Aus der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

Synthetische Letalität von PARP- und APE1-Inhibitoren bei hämatologischen Neoplasien

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)

der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Vanessa Kohl

aus Heidelberg

2021

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerdt

Referent: Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius

Für meine

Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1 Diagnostik bei myeloischen Neoplasien 1
1.1.1 Zytomorphologie 1
1.1.2 Chromosomale Veränderungen 2
1.1.3 Molekulargenetik 4
1.1.4 Immunphänotypisierung 5
1.2 Akute myeloische Leukämie 6
1.2.1 WHO Klassifikation der AML 6
1.2.2 Klinik der AML 8
1.2.3 Prognose der AML 8
1.2.4 Therapie bei AML 9
1.3 MDS 10
1.3.1 WHO Klassifikation des MDS 10
1.3.2 Klinik des MDS 12
1.3.3 Prognose des MDS 12
1.3.4 Therapie bei MDS 13
1.4 Chronische Myelomonozytäre Leukämie 14
1.4.1 Diagnosestellung und Klassifikation der CMML 14
1.4.2 Klinik bei CMML 15
1.4.3 Prognose bei CMML 15
1.4.4 Therapie der CMML 16
1.5 DNA- Reparatur 17
1.6 Synthetische Letalität 19
1.7 PARP 19
1.8 Ziel der Arbeit 21
2. Material und Methoden 23
2.1 Material 23
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien 23
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 24
2.1.3 Antikörper 25
2.1.4 Puffer 25
2.1.5 Zelllinien 25
2.1.6 Kit Systeme 25
2.1.7 Kommerziell erworbene Primer 26
2.1.8 Software 26
2.1.9 Patientenproben 26
2.2 Methoden 27
2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus KM 27
2.2.2 Isolation von $CD34^+$ Zellen aus MNC 28
2.2.3 Zellzahlbestimmung 28

2.2.4 Kultivierung von MDS-L und SKM1 Zelllinien 28
2.2.5 Ansetzen der Inhibitoren 29
2.2.6 *In vitro* Behandlung der CD34$^+$ Patientenzellen 29
2.2.7 *In vitro* Behandlung der Zelllinien 30
2.2.8 Viabilitätsassay 31
2.2.9 RNA Isolation 31
2.2.10 cDNA Synthese 31
2.2.11 Qualitätskontrolle der RNA 32
2.2.12 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) 32
2.2.13 Immunofluoreszenzfärbung von γH2AX 33
2.2.14 Zytogenetik 33
2.2.15 Giemsa-Färbung 34
2.2.16 Genmutationsanalysen 35
2.2.17 Kryokonservierung der Zellen 35
2.2.18 Auftauen kryokonservierter Zellen 35
2.2.19 Statistische Analysen 36
3. Ergebnisse 37
3.1 Vorversuche an SKM1 und MDS-L Zelllinien 37
3.2 Patientencharakteristika 39
3.3 Laborchemische Parameter 41
3.4 Effekt von Talazoparib und APE1 Inhibitor III in CD34$^+$ Patientenzellen 44
3.5 Individuelle zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika 47
3.6 Proliferationsverhalten der Zellen 49
3.7 Analyse von *PARP1* und *APE1* mRNA Expression in CD34$^+$ Patientenzellen 50
3.8 Analyse von γH2AX Foci in CD34$^+$ Patientenzellen 51
3.9 Laborchemische Parameter in Bezug auf das Ansprechverhalten der CD34$^+$ Patientenzellen 52
3.10 Effekt von Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1i sowie von Talazoparib± APE1i in CD34$^+$ Patientenzellen 54
3.11 Klinischer Verlauf der Patienten 58
4. Diskussion 59
5. Zusammenfassung 67
6. Literaturverzeichnis 69
7. Anhang 77
8. Lebenslauf 79
9. Danksagung 80

Abkürzungsverzeichnis

AD	Automodifikationsdomäne
AEJ	alternative nicht-homologe Rekombination (*alternative end-joining*)
AML	akute myeloische Leukämien
APE1	Apurin/Apyrimidin Endonuklease 1
APE1i	APE1 Inhibitor III
aSZT	allogene Stammzelltransplantation
BER	Basenexzisionsreparatur
CD	Clusters of Differentiation
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CPSS	CMML-specific prognostic scoring system
CR	komplette Remission (*complete remission*)
CRP	C-reaktives Protein
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DBD	DNA-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELN	European LeukemiaNet
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s^2)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
Hb	Hämoglobin
HR	homologe Rekombination
HSC	hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*)
IPSS-R	International Prognostic Scoring System-Revised
ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature
KCl	Kaliumchlorid
KD	katalytische Domäne
KLS	Kernlokalisierungssignal
KM	Knochenmark
l	Liter

m	Meter
M	molar 1M= 1mol/l
mM	millimolar
MDS	myelodysplastische Syndrome
MDS-EB	MDS mit Blastenexzess
MDS-MLD	MDS mit Mehrliniendysplasie
MDS/MPN	myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien
MDS-RS	MDS mit Ringsideroblasten
MDS-SLD	MDS mit Einliniendysplasie
MDS-U	MDS unklassifizierbar
Min	Minute
MNC	mononukleäre Zellen
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MPP	multipotente Progenitorzellen
NHEJ	nicht-homologe Rekombination (*non-homologous end joining*)
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
pADPr	Poly-ADP Riboseketten
PARP	poly (ADP-ribose) Polymerase
PB	peripheres Blut
RS	Ringsideroblast
RT	Raumtemperatur (18-21°C)
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
sAML	sekundäre AML
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (*single strand break*)
U	Units
WHO	World Health Organisation
Zn	Zink

1. Einleitung

Die lebenslange Produktion von Blutzellen hängt von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark (KM) und deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in alle Blutzellreihen ab (Weissman 2000). Bei der Zellteilung der HSC entstehen keine neuen undifferenzierten Stammzellen sondern multipotente Progenitorzellen (MPP). Bei den MPPs erfolgt eine Festlegung über die weitere Differenzierung der Zellen entweder in die lymphatische oder in die myeloische Reihe. Diese produzieren nach weiteren Differenzierungsschritten ihre reifen Zielzellen (Haas et al. 2018). Dieser Prozess der Blutbildung wird als Hämatopoese bezeichnet. Liegt eine maligne Erkrankung bei einer der Zellreihen der Hämatopoese vor, spricht man von einer hämatologischen Neoplasie. Hierbei lässt sich, entsprechend der zellulären Herkunft, weiter in lymphatische und myeloische Neoplasien differenzieren. Letztere lassen sich nach der *World Health Organisation* (WHO) Klassifikation von 2016 unter anderem in myeloproliferative Neoplasien (MPN), akute myeloische Leukämien (AML), myelodysplastische Syndrome (MDS) und myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN) unterteilen (Arber et al. 2016).

1.1 Diagnostik bei myeloischen Neoplasien

Entscheidend für die Therapie einer myeloischen Neoplasie ist die genaue Diagnose der Entität und deren Subklassifikation. Hierzu dienen mehrere diagnostische Verfahren. In der vorliegenden Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf den Erkrankungen AML, MDS und CMML liegen, weshalb sich die nachfolgend dargestellten diagnostischen Verfahren in erster Linie darauf beziehen.

1.1.1 Zytomorphologie

Den Grundstein in der Stufendiagnostik hämatologischer Neoplasien bildet die Zytomorphologie. Neben der Diagnosestellung dient sie zur Verlaufsbeurteilung während der Therapie. Es werden gefärbtes peripheres Blut (PB) und KM-Ausstriche unter einem Lichtmikroskop auf Zellularität und verschiedene Verteilungsmuster

untersucht. Wichtige Kriterien sind hierbei unter anderem die Zelldichte, das Verhältnis zwischen Erythro- und Granulopoese sowie die Anzahl an Blasten.
Um die diagnostischen Kriterien eines MDS zu erfüllen, sollten in mindestens 10% der Zellen einer Zellreihe Dysplasiezeichen nachweisbar sein. Typische zytoplasmatische Veränderungen bei MDS sind zudem die Ringsideroblasten (RS). Dies sind pathologische Vorläuferzellen der Erythropoese, in denen Eisengranula (Siderosomen) ringförmig um den Nukleus verteilt sind. Als charakteristisches Merkmal von Blasten bei AML und MDS können Auerstäbchen nachweisbar sein. Es handelt sich hierbei um kleine, stäbchenförmige Granula, die Zeichen einer Reifungsstörung der Zelle sind. Sie spielen bei der Einteilung in verschiedene Subtypen eine Rolle.

