. *British Journal of Cancer.* 2016;114(7):713-5.
113. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1382-92.
114. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(8):852-61.
115. Ledermann JA, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(11):1579-89.
116. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, GebSKI V, Penson RT, Oza AM, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1274-84.
117. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods.* 1986;89(2):271-7.
118. Magaud JP, Sargent I, Mason DY. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods.* 1988;106(1):95-100.
119. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur.* Berlin: Springer; 2020. 379 p.
120. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148(7):2207-16.
121. Bernhard JM, Ostermann DR, Williams DS, Blanks JK. Comparison of two methods to identify live benthic foraminifera: A test between Rose Bengal and CellTracker Green with implications for stable isotope paleoreconstructions. *Paleoceanography.* 2006;21.
122. Fenu M, Bettermann T, Vogl C, Darwish-Miranda N, Schramel J, Jenner F, et al. A novel magnet-based scratch method for standardisation of wound-healing assays. *Sci Rep.* 2019;9(1):12625.
123. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *New England Journal of Medicine.* 2009;361(2):123-34.
124. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):235-44.
125. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with *BRCA1* or *BRCA2* mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet.* 2010;376(9737):245-51.
126. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay HJ, Swenerton KD, Robidoux A, Tonkin KS, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology.* 2011;12 9:852-61.
127. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10106):1949-61.
128. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2154-64.

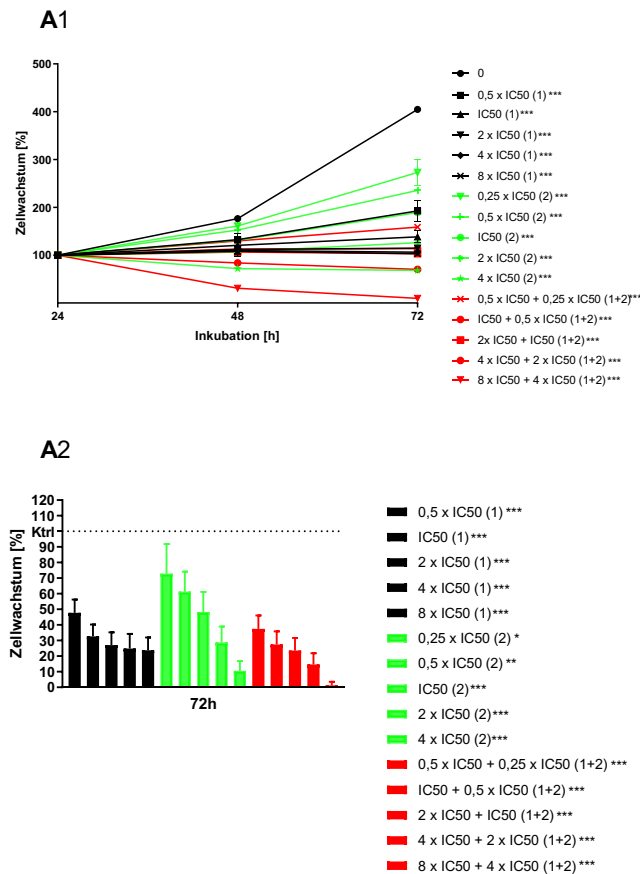
- 
129. Schuler PJ, Trellakis S, Greve J, Bas M, Bergmann C, Bölke E, et al. In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. *Eur J Med Res.* 2010;15(8):337-44.
130. Mazumdar A, Henderson YC, El-Naggar AK, Sen S, Clayman GL. Aurora kinase A inhibition and paclitaxel as targeted combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck.* 2009;31(5):625-34.
131. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al. BRCA1 Functions as a Differential Modulator of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Research.* 2003;63(19):6221-8.
132. Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK. The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Is Required for Subnuclear Assembly of Rad51 and Survival following Treatment with the DNA Cross-linking Agent Cisplatin\*. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(31):23899-903.
133. Garsed DW, Alsop K, Fereday S, Emmanuel C, Kennedy CJ, Etemadmoghadam D, et al. Homologous Recombination DNA Repair Pathway Disruption and Retinoblastoma Protein Loss Are Associated with Exceptional Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(3):569-80.
134. Peng G, Mills GB. Surviving Ovarian Cancer: An Affair between Defective DNA Repair and RB1. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(3):508-10.
135. Elias ST, Borges GA, Rêgo DF, LF ES, Avelino S, JN DEMN, et al. Combined paclitaxel, cisplatin and fluorouracil therapy enhances ionizing radiation effects, inhibits migration and induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol Lett.* 2015;10(3):1721-7.
136. Huang GC, Liu SY, Lin MH, Kuo YY, Liu YC. The synergistic cytotoxicity of cisplatin and taxol in killing oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2004;34(9):499-504.
137. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Suzuki K, Yazawa Y. In vitro schedule-dependent interaction between paclitaxel and cisplatin in human carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;37(6):525-30.
138. Pierce A, McGowan PM, Cotter M, Mullooly M, O'Donovan N, Rani S, et al. Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biology & Therapy.* 2013;14(6):537-45.
139. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67.
140. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature Reviews Cancer.* 2004;4(10):814-9.
141. Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, et al. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(4):334-46.
142. Metzger MJ, Stoddard BL, Monnat RJ, Jr. PARP-mediated repair, homologous recombination, and back-up non-homologous end joining-like repair of single-strand nicks. *DNA Repair (Amst).* 2013;12(7):529-34.
143. Sen T, Gay CM, Byers LA. Targeting DNA damage repair in small cell lung cancer and the biomarker landscape. *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(1):50-68.
144. Pietanza MC, Waqar SN, Krug LM, Dowlati A, Hann CL, Chiappori A, et al. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Temozolomide in Combination With Either Veliparib or Placebo in Patients With Relapsed-Sensitive or Refractory Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(23):2386-94.
145. Allison Stewart C, Tong P, Cardnell RJ, Sen T, Li L, Gay CM, et al. Dynamic variations in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), ATM, and SLFN11 govern response to PARP inhibitors and cisplatin in small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(17):28575-87.
146. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, et al. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov.* 2012;2(9):798-811.
147. Bélanger F, Fortier E, Dubé M, Lemay J-F, Buisson R, Masson J-Y, et al. Replication Protein A Availability during DNA Replication Stress Is a Major Determinant of Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research.* 2018;78(19):5561-73.