1.1.2 Chromosomale Veränderungen

Zytogenetische Untersuchungen, bei denen Chromosomenveränderungen detektiert werden, gehören ebenfalls zur Standarddiagnostik hämatologischer Neoplasien. Neben der Diagnosestellung kann die zytogenetische Diagnostik auch verwendet werden, um Progression und Remission im Verlauf einer hämatologischen Erkrankung zu beurteilen. Bei MDS und AML können verschiedene, oft Entitäten-unspezifische Chromosomenaberrationen in den malignen Zellen beobachtet werden (Betz und Hess 2010). Die gesunden Körperzellen sind hingegen zytogenetisch unauffällig und weisen einen diploiden normalen weiblichen (46,XX) oder männlichen (46,XY) Karyotyp auf (Abb.1). Die Analyse erfolgt, wenn möglich, aus Zellen des KM, da hier teilungsfähige Zellen vorhanden sind. Um die Chromosomen eindeutig zu identifizieren werden diese, nachdem sie in der Metaphase arretiert wurden, gefärbt. Hierbei wird die Bänderungstechnik genutzt, bei der es zu chromosomenspezifischen hellen und dunklen Banden auf den Chromosomen kommt. Diese können unter einem Lichtmikroskop ausgewertet werden. Nach einer international gültigen zytogenetischen Nomenklatur (ISCN: International System for Human Cytogenomic Nomenclature) wurde die Einteilung der Chromosomen anhand ihrer Bänderung, Größe und der Lage des Zentromers festgelegt. Jedes Chromosom besteht aus zwei Chromatiden, die durch das Zentromer zusammengehalten werden. Das Zentromer teilt das Chromosom in einen kurzen (p) und einen langen (q) Arm. Je nach Lage des Zentromers unterscheidet man zwischen metazentrischen, submetazentrischen und

akrozentrischen Chromosomen. Bei metazentrischen Chromosomen liegt das Zentromer mittig, bei submetazentrischen distal in Richtung kurzen Arm, sodass der p-Arm deutlich kürzer ist als der q-Arm. Bei akrozentrischen Chromosomen befindet sich das Zentromer endständig am kurzen Arm, am oberen Ende. Beim Menschen gibt es 22 Autosomenpaare (Chromosom 1-22), sowie ein Paar geschlechtsspezifischer Gonosomen.

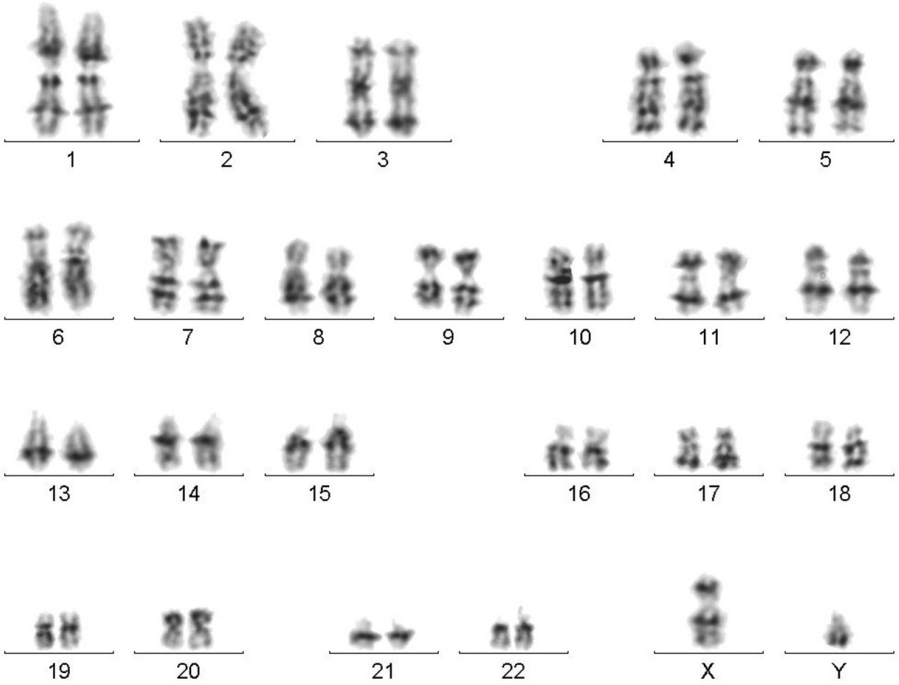

Abb. 1 Normaler männlicher Karyotyp
Das Karyogramm setzt sich aus 22 Autosomenpaaren (1-22) sowie den Gonosomen (Geschlechtschromosomen) (XY) zusammen.

Man unterscheidet zwischen den numerischen und den strukturellen Chromosomenaberrationen. Bei den numerischen Chromosomenaberrationen können einzelne oder mehrere Chromosomen verlorengegangen (Monosomie) oder zugewonnen sein (Aneuploidie). Auch eine Vervielfachung des kompletten Chromosomensatzes ist möglich (Polyploidisierung), beispielsweise eine Tetraploidie, bei der nicht ein diploider sondern tetraploider Chromosomensatz von 92 Chromosomen vorliegt. Zu den strukturellen Aberrationen zählen Deletionen, Translokationen, Inversionen und Duplikationen (Abb.2).

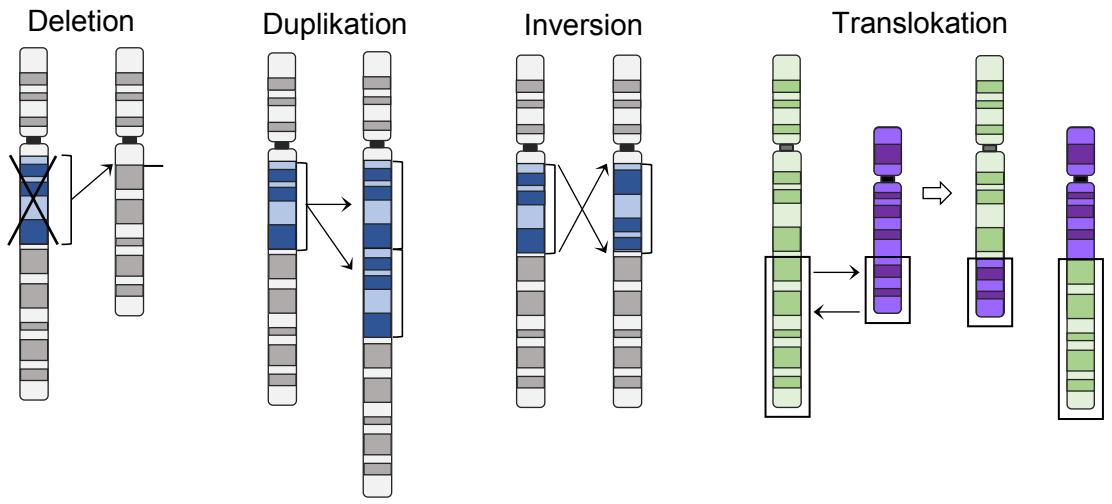

Abb. 2 Strukturelle Chromosomenaberrationen (modifiziert nach Bu und Cao 2012)
Zu den strukturellen Aberrationen zählen Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen.

1.1.3 Molekulargenetik

Die Molekulargenetik dient neben dem Nachweis rekurrenter Mutationen, die wichtig für die Diagnose einer Erkrankung sein können, auch zur Prognose sowie zur Remissionsbeurteilung. Nach aktuellem Stand gibt es nur wenige Mutationen, die krankheitsdefinierend für einzelne Entitäten sind, beispielsweise eine *KIT D816V*-Mutation bei MPN (Craig et al. 2020). In Ausnahmen finden sich diese Mutationen allerdings auch in anderen Entitäten. Im Median haben MDS-Patienten neun somatische Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz, beziehungsweise nahezu 1500 Mutationen im kompletten Genom. Diese Zahl ist deutlich niedriger als bei Patienten mit soliden Tumoren (Ogawa 2019). Bei AML-Patienten gibt es im Median 5 rekurrente Mutationen, in 96% dieser Patienten findet sich mindestens eine Treibermutation (Papaemmanuil et al. 2016). Mutationen, die zur Pathogenese beitragen, können entsprechend ihrer biologischen Funktion in neun Gruppen eingeteilt werden (Tab.1). Nahezu alle Patienten weisen mindestens eine Mutation in einer dieser neun Gruppen auf.