- 
148. Lu Y, Kwintkiewicz J, Liu Y, Tech K, Frady LN, Su YT, et al. Chemosensitivity of IDH1-Mutated Gliomas Due to an Impairment in PARP1-Mediated DNA Repair. *Cancer Res.* 2017;77(7):1709-18.
149. Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, et al. 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. *Sci Transl Med.* 2017;9(375).
150. Aparicio AM, Shen L, Tapia ELN, Lu J-F, Chen H-C, Zhang J, et al. Combined Tumor Suppressor Defects Characterize Clinically Defined Aggressive Variant Prostate Cancers. *Clinical Cancer Research.* 2016;22(6):1520-30.
151. Aparicio AM, Harzstark AL, Corn PG, Wen S, Araujo JC, Tu SM, et al. Platinum-based chemotherapy for variant castrate-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3621-30.
152. McGrail DJ, Lin CC-J, Garnett J, Liu Q, Mo W, Dai H, et al. Improved prediction of PARP inhibitor response and identification of synergizing agents through use of a novel gene expression signature generation algorithm. *npj Systems Biology and Applications.* 2017;3(1):8.
153. Santarosa M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 2004;1654(2):105-22.
154. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S, et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov.* 2017;7(9):1006-17.
155. Kondrashova O, Nguyen M, Shield-Artin K, Tinker AV, Teng NNH, Harrell MI, et al. Secondary Somatic Mutations Restoring RAD51C and RAD51D Associated with Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov.* 2017;7(9):984-98.
156. Quigley D, Alumkal JJ, Wyatt AW, Kothari V, Foye A, Lloyd P, et al. Analysis of Circulating Cell-Free DNA Identifies Multiclonal Heterogeneity of BRCA2 Reversion Mutations Associated with Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer Discov.* 2017;7(9):999-1005.
157. Hong R, Ma F, Zhang W, Yu X, Li Q, Luo Y, et al. 53BP1 depletion causes PARP inhibitor resistance in ATM-deficient breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2016;16(1):725.
158. Jaspers JE, Kersbergen A, Boon U, Sol W, van Deemter L, Zander SA, et al. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov.* 2013;3(1):68-81.
159. D'Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair.* 2018;71:172-6.
160. Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee JE, et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature.* 2016;535(7612):382-7.
161. Lee SB, Segura-Bayona S, Villamor-Payà M, Saredi G, Todd MAM, Attolini CS, et al. Tousled-like kinases stabilize replication forks and show synthetic lethality with checkpoint and PARP inhibitors. *Sci Adv.* 2018;4(8):eaat4985.
162. Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y, et al. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget.* 2016;7(47):76534-50.
163. Henneman L, van Miltenburg MH, Michalak EM, Braumuller TM, Jaspers JE, Drenth AP, et al. Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(27):8409-14.
164. Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Dréan A, Song F, Aleksandrov R, et al. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2018;9(1):1849.
165. Wang J, Lou P, Lesniewski R, Henkin J. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-Cancer Drugs.* 2003;14(1):13-9.
166. Tudrej P, Głowala-Kosińska M, Sojka D, Cortez A, Lisowska K. 219 Effect of olaparib treatment on cell cycle, senescence and cell death in ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecologic Cancer.* 2020;30(Suppl 3):A91-A.
167. Bianchi A, Lopez S, Altwerger G, Bellone S, Bonazzoli E, Zammataro L, et al. PARP-1