Tab. 1 Häufige Punktmutationen in myeloischen Neoplasien (adaptiert aus Tyner et al. 2018)

Funktion	Mutierte Gene
Chromatinmodifikation	*ASXL1, EZH2, PHF6*
DNA-Methylierung	*DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, WT1*
Kohesinkomplex	*RAD21, SMC3*
RAS-Signalweg	*CBL, KRAS, NRAS, PTPN11*
RNA-Spleißen	*SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2*
Signaltransduktion	*FLT3, JAK2, KIT*
Transkriptionsfaktoren	*ASXL2, BCOR, CEBPA, ETV6, GATA1, GATA2, RUNX1*
Tumorsuppressorgene	*TP53*
Andere Signalwege	*NPM1, PTEN, SETBP1*

Die Erstellung bestimmter Panels zur prognostischen Einordung hatte bisher keinen wegweisenden Erfolg. Allerdings können einige Mutationen, wie beispielsweise *TP53, ASXL1* und *PHF6* mit einer schlechten Prognose assoziiert sein. Patienten mit einer *CEBPA* oder *IDH2* Mutation weisen hingegen ein besseres Gesamtüberleben auf (Patel et al. 2012).

1.1.4 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung erfolgt mit Hilfe der Multiparameter-Durchflusszytometrie. Hierbei binden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper an Antigene im Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche, die anschließend mit dem Durchflusszytometer detektiert werden. Bei den Zelloberflächenantigenen handelt es sich um sogenannte CD-Marker (Clusters of Differentiation), anhand derer sich die verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von myeloischen Zellen charakterisieren lassen. So exprimieren hämatopoetische Stammzellen unter anderem den Marker CD34. Durch die Immunphänotypisierung kann beispielsweise geklärt werden, ob eine AML mit dem Antikörper Gemtuzumab-Ozogamicin behandelt werden kann, da dies die Expression von CD33 auf den Blasten voraussetzt.

1.2 Akute myeloische Leukämie

Die AML ist eine heterogene, klonale Erkrankung der Myelopoese und die am häufigsten vorkommende akute Leukämie bei Erwachsenen. Die Inzidenz steigt mit dem Alter, welches in einem schwedischen Register im Median 72 Jahre betrug (Juliusson et al. 2009). In den USA lag die jährliche Inzidenz bei 2,4 Fällen je 100.000 Einwohner, bei Erwachsenen, die älter als 65 Jahre waren, bei 12,6 Patienten je 100.000 Einwohner (Estey und Döhner 2006). Eine AML ist durch einen Blastenanteil von ≥ 20% im PB oder im KM charakterisiert und kann bei Vorkommen bestimmter genetischer Aberrationen auch bei einem geringeren Blastenanteil diagnostiziert werden (Arber et al. 2016). Dies trifft zum Beispiel auf den Nachweis von t(8;21)(q22;q22) und t(15;17)(q22;q12) oder Inversionen wie die inv(16)(p13.1q22) zu.

1.2.1 WHO Klassifikation der AML

Die Einordnung in die verschieden Subgruppen nach der aktuell gültigen WHO Klassifikation von 2016 ist in Tabelle 2 dargestellt. Bei der Einteilung in genetische Subgruppen stehen zytogenetische und molekulare Aberrationen im Vordergrund, doch auch klinische Aspekte, sowie morphologische und immunphänotypische Befunde spielen eine Rolle bei der Einteilung.

Tab. 2 WHO Klassifikation der AML (Arber et al. 2016)

AML mit rekurrenten genetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
	Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit *PML-RARA* t(15;17)(q22;q12)
	AML mit t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-KMT2A*
	AML mit t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
	AML mit inv(3)(q21;3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2*, *MECOM*
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
	AML mit *NPM1*-Mutation
	AML mit biallelischer *CEBPA*-Mutation
	Provisorische Entität: AML mit *BCR-ABL1* t(9;22)(q34;q11)
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem *RUNX1*
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Myeloides Sarkom	
Therapieassoziierte myeloische Neoplasien	
AML nicht anderweitig klassifiziert	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie
	Reine Erythrozytenleukämie
	Akute Megakaryoblastenleukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasie	
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation	Transiente abnormale Myelopoese (TAM)
	Down-Syndrom-assoziierte myeloische Leukämie
AML mit mehrdeutiger Abstammung	Akute undifferenzierte Leukämie
	Diverser Phänotyp AML mit t(9;22)(q34;q11.2)
	Diverser Phänotyp AML mit t(v;11q23)
	Diverser Phänotyp AML, B/myeloid
	Diverser Phänotyp AML, T/myeloid

1.2.2 Klinik der AML

Die HSC können in verschiedenen Reifungsstadien genetische Schäden erwerben, wodurch die Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber der gesunden Hämatopoese erhalten und so das gesunde KM überwachsen. Die Schäden sind vielfältig und beruhen auf chromosomalen Aberrationen, Mutationen, Deletionen, Insertionen, Translokationen und epigenetischen Schäden. Zusätzlich können auch bekannte oder unbekannte Keimbahnveränderungen eine Rolle in der molekularen Pathogenese spielen (Brown et al. 2017). Durch die molekularen Schäden entziehen sich die Zellen den Selbsterneuerungsprozessen und ihrer Differenzierung, wodurch es häufig zu einer leukämischen Ausschwemmung kommt. Die Verdrängung im Knochenmark kann darüber hinaus Auswirkungen auf die reguläre Hämatopoese haben. Typischerweise leiden betroffene Patienten unter Müdigkeit, Blutungen, Infektionen und Fieber. Eine leukämische Infiltration in verschiedene Gewebe wie zum Beispiel der Leber, der Milz oder der Haut kann zu einer Vielfalt an weiteren Symptomen führen (Löwenberg et al. 1999).

1.2.3 Prognose der AML

Neben dem Alter haben vor allem molekulare und zytogenetische Veränderungen Einfluss auf die Prognose bei einer AML. Je älter der Patient, desto geringer ist die Chance auf das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Zudem steigt das Risiko eines Rezidivs. Eine erhöhte Laktat-Dehydrogenase sowie erhöhte Leukozytenmesswerte gelten ebenfalls als Risikofaktoren.
Die molekularen und zytogenetischen Veränderungen werden bei der Erstellung der Diagnose nach der European LeukemiaNet (ELN) Klassifikation in 3 Gruppen eingeteilt: günstig, intermediär und ungünstig (Tab. 3). Das 5 Jahres-Überleben bei behandelten Patienten, die älter als 60 Jahre sind, beträgt in der ELN-Gruppe ‚günstig' 23%, in der Gruppe ‚intermediär' 9% und in der Gruppe ‚ungünstig' 2%. Bei den unter 60-jährigen liegt dieses in der Gruppe ‚günstig' bei 52%, in der Gruppe ‚intermediär' bei 35% und in der Gruppe ‚ungünstig' bei 14% (Röllig et al. 2011).

Tab. 3 Prognostische Einteilung der AML nach ELN (Döhner et al. 2017)

Risikogruppe	Zyto- und molekulargenetische Veränderung
Günstig	*CBFB-MYH11* *NPM1* Mutation (wenn keine *FLT3-ITD* und keine *DNMT3A* Mutation) *PML-RARA* *RUNX1- RUNX1T1* Biallelische *CEBPA* Mutation
Intermediär	Aberrationen, die weder als günstig noch als ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	*BCR-ABL1* *DEK-NUP214* *FLT3-ITD* *GATA2/EVI1* *KMT2A-PTD* *NUP98-NSD1* *NPM1-MLF1* *ASXL1*-Mutation *DNMT3A*-Mutation *RUNX1*-Mutation *TP53*-Mutation *add(5q)/ del(5q), -5* *add(7q)/ del(7q), -7* Komplex aberranter Karyotyp

1.2.4 Therapie bei AML

Unbehandelt führt die AML bei den Patienten meist innerhalb eines Jahres zum Tod (Papaemmanuil et al. 2016). Die Behandlung erfolgt in mehreren Schritten, beginnend mit einer Induktionstherapie mit dem Ziel einer morphologischen CR. Definiert ist die CR nach der *International Working Group* mit einem Blastenanteil von < 5% im KM und der Abwesenheit von zirkulierenden Blasten im PB sowie der Abwesenheit von Auerstäbchen und extramedullären Manifestationen. Des Weiteren muss eine Regeneration der hämatopoetischen Parameter vorhanden sein Anhaltspunkt ist hierbei die Zahl der Neutrophilen (≥ 1 $x10^9$/l) sowie der Thrombozyten (≥ 100 $x10^9$/l) (Bloomfield et al. 2018). Für das Erreichen einer CR ist vor allem der genetische Hintergrund der AML entscheidend (Schlenk und Döhner 2013). Der Standard der Induktionstherapie ist eine Chemotherapie mit zwei verschiedenen Zytostatika basierend auf dem „3+7“- Schema. Dabei wird den Patienten über 7 Tage kontinuierlich Cytarabin und zusätzlich an den ersten 3 Tagen ein Anthracyclin verabreicht. Dies führt bei Patienten, die jünger als 60 Jahre alt sind in 60-80% der Fälle zu einer CR der AML, bei Patienten über 60 Jahre induziert diese Form der Therapie eine CR bei 40-60% der Patienten (Döhner et al. 2017). Die

Zugabe weiterer Zytostatika zur Standardtherapie als Induktionstherapie wird untersucht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Midostaurin in Kombination mit Cytarabin und Daunorubicin eine erhöhte Wirksamkeit bei Patienten mit einer *FLT3* Mutation hat (Stone et al. 2017). Decitabin kann bei AML-Patienten eingesetzt werden, die nicht für eine Standard-Induktion in Frage kommen (Kantarjian et al. 2012). Es handelt sich hierbei um einen DNA-Methyltransferase-Inhibitor (DNMTi).
Auf die Induktionstherapie folgt eine Konsolidierungstherapie (Schlenk 2014). Bei der Konsolidierungstherapie wird die Gabe von hoch dosiertem Cytarabin (1-1,5g/m^2 Körperoberfläche) an den Tagen 1,3 und 5 empfohlen (Döhner et al. 2017). Für Patienten, die keine CR nach Standardinduktionstherapie erreichen oder die ein Rezidiv entwickeln, ist die allogene Stammzelltransplantation (aSZT) eine mögliche Behandlungsoption (Schlenk et al. 2017).

1.3 MDS

Bei MDS handelt es sich um eine klonale Erkrankung der Myelopoese. Eine oder mehrere myeloische Zelllinien weisen eine Dysplasie auf. Es besteht das Risiko einer Progression in eine AML, die dann als sekundäre AML (sAML) bezeichnet wird. Die Abgrenzung zur AML wird durch den prozentualen Blastenanteil gebildet. In Deutschland ist das MDS mit einer Inzidenz von 4 Fällen je 100.000 Einwohner die häufigste maligne hämatologische Erkrankung. Mit dem Alter steigt die Inzidenz, sodass diese bei über 80-jährigen bei 50 Fällen je 100.000 Einwohnern liegt (Germing et al. 2013).

1.3.1 WHO Klassifikation des MDS

Bei der WHO Klassifikation von 2016 wird zwischen MDS sowie MDS/MPN-Overlap-Syndromen unterschieden. Die Einteilung in die verschiedenen MDS Entitäten ist in Tabelle 4 dargestellt. Es wird unterteilt in MDS mit Einliniendysplasie (MDS-SLD), MDS mit Mehrliniendysplasie (MDS-MLD), MDS mit Ringsideroblasten (MDS-RS), MDS mit Blastenexzess (MDS-EB), MDS mit isolierter Deletion 5q und MDS unklassifizierbar (MDS-U).

Tab. 4 WHO Klassifikation des MDS (Arber et al. 2016)

Entität	Dysplastische Linien	Zyto-penien	RS (% der erythroiden Zellen)	Blastenteil	Zytogenetik
MDS-SLD	1	1-2	<15 %/ <5%[1]	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	Alle, außer isolierte del(5q)
MDS-MLD	2-3	1-3	<15 % / <5 %[1]	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	Alle, außer isolierte del(5q)
MDS-RS			≥15 % / ≥5 %[1]	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	Alle, außer isolierte del(5q)
- MDS-RS-SLD	1	1-2			
- MDS-RS-MLD	2-3	1-3			
MDS mit del(5q)	1-3	1-3	Irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	Del(5q) isoliert oder mit Zusatzaberrationen (Ausnahme: Monosomie 7 oder del(7q))
MDS-EB	0-3	1-3	Irrelevant		Irrelevant
- MDS-EB1				KM 5-9 % oder PB 2-4 %, keine Auerstäbchen	
- MDS-EB2				KM 10-19 % oder PB 5-19 % oder Auerstäbchen	
MDS-U					
- mit 1% peripheren Blasten	1-3	1-3	Irrelevant	KM <5 %, PB 1 %, keine Auerstäbchen	Irrelevant
- mit SLD und Panzytopenie	1	3	Irrelevant	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	Irrelevant
- auf Grundlage zytogenetischer Veränderungen	0	1-3	< 15%	KM <5 %, PB <1 %, keine Auerstäbchen	MDS- definierende Veränderung

[1]Falls *SF3B1* Mutation

1.3.2 Klinik des MDS

Die Symptome der Patienten sind abhängig von den Zytopenien und deren Ausprägung. Bei etwa 70% der Patienten wird zunächst eine Anämie diagnostiziert, mit typischen Symptomen wie Dyspnoe, Tachykardie, Kopfschmerzen und allgemeiner körperlicher Schwäche (Stauder et al. 2018). Aufgrund einer Neutropenie leidet etwa jeder dritte Patient an häufigen Infektionen. Die Hälfte der Patienten weisen bei der Erstdiagnose eine Thrombozytopenie auf, was aber nicht immer mit Blutungskomplikationen verbunden ist (Malcovati et al. 2013).

1.3.3 Prognose des MDS

Zu den wichtigsten prognostischen Faktoren zählen neben dem Alter, der medulläre Blastenanteil, chromosomale Veränderungen sowie Zytopenien. Mit Hilfe des *International Prognostic Scoring System-Revised* (IPSS-R) werden die Patienten, unter Berücksichtigung der eben genannten Parameter, in 5 verschiedene Risikogruppen eingeteilt (Tab. 5) (Greenberg et al. 2012). Mit steigendem Risiko-Score sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten in der Risikogruppe *very low risk* haben ein medianes Überleben von 106 Monaten, Patienten in der *very high risk* Gruppe lediglich von 10 Monaten. Weisen Patienten in der *high risk* Gruppe zusätzlich eine *p53* Mutation auf, haben diese ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (Haase et al. 2019).

Tab. 5 Prognostische Einteilung des MDS nach IPSS-R (Greenberg et al. 2012)

Score Punkte	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp	A	--	B	--	C	D	E
Blasten (%)	≥ 2	--	>2- < 5	--	5- 10	>10	
Hb-Wert (g/dL)	≥ 10	--	8- < 10	< 8	--	--	--
Thrombozyten x 10^9/L	≥ 100	50- < 100	< 50	--	--	--	--
Neutrophile Granulozyten x 10^9/L	≥ 0,8	< 0,8	--	--	--	--	--
Risiko- Score	**Punkte**		**Überleben** (Median in Monaten)				
Very low risk	≤ 1,5		106				
Low risk	2- 3		64				
Intermediate risk	3,5- 4,5		36				
High risk	5- 6		19				
Very high risk	> 6		10				

A: sehr gut -Y, del(11q)
B: gut Normal, del(5q), del(12p), del(20q), Doppel-Klon mit del(5q) außer chr7
C: intermediär del(7q), +8, +19, i(17q), andere Einzel- oder Doppel-Klone
D: schlecht -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), Doppel-Klon mit -7/del(7q)
E: sehr schlecht komplex

1.3.4 Therapie bei MDS

Entscheidend für die Therapie ist zunächst die Einteilung in Niedrigrisiko- und Hochrisikopatienten. Patienten mit einem intermediären Risiko werden nach IPSS-R als Niedrigrisiko eingestuft. Bei Niedrigrisikopatienten, die sich im Frühstadium der Erkrankung befinden, keine Hochrisikozytogenetik haben und nur geringe Beschwerden aufweisen, wird die Krankheit nicht aktiv behandelt, stattdessen wird eine „watch and wait“ Strategie verfolgt. Die häufigste Indikation, die zu einer Therapieeinleitung führt, stellt eine Anämie dar. Ein Hauptbestandteil jeder Therapie ist die Gabe von Erythrozytenkonzentraten (EK) bei anämischen Patienten, sowie die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten bei Patienten mit Blutungsneigung oder einer Thrombozytenzahl kleiner als 10 x10^9/l. Um einer Eisenüberladung bei chronisch transfusionsbedürftigen Menschen entgegen zu wirken, kann eine Behandlung mit einem Chelatbildner erfolgen.