- 
- activity (PAR) determines the sensitivity of cervical cancer to olaparib. *Gynecologic Oncology*. 2019;155(1):144-50.
168. Jelinic P, Levine DA. New Insights into PARP Inhibitors' Effect on Cell Cycle and Homology-Directed DNA Damage Repair. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(6):1645-54.
169. Inbar-Rozensal D, Castiel A, Visochek L, Castel D, Dantzer F, Izraeli S, et al. A selective eradication of human nonhereditary breast cancer cells by phenanthridine-derived polyADP-ribose polymerase inhibitors. *Breast Cancer Research*. 2009;11(6):R78.
170. Madison DL, Stauffer D, Lundblad JR. The PARP inhibitor PJ34 causes a PARP1-independent, p21 dependent mitotic arrest. *DNA Repair*. 2011;10(10):1003-13.
171. Shen X, Tao Y, Yang Y, Wang R, Fang J, Lian M. Combination of TPF regimen and cinobufotalin inhibits proliferation and induces apoptosis in human hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma cells. *Onco Targets Ther*. 2019;12:341-8.
172. Prasad CB, Prasad SB, Yadav SS, Pandey LK, Singh S, Pradhan S, et al. Olaparib modulates DNA repair efficiency, sensitizes cervical cancer cells to cisplatin and exhibits anti-metastatic property. *Scientific Reports*. 2017;7(1):12876.
173. Nakamura N, Fujihara H, Kawaguchi K, Yamada H, Nakayama R, Yasukawa M, et al. Possible Action of Olaparib for Preventing Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2527.
174. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of cell biology*. 1994;127(6):2021-36.
175. Schacke M, Kumar J, Colwell N, Hermanson K, Folle GA, Nechaev S, et al. PARP-1/2 Inhibitor Olaparib Prevents or Partially Reverts EMT Induced by TGF- $\beta$  in NMuMG Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):518.
176. Chen H-C. Boyden Chamber Assay. In: Guan J-L, editor. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 15-22.
177. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33.
178. Sander EE, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, et al. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology*. 1998;143(5):1385-98.
179. Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(5):1709-25.
180. Ren X-D, Kiosses WB, Sieg DJ, Otey CA, Schlaepfer DD, Schwartz MA. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of cell science*. 2000;113(20):3673-8.
181. Chen B-H, Tzen JT, Bresnick AR, Chen H-C. Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(37):33857-63.
182. Lai J-F, Kao S-C, Jiang S-T, Tang M-J, Chan P-C, Chen H-C. Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(11):7474-80.

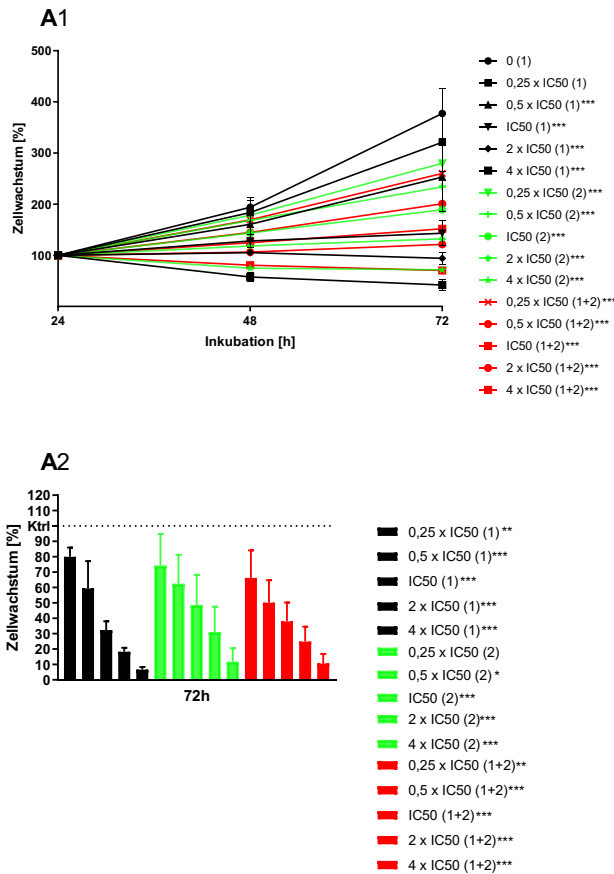
## 8 Anhang

### 8.1 Dosis-Wirkungskurven nach Zweierkombinationen bei den PeC3- und PeC4-Zellen (MTT-Test)



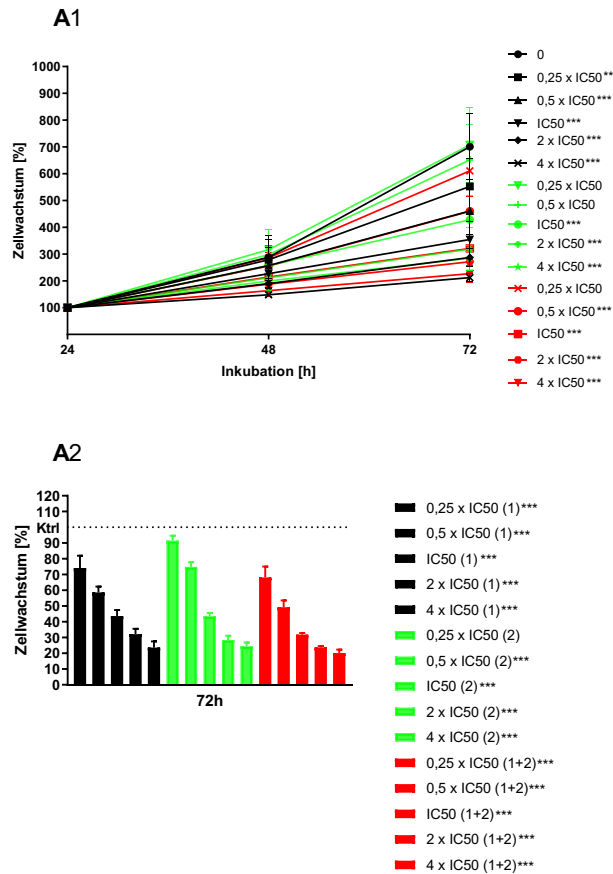
**Abb. A1: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums von PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe mit unterschiedlichen Anteilen vom IC50 (0,5 x IC50 + 0,25 x IC50 – 8 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: 5-FU, grün: Cisplatin, rot: Kombination. Konzentrationen werden als Anteile IC50-Werte angegeben. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 3.



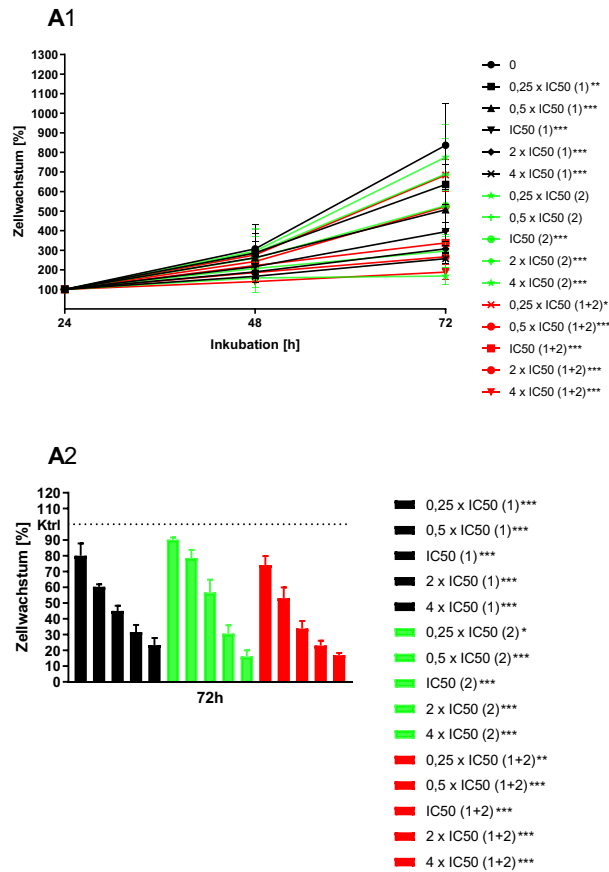
**Abb. A2: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums von PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe mit gleichen Anteilen vom IC50 (0,5 x IC50 + 0,25 x IC50 – 8 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Paclitaxel, grün: Cisplatin, rot: Kombination. Konzentrationen werden als Anteile IC50-Werte angegeben. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 3.