Hochrisikopatienten werden in einen guten oder schlechten Allgemeinzustand eingeordnet. Patienten in einem schlechten Allgemeinzustand können eine Transfusionstherapie oder eine demethylierende Therapie mit Azacitidin oder Decitabin erhalten. Bei Hochrisikopatienten in einem guten Allgemeinzustand kann gegebenenfalls eine aSZT indiziert werden.

1.4 Chronische Myelomonozytäre Leukämie

Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) wird seit der WHO Klassifikation von 2008 zu den MDS/MPN Erkrankungen gezählt, da sie Eigenschaften einer MPN und eines MDS aufweist. Die Inzidenz liegt bei 0,4/100.000 Einwohner pro Jahr, und steigt mit zunehmenden Alter auf etwa 4/100.000 Einwohner im Jahr bei Patienten, die älter als 80 Jahre alt sind (Dinmohamed et al. 2015). Wie auch beim MDS besteht bei der CMML das Risiko einer Progression in eine sAML.

1.4.1 Diagnosestellung und Klassifikation der CMML

Die Kriterien zur Diagnosestellung nach der WHO 2016 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Persistierende Monozytose im PB über 3 Monate, mit Monozytenanteil ≥ 10% innerhalb der Leukozyten
- Ausschluss eines *BCR-ABL1, PDGFRα, PDGFRβ-* oder *PCM1-JAK2* Rearrangements
- < 20% Blasten in PB und KM
- Dysplasie in einer oder mehreren Zellreihen
- Ausschluss einer MPN (chronische myeloische Leukämie, primäre Myelofibrose, Polycythaemia vera und essenzielle Thrombozythämie)

Sollte keine Dysplasie vorliegen, während der Rest der Kriterien erfüllt ist, kann dennoch eine CMML diagnostiziert werden, wenn eine klonale Aberration (*TET2, SRSF2, ASXL1, SETBP1*) in den blutbildenden Zellen erworben wurde. Ebenso liegt eine CMML vor, wenn eine Monozytose seit mindestens 3 Monaten, nach Ausschluss möglicher reaktiver Ursachen, weiterhin besteht (International Agency for Research on Cancer 2017). Sind die diagnostischen Kriterien erfüllt, wird zwischen 3 CMML Typen unterschieden, die in Tab. 6 dargestellt sind.

Tab. 6 WHO Klassifikation der CMML

Entität	PB	KM
CMML0	<2% Blasten, keine Auerstäbchen	<5% Blasten, keine Auerstäbchen
CMML1	2-4% Blasten, keine Auerstäbchen	6-9% Blasten, keine Auerstäbchen
CMML2	5-19% Blasten, Auerstäbchen möglich	10-19% Blasten, Auerstäbchen möglich

1.4.2 Klinik bei CMML

Häufig wird die CMML im Rahmen einer Routineuntersuchung diagnostiziert. Wie auch bei anderen myeloischen Neoplasien hängt die Symptomatik vom Ausmaß der hämatopoetischen Insuffizienz ab. Die Klinik ähnelt dem des MDS oder den chronischen MPN. Ähnelt der Phänotyp einem MDS weisen Patienten im PB häufig eine Zytopenie mit den entsprechenden Folgen auf, je nach betroffener Zelllinie. Bei Patienten mit einem MPN-Phänotyp weisen ungefähr 50% eine Splenomegalie auf. Übersteigen die Leukozytenwerte 13 $x10^9$/l im PB kann eine Infiltration myelomonozytärer Zellen in Haut, Pleura und Peritoneum auftreten.

1.4.3 Prognose bei CMML

Bei der CMML spielen chromosomale und molekulare Parameter zur Einordnung nach dem *CMML-specific prognostic scoring system* (CPSS) eine Rolle. Zusätzlich werden hierfür der medulläre Blastenanteil, das Ausmaß der Zytopenien sowie die Transfusionsbedürftigkeit mit einbezogen. Es erfolgt zunächst die Einteilung in eine genetische Risikogruppe, diese wird für die Einteilung in 4 molekulare Risikogruppen benötigt (niedrig, intermediär I, intermediär II, hoch) (Tab. 7).

Tab. 7 Prognostische Faktoren bei CMML nach dem CPSS molekular (Such et al. 2013)

Score Punkte	**0**	**1**	**2**
Zytogenetische Risikogruppe	niedrig	intermediär	hoch
ASXL1	unmutiert	mutiert	
NRAS	unmutiert	mutiert	
RUNX1	unmutiert		mutiert
SETBP1	unmutiert	mutiert	
Genetischer Risikogruppen	Punkte		
Niedrig	0		
Intermediär 1	1		
Intermediär 2	2		
Hoch	≥ 3		

Score Punkte	Genetische Risikogruppe	KM Blasten (%)	Leukozyten (10^9/l)	Transfusionsbedarf*
0	Niedrig	< 5	< 13	Nein
1	Intermediär 1	≥ 5	≥ 13	Ja
2	Intermediär 2			
3	Hoch			
Molekulare Risikogruppen	**Punkte**	**Überleben** (Median in Monaten)		
Niedrig	0	72		
Intermediär 1	1	31		
Intermediär 2	2-3	13		
Hoch	≥ 4	5		

Zytogenetische Risikogruppen: Niedrig (Normal, -Y); Intermediär (andere Aberrationen)
Hoch (+8, komplexer Karyotyp, Aberrationen von Chromosom 7)

* definiert als >2 EK alle 8 Wochen über 4 Monate

Zunächst wird die genetische Risikogruppe beurteilt, diese ist neben dem Blastenanteil, Leukozytenanteil und Transfusionsbedarf ein berücksichtigter Faktor für die Einteilung in die molekulare Risikogruppe.

1.4.4 Therapie der CMML

Die Therapie richtet sich nach dem Erkrankungsstadium des Patienten, den klinischen Symptomen und dem Allgemeinzustand. Patienten in der Niedrigrisiko-Gruppe werden gemäß „watch and wait“ beobachtet und erhalten gegebenfalls eine supportive Therapie. Bei Patienten mit intermediären oder hohen Risiko ist unter Umständen eine aSZT induziert. Auch eine Therapie mit 5-Azacitidin oder Decitabin kann erwogen werden. Zur zytoreduktiven Therapie kann Hyroxyurea eingesetzt werden.

1.5 DNA- Reparatur

Die DNA-Reparatur Systeme innerhalb einer Zelle spielen die Schlüsselrolle, um Mutationen und chromosomale Veränderung zu verhindern. Durch exogene Noxen wie UV-Strahlung und endogene Mechanismen wie Replikationsstress und reaktive Sauerstoffspezies unterliegt die DNA einer kontinuierlichen Schädigung (Hoeijmakers 2001). Die genomische Integrität wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert, wie beispielsweise DNA-Schadencheckpoints oder Mitose Checkpoints. Defekte in der Regulation dieser Mechanismen können zu genomischer Instabilität führen, was schließlich in einer malignen Transformation resultieren kann. Die meisten Krebszellen weisen genomische Instabilität auf (Yao und Dai 2014). Basenläsionen in der DNA können mittels Basenexzisionsreparatur (BER) repariert werden. Hierbei wird zunächst die beschädigte Base durch eine Schadens-spezifische DNA-Glykosylase entfernt, sodass an der DNA entweder eine Purinbase oder eine Pyrimidinbase fehlt und somit eine abasische Seite entsteht. Eine apurinsche/apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) schneidet am 5‘ Ende des DNA Rückrates an der abasischen Seite, sodass ein DNA-Einzelstrangbruch (SSB, *single strand break*) entsteht und die Reparatur dieser Stelle eingeleitet wird. Die DNA wird anschließend entweder über einen „short patch” oder „long patch” Weg repariert. Bei der „short patch“ Reparatur wird ein einzelnes Nukleotid an die Stelle des Bruchs durch eine Polymerase β eingefügt, die den unbeschädigten Strang als Vorlage nutzt. Hingegen werden bei der „long patch“ Reparatur 8-13 Nukleotide an die Stelle des Bruchs durch eine Polymerase δ oder ε eingefügt. Der Überhang an Nukleotiden bei der „long patch“ Reparatur wird mit einer Flap-Endonuklease geschnitten. In einem letzten Schritt verbindet die DNA Ligase IIIα den neuen Strang mit der DNA (Hinz und Czaja 2015) (Abb.3). Werden diese SSB nicht repariert, können daraus bei der Replikation DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen. Diese stellen schwerwiegende DNA-Läsionen dar. In Säugetieren können diese entweder durch homologe Rekombination (HR), nicht-homologe Rekombination (NHEJ) oder alternative nicht-homologe Rekombination (AEJ) repariert werden (Brandsma und Gent 2012; Chang et al. 2017). Bei der HR dient ein intaktes Schwesterchromatid als Vorlage für eine fehlerfreie DNA-Synthese zur Reparatur des DSB, weshalb diese nur in der S- und G2-Phase erfolgen kann. Im Gegensatz hierzu wird NHEJ unabhängig von der Zellzyklusphase durchgeführt. Hierbei werden die DSB-Enden

nach Hinzufügen oder Entfernen einiger Basenpaare wieder verknüpft, sodass dieser Prozess potentiell mutagen ist. AEJ setzt nur dann ein, wenn HR und NHEJ nicht verfügbar sind. AEJ nutzt Mikrohomologien an den Enden von DSB und ist durch den Verlust von Basenpaaren gekennzeichnet. AEJ spielt eine besondere Rolle bei der Bildung von Translokationen (Lieber 2010).

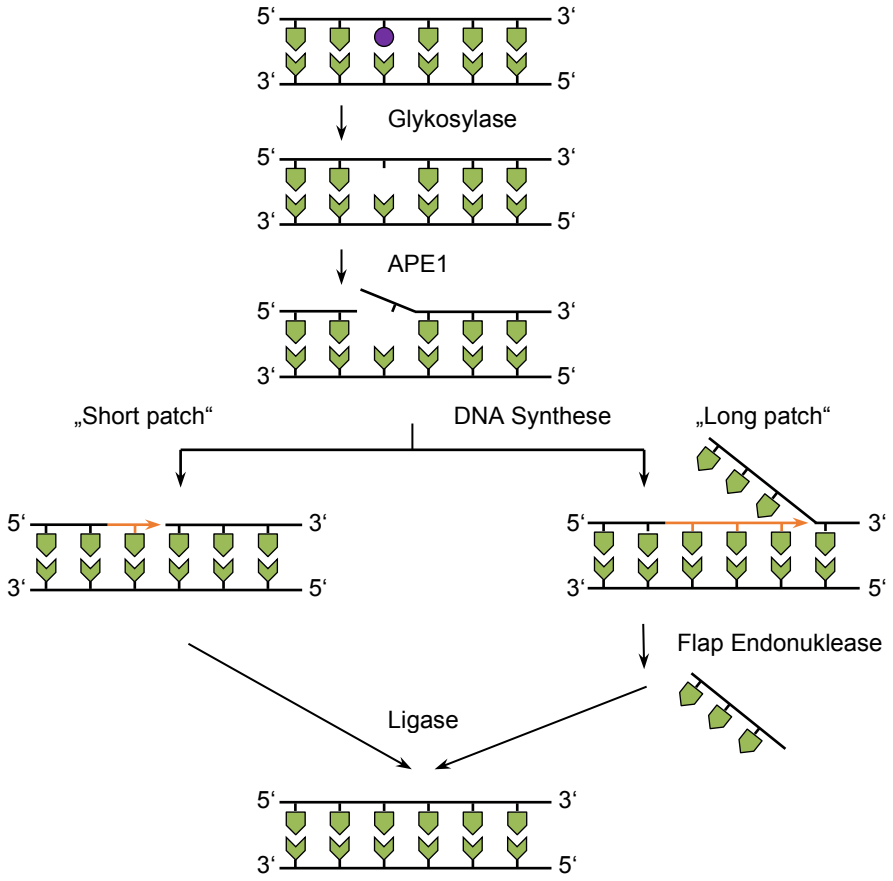

Abb. 3 Schematische Darstellung der Basen Exzisionsreparatur (modifiziert von Hinz und Czaja 2015)
Bei der BER wird die geschädigte Base (lila) von einer Glykosylase entfernt. Anschließend schneidet eine APE1 an der zuvor entstandenen AP-Stelle. Bei der DNA Synthese wird entweder ein einzelnes Nukleotid („short patch“) oder 8-13 Nukleotide („long patch“) an die Stelle des zuvor entstandenen Bruchs eingefügt. Eine Ligase verbindet den neuen Strang mit der DNA. Abkürzungen: BER, Basen Exzisionsreparatur; AP, apurinisch/apyrimidinisch; APE1, apurinische/apyrimidinische Endonuklease 1.

1.6 Synthetische Letalität

Synthetische Letalität beschreibt das Verhalten zwischen zwei Genen, bei denen der Verlust nur eines Genes keine Auswirkungen auf die Zelle hat, doch der Verlust beider Gene zum Tod der Zelle führt (Helleday 2011). Anwendung hat dieses Phänomen bereits bei Platin-sensitiven BRCA-mutierten Ovarialkarzinomen im Rezidiv gefunden. BRCA1 und BRCA2 sind Tumorsuppressoren und werden zudem bei der HR benötigt. Ein weiteres Enzym, welches eine Rolle bei der DNA-Schadensreparatur spielt, ist die poly (ADP- Ribose) Polymerase (PARP). Tumore mit Defekten in BRCA1/2 reagieren sensitiv auf die Inhibition von PARP, wobei die gesunden Zellen intakt bleiben. Durch die Inhibition von PARP erhöht sich die Anzahl an SSB, die in Zellen mit einem Defekt in der HR nicht repariert werden können. Während der Replikation kommt es zu DSB, die zum Zelltod führen können. Im Jahr 2014 wurde der erste PARP Inhibitor, Olaparib, in Europa zur Behandlung von Ovarial- und Brustkrebs mit BRCA Mutation zugelassen (Evers et al. 2010).

1.7 PARP

PARP1 und PARP2 gehören zur PARP-Familie und sind in Chromatin-Modifikationen, Regulation von Transkriptionsfaktoren und die DNA-Reparatur involviert (Amé et al. 2004). Das Enzym besteht aus drei Domänen:

- einem Zink (Zn)- Finger, der DNA- bindenden Domäne (DBD)
- einer Automodifikationsdomäne (AD) sowie
- einer katalytischen Domäne (KD).

Die DBD enthält zwei Zn-Finger, die wichtig für die Bindung von PARP1 an SSB und DSB sind (Abb.4). Ein dritter Zn-Finger in der DBD spielt eine Rolle bei Veränderungen dieser Domäne, die durch die Bindung an SSBs oder DSBs induziert wird. Zusätzlich enthält die DBD noch ein Kernlokalisierungssignal (KLS) welches benötigt wird, um PARP1 in den Zellkern einzuschleusen. In der AD dienen spezifische Glutamat- und Lysinreste als Akzeptoren von ADP-Ribose Einheiten, die an das Zielprotein und auch PARP1 selbst gebunden werden. Es entstehen Polymerketten, diese posttranslationale Modifikation wird als PARylierung bezeichnet (Rouleau et al. 2010). Durch die PARylierung verändert PARP1 unter anderem die

Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Das Hinzufügen der ADP-Riboseeinheiten wird von der KD, unter der Verwendung von NAD^+ als Substrat, katalysiert. Dazu dienen unter anderem Histidin und Tyrosinreste in der KD.