**Abb. A3: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Paclitaxel**

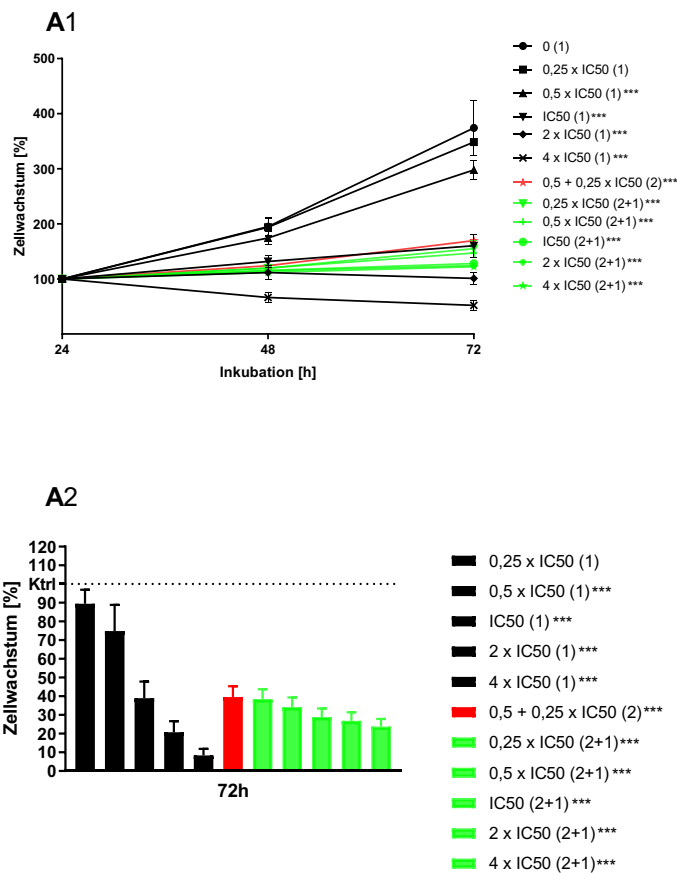
Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe mit gleichen Anteilen vom IC50 (0,25 x IC50 + 0,25 x IC50 – 4 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: 5-FU, grün: Paclitaxel, rot: Kombination. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.



**Abb. A4: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU und Cisplatin**

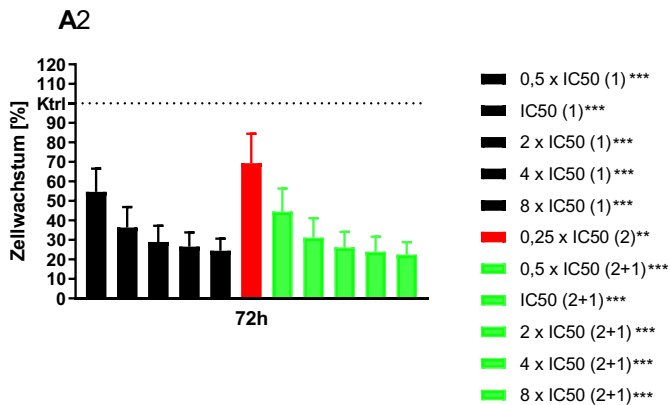
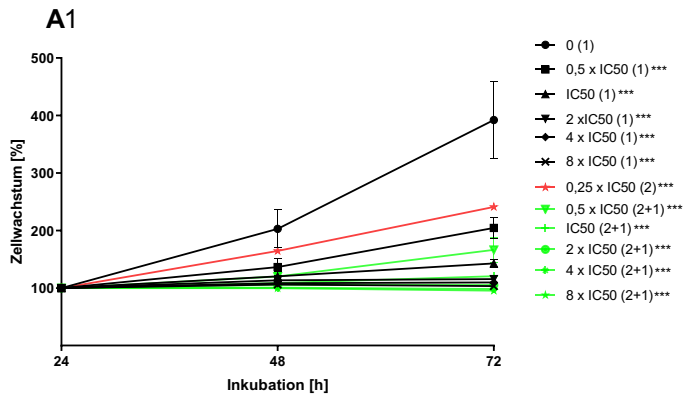
Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe mit gleichen Anteilen vom IC50 (0,25 x IC50 + 0,25 x IC50 – 4 x IC50 + 4 x IC50) sowie den entsprechenden Einzelbehandlungen als Vergleich. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: 5-FU, grün: Cisplatin, rot: Kombination, X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.