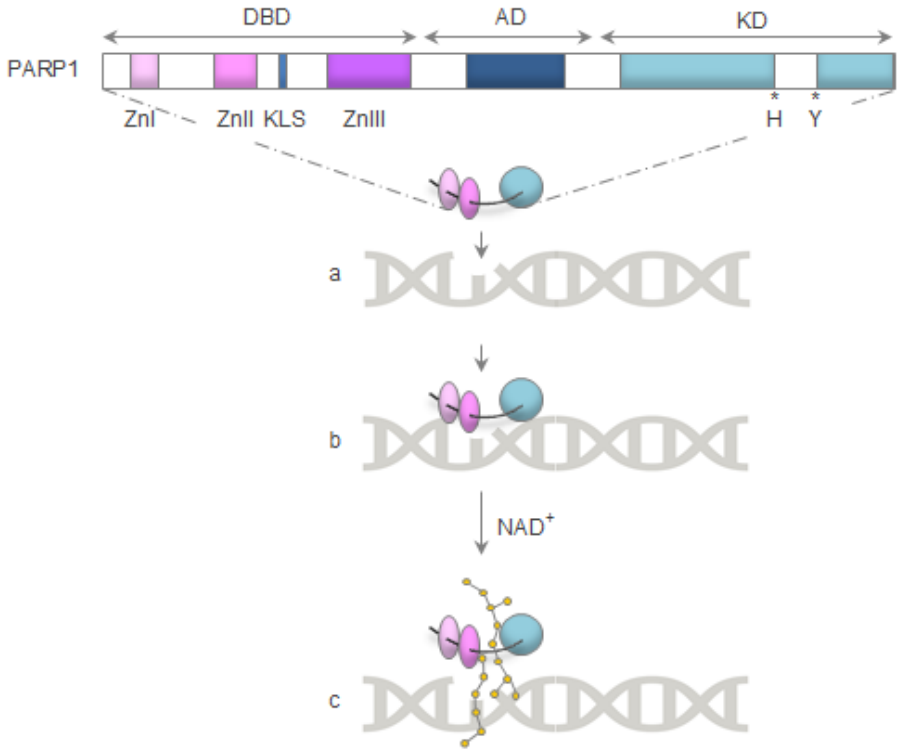

Abb. 4 Schema: Struktur und Funktion von PARP1 (modifiziert von Rouleau et al. 2010)
PARP1 setzt sich aus einer DBD, einer AD und einer KD zusammen. Die DBD erkennt und bindet an DNA-SSB und DSB (a,b). Die KD katalysiert die PARylierung von ADP-Ribose Einheiten indem es NAD^+ als Substrat verwendet. Dadurch entstehen Poly-ADP Riboseketten an Zielproteinen (c), die für die Reparatur benötigt werden, sowie PARP1 selbst. Abkürzungen: PARP, poly (ADP-Ribose) Polymerase; DBD, DNA-bindende Domäne; AD, Automodifikationsdomäne; KD, katalytische Domäne; Zn, Zink; H, Histidin; Y, Tyrosin.

Die am meisten untersuchte Funktion von PARP1/2 ist die der DNA-Schadensreparatur. Hierbei spielt das Enzym sowohl bei SSB wie auch bei DSB eine Rolle (Vos et al. 2012). Dabei detektiert zunächst die DNA-bindende Domäne den Schaden an der DNA, woraufhin PARP1 mit der Synthese der poly-ADP Riboseketten (pADPr) an Histone, PARP1 selbst und Proteine, welche für die Reparatur benötigt werden, beginnt. Durch die negative Ladung der pADPr verliert

PARP1 seine Affinität für die DNA, sodass weitere Reparaturproteine durch pADPr an die geschädigte DNA rekrutiert werden können (Gibson und Kraus 2012).
Durch PARP-Inhibitoren, wie zum Beispiel Olaparib, kann PARP nicht mehr von der DNA dissoziieren. Die Inhibitoren binden an das aktive Zentrum, welches mit der DNA assoziiert ist, was als PARP trapping bezeichnet. Das Enzym verbleibt an der DNA und blockiert den Platz für weitere Reparaturproteine. Stößt die Replikationsgabel auf das PARP-DNA Addukt kann es zu einem DSB kommen (Shen et al. 2015).

1.8 Ziel der Arbeit

Nach Therapieversagen verschlechtert sich die Prognose bei Hochrisiko-MDS Patienten auf ein medianes Überleben von weniger als 6 Monaten (Prébet et al. 2011). Bei AML Patienten (< 65 Jahre) liegt das mediane Überleben nach einem Versagen der Behandlung bei weniger als 10 Monaten (Oran und Weisdorf 2012). Neue Therapiemöglichkeiten sind daher erforderlich. Ein möglicher therapeutischer Ansatz beruht in dem Ausnutzen des Prinzips der synthetischen Letalität. Ein hoch potenter Inhibitor ist Talazoparib, hierbei handelt es sich um einen PARP-Inhibitor, der im Jahr 2019 für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinoms mit Keimbahn-BRCA1/2 Mutation zugelassen wurde. Eine Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren bei MDS und AML konnte bereits nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine besonders hohe Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren bei AML, mit Nachweis des Transkriptionsfaktors AML1-ETO (RUNX-RUNX1T1) oder des Fusions-Onkoproteins PML-RARα (PML-RARA). Andere genetische Einflussfaktoren sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Für Inhibitoren von APE1 konnte eine Wirksamkeit durch synthetische Letalität, unter anderem bei BRCA1 defizienten humanen Burstkrebszelllinien, nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Effekt der synthetischen Letalität von Talazoparib und APE1 Inhibitor III (APE1i) auf Zellen von AML, MDS sowie CMML Patienten genauer untersucht werden. Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Haben Talazoparib und APE1i einen signifikant negativen Einfluss auf die Vitalität von $CD34^+$ Zellen bei AML, MDS und CMML Patienten *in vitro* im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sowie auf MDS-L sowie SKM1 Zelllinien?

2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der genetischen Instabilität der Zellen und einem Ansprechen auf die Inhibitoren?

3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Karyotyp oder dem Mutationsstatus und einem Ansprechen auf die Inhibitoren?

4. Hat das Proliferationsverhalten der Zellen einen Einfluss auf das Ansprechen der Inhibitoren?

5. Sprechen $CD34^+$ Zellen, die eine höhere *PARP1* beziehungsweise *APE1* Expression aufweisen, besser auf die Inhibitoren an?

6. Gibt es einen Zusammenhang in Bezug auf das Verhalten der $CD34^+$ Zellen auf die Inhibitoren und die klinischen Verläufe der Patienten?

7. Kann der letale Effekt auf $CD34^+$ Zellen von Decitabin in Kombination mit Talazoparib oder APE1i erhöht werden?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma	Firmensitz
Brutschrank Function line BB16 Cu	Heraeus Holding GmbH	Hanau, D
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Cytospin™-System	Heraeus Holding GmbH	Hanau, D
Deckgläser für Objektträger	Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen, D
Feinwaage	Sartorius AG	Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 2	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D
Kamera am Mikroskop: Cool Cube	MetaSystems Hard & Software GmbH	Altlussheim, D
Leucosep™ Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, A
LightCycler® 480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, D
LS Columns	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH	Hanau, D
Mikroskop DMLS	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, D
Mikroskop JenovalOpton ID02	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D
Nanodrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer improved	Brand GmbH & Co.KG	Wertheim, D
Objektträger 3- Well, beschichtet	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
pH-Meter PB- 11	Sartorius AG	Göttingen, D
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, D
Pre- Seperation Filters	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Tecan Reader infinite F200 pro	Tecan Group AG	Männedorf, CH
Thermocylcer Mastercyler®	Eppendorf AG	Hamburg, D
Vortex Mixer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG	Schwabach, D
Wasserbad SW20C	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, D
Zentrifugeneinsätze	Heraeus Holding GmbH	Hanau, D

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firma	Firmensitz
APE1 Inhibitor III	Selleck Chemicals LLC	Houston, USA
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
CellTiter-Glo®	Promega Corporation	Fitchburg, USA
ChemiBLOCKER™	Chemicon International, Inc.	Temecula, USA
Colcemid (10µg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Decitabin	Merck KGaA	Darmstadt, D
ddH_2O	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, D
DMSO	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
Ethanol absolut	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Ficoll- Paque™ Premium	GE Healthcare GmbH	Freiburg, D
Fötales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Giemsa	Merck KGaA	Darmstadt, D
GM-CSF	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Kaliumchlorid- Lösung	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
L-Glutamin (200mM)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
Methanol	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
RPMI-1640	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
SSC Puffer 20x	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
StemSpan SFEM II	StemCell Technologies Inc.	Vancouver, CA
StemSpan Myoloid Expansion Supplement	StemCell Technologies Inc.	Vancouver, CA
Talazoparib	Selleck Chemicals LLC	Houston, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, USA
Vectashield® Antifade Mounting Media	Vector Laboratories Inc.	Burlingame, USA