## 8.2 Dosis-Wirkungskurven nach Dreierkombinationen bei den PeC3- und PeC4-Zellen (MTT-Test)



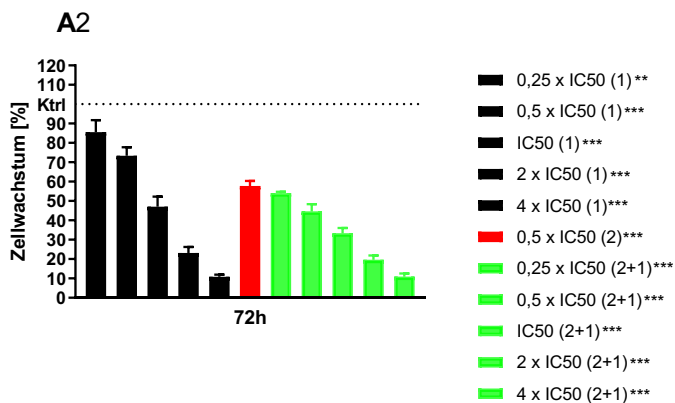
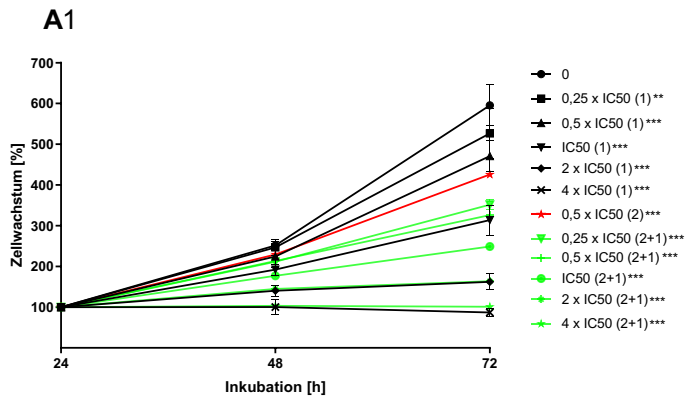
**Abb. A5:** zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. Paclitaxel wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (0,5 x IC50 von 5-FU und 0,25 x IC50 von Cisplatin) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Paclitaxel und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Paclitaxel, rot: Zweierkombination aus 5-FU und Cisplatin, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\*\* =  $p < 0,001$ .  $n = 4$ .



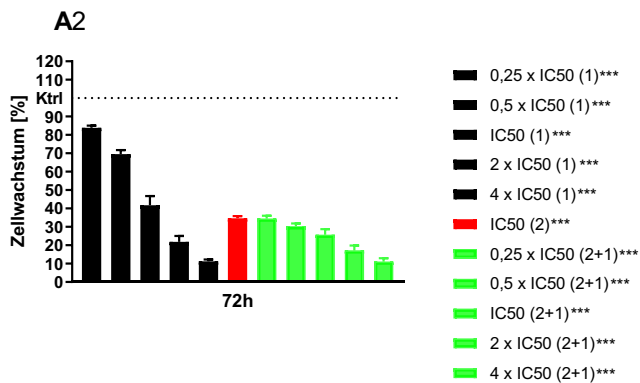
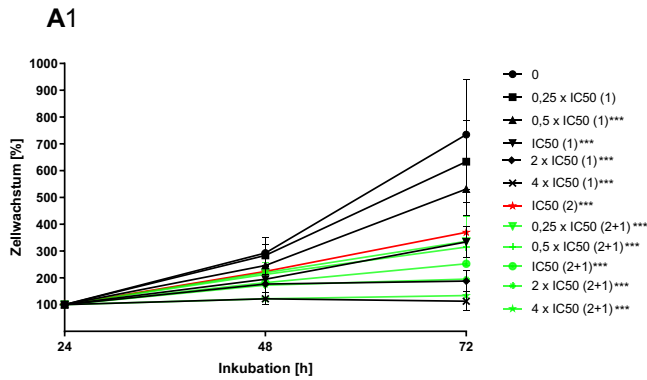
**Abb. A6: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC3-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. 5-FU wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (0,25 x IC50 von Paclitaxel und 0,25 x IC50 von Cisplatin) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von 5-FU und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: 5-FU, rot: Zweierkombination aus Paclitaxel und Cisplatin, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .  $n = 4$ .



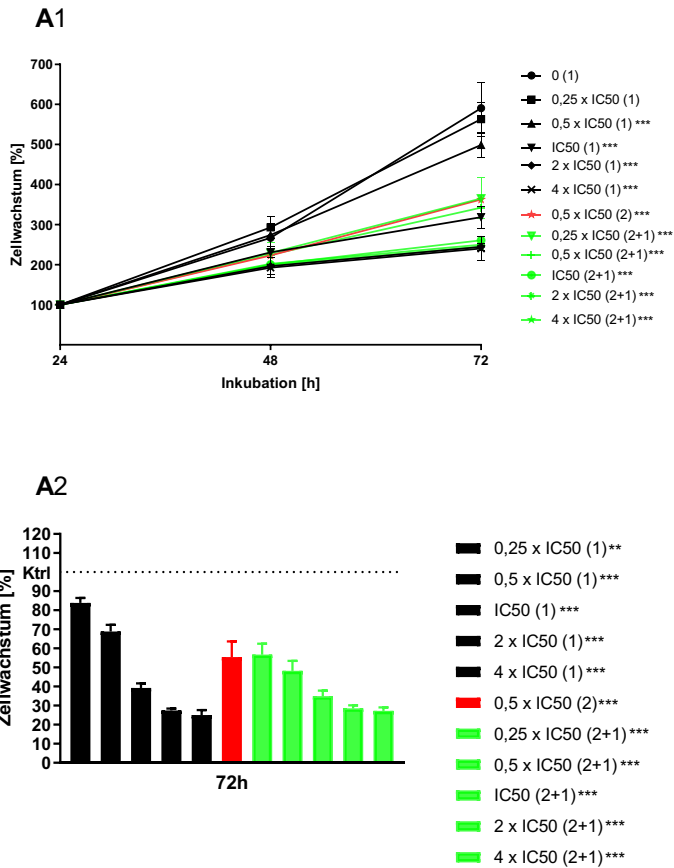
**Abb. A7: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, 5-FU und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. Cisplatin wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (0,5 x IC50 von Paclitaxel und 0,5 x IC50 von 5-FU) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Cisplatin und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Cisplatin, rot: Zweierkombination aus Paclitaxel und 5-FU, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.



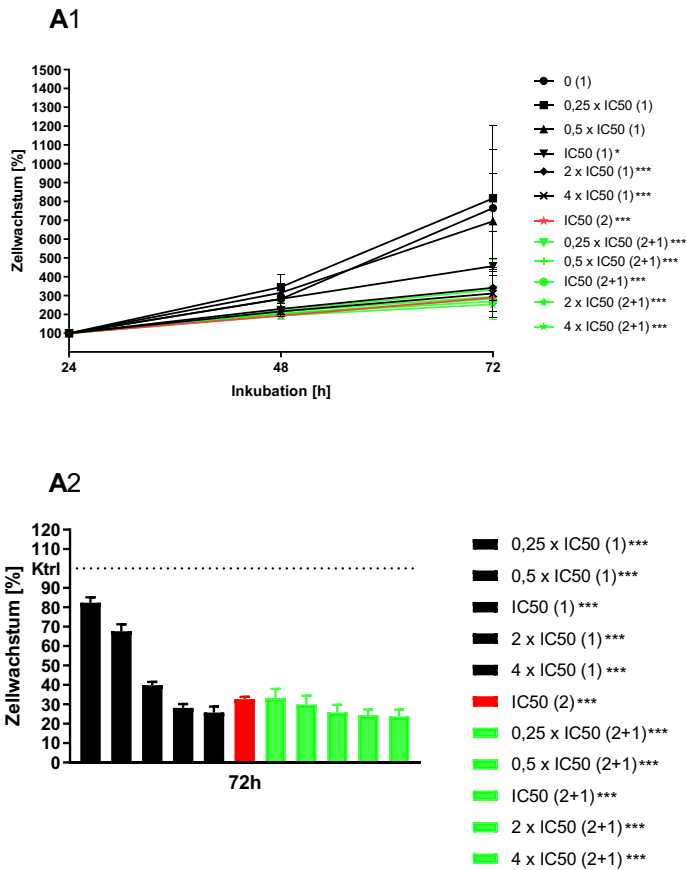
**Abb. A8: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, 5-FU und Cisplatin**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. Cisplatin wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (IC50 von Paclitaxel und IC50 von 5-FU) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Cisplatin und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienen als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Cisplatin, rot: Zweierkombination aus Paclitaxel und 5-FU, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.



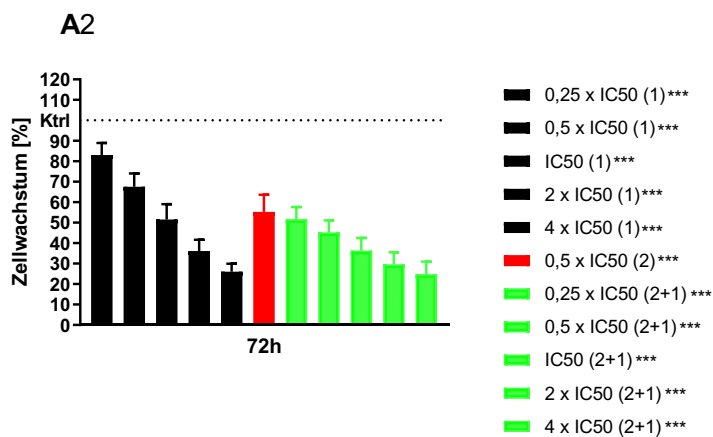
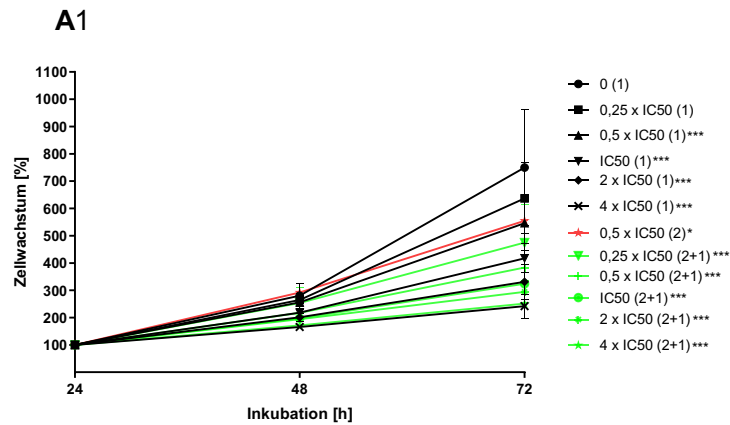
**Abb. A9: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. Paclitaxel wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (0,5 x IC50 von 5-FU und 0,5 x IC50 von Cisplatin) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Paclitaxel und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Paclitaxel, rot: Zweierkombination aus Cisplatin und 5-FU, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.



**Abb. A10: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, 5-FU und Paclitaxel**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von 5-FU, Cisplatin und Paclitaxel. Paclitaxel wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (IC50 von 5-FU und IC50 von Cisplatin) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Paclitaxel und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: Paclitaxel, rot: Zweierkombination aus Cisplatin und 5-FU, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.



**Abb. A11: zeit- und konzentrationskinetische Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Cisplatin, Paclitaxel und 5-FU**

Zeitkinetische (A1) und konzentrationskinetische (A2) Darstellung des Wachstums der PeC4-Zellen nach kombinierter Gabe von Paclitaxel, Cisplatin und 5-FU. 5-FU wurde in Anteilen von IC50 (0,25 – 4 x IC50) zu der zuvor ausgewählten Zweierkombination (0,5 x IC50 von Cisplatin und 0,5 x IC50 von Paclitaxel) hinzugegeben. Als Vergleich dienten die Einzelbehandlung von Cisplatin und die Zweierkombination. Unbehandelte PeC-Zellen dienten als Kontrollen. Für die zeitkinetische Darstellung erfolgte eine Normalisierung zum jeweiligen Wert nach 24 h (100%), für die konzentrationskinetische Darstellung zum Wert der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt (Ktrl = Kontrolle, hier 72 h, gepunktete Linie). Schwarz: 5-FU, rot: Zweierkombination aus Paclitaxel und Cisplatin, grün: Kombination aus 5-FU, Paclitaxel und Cisplatin. X-Achse: Inkubationszeit in [h]. Y-Achse: Zellwachstum in [%]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 4.