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Firma	Firmensitz
Alexa Fluor 488 goat- anti mouse	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Anti-γH2AX, clone JBW301	Merck KGaA	Darmstadt, D

2.1.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x Lysispuffer	82,91 g NH_4Cl [1,55M]
	7,91 g NH_4HCO_3 [0,1 M]
	2 ml EDTA pH 8 [0,5M]
Phosphatpuffer	11,4 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$
	4,9 g KH_2PO_4

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Firma	Firmensitz
MDS-L	Dr. Kaoru Tohyama Kawasaki Medical School	Okayama, JP
SKM1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig, D

2.1.6 Kit Systeme

Kit System	Firma	Firmensitz
CD34 MicroBead Kit human 10*10	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen N.V.	Venlo, NLD
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V.	Venlo, NLD
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V.	Venlo, NLD

2.1.7 Kommerziell erworbene Primer

Primer	Firma	Firmensitz
Hs_APEX1_1_SGQuantiTect Primer Assay	Qiagen N.V.	Venlo, NLD
Hs_GUSB_1_SGQuantiTect Primer Assay	Qiagen N.V.	Venlo, NLD
Hs_PARP1_1_SGQuantiTect Primer Assay	Qiagen N.V.	Venlo, NLD

2.1.8 Software

Software	Firma	Firmensitz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
i-control 1.10	Tecan Group AG	Männedorf, CH
Ikaros	MetaSystems Hard & Software GmbH	Altlussheim, D
Isis	MetaSystems Hard & Software GmbH	Altlussheim, D
LightCyler™ Systems	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, D
ND-1000 V3.7.0	Thermo Fisher Scientific Inc.	Wilmington, USA
MS Office 2010 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Corporation	Washington, USA
SAS Software 9.4	SAS Institute Inc.	Cary, USA

2.1.9 Patientenproben

Alle Analysen wurden aus KM von insgesamt 28 Patienten mit gesicherter Diagnose sowie 8 gesunden Spendern durchgeführt. 20 Patienten wiesen eine AML auf, 4 Patienten ein MDS und 4 Patienten eine CMML. Die Analysen erfolgten an Proben von Patienten, die entweder für Diagnostik und Verlaufskontrollen, oder im Rahmen von Studien an der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, entnommen wurden. Für die Untersuchung von Patientenmaterial zu Forschungszwecken liegen positive Ethikvoten der Universität Mannheim vor. Alle Patienten werden vor der Probenentnahme vom behandelnden Arzt über den wissenschaftlichen Charakter der weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis wird eingeholt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus KM

Für die Kultivierung vitaler Zellen wurde heparinisiertes KM von gesunden Spendern, sowie von AML, MDS und CMML Patienten vor Therapiebeginn, genutzt. Aus diesem wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen (MNC) isoliert. Durch die Zugabe von Ficoll-Paque™, einem synthetisch hergestellten Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, entsteht in einem Zentrifugenröhrchen ein Dichtegradient. Aufgrund dieses Gradienten trennen sich die Bestandteile des KM bei anschließender Zentrifugation gemäß ihrer Dichte auf. Nach der Zentrifugation befinden sich am Boden des Röhrchens Erythrozyten und Granulozyten, darüber liegt die Ficoll-Paque™ Schicht, gefolgt von den MNC und zuletzt dem Plasma.
Für die Zentrifugation wurden Leucosep™ Röhrchen genutzt diese besitzen eine poröse Polyethylen-Membran, die für eine effizientere Auftrennung sorgt. Zunächst wurden 15 ml Ficoll-Paque™ auf die Membran pipettiert und anschließend bei 760 g [9,81m/s^2] für 1 min zentrifugiert. Dadurch diffundiert das Ficoll-Paque™ unter die Membran. Anschließend wurde das KM mit sterilem PBS verdünnt, bis ein Volumen von 35 ml erreicht wurde. Diese Lösung wurde vorsichtig auf die Membran überführt und bei 1000 g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Die MNC bilden einen weißen Ring oberhalb der Membran, der nach der Zentrifugation abgenommen wurde. Mit sterilem PBS wurde die Membran gewaschen, um verbleibende Zellen herauszulösen. Um eventuell verbleibende Erythrozyten aus den MNC zu entfernen, wurden diese zunächst bei 270 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 10 ml Lysis Puffer aufgenommen. Die Erythrozyten platzen aufgrund des osmotischen Drucks, die MNC bleiben unversehrt, da deren Membran proteinreicher ist und sie ein gut ausgebildetes Zytoskelett besitzen. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis, wurde die Reaktion durch die Zugabe von sterilem PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde nochmals für 10 min bei 270 g zentrifugiert, aus den gewonnen Zellen wurden anschließend CD34$^+$ Zellen isoliert.

2.2.2 Isolation von $CD34^+$ Zellen aus MNC

Die $CD34^+$ Zellen wurden durch magnetisch aktivierte Zellseparation isoliert. Hierbei wurden die Zellen mit magnetischen MicroBeads, welche mit $CD34^+$- Antikörper konjugiert sind, markiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine Säule gegeben, die in einem magnetischen Feld platziert ist. Die magnetisch markierten $CD34^+$ Zellen werden in der Säule zurück gehalten. Wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, können die zuvor zurückgehaltenen $CD34^+$ Zellen aus der Säule eluiert werden. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte mit dem humanen CD34 MicroBead Kit nach Herstellerprotokoll.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Dies ist ein Farbstoff, der die Membran von toten Zellen passiert, vitale Zellen nehmen Trypanblau nicht auf. 10 µl einer entsprechenden Zellverdünnung in Trypanblau wurden in eine Neubauerzählkammer gefüllt. Diese besitzt ein aus 9 Quadraten eingraviertes Gitter und weist ein definiertes Gesamtvolumen von 1 mm^3 auf (dies entspricht 1 µl). Um die Zellzahl je 1 ml zu berechnen werden die gezählten Zellen mit 10^4 multipliziert, diese Zahl wird als Kammerfaktor bezeichnet. Unter einem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in 4 Quadraten gezählt und der Mittelwert der Zellzahl genutzt, um diese nach folgender Formel zu determinieren:

$$\boldsymbol{Mittelwert\ Zellzahl\ x\ Verdünnungsfaktor\ x\ Kammerfaktor = Zellen\ Pro\ ml}$$

2.2.4 Kultivierung von MDS-L und SKM1 Zelllinien

Bei SKM1 handelt es sich um eine humane AML Zelllinie, bei MDS-L um eine humane MDS Zelllinie. Beides sind Zelllinien in Suspension. MDS-L und SKM1 wurden in RPMI mit 10% Fötalem Kälberserum (FKS), 2% Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Zu den MDS-L Zellen wurde zusätzlich 50 ng/µl GM-CSF dem Medium hinzugefügt. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Dazu wurden 10 µl der Suspension entnommen und in einer entsprechenden Menge Trypanblau gezählt. Die Zellen wurden zentrifugiert und

anschließend auf eine Zellzahl von $4x10^5$ bei MDS-L, beziehungsweise $3x10^5$ Zellen pro ml bei SKM1 mit frischem RPMI-1640 eingestellt.

2.2.5 Ansetzen der Inhibitoren

Die Stock Lösungen von 50 mM Talazoparib III, 5 mM APE1i und 50 mM Decitabin wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die verdünnten Inhibitoren wurden bei -20°C gelagert.

2.2.6 *In vitro* Behandlung der $CD34^+$ Patientenzellen

Vital asservierte Zellen wurden für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 in StemSpan™ Medium expandiert, welches das $CD34^+$ Expansions-Supplement enthielt. Letzteres begünstigt die selektive Expansion von $CD34^+$ Zellen und beinhaltet unter anderem rekombinantes humanes Interleukin 3 und 6, den rekombinanten humanen Stammzellenfaktor, rekombinantes humanes Thrombopoietin sowie den rekombinanten humanen fms-like Tyrosine Kinase 3 Liganden. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach der Expansion der Zellen an Tag 4, 5 und 6, wobei die Inhibitoren jeden Tag in den gleichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben wurden. Frisch isolierte Zellen wurden ohne eine vorherige Expansion direkt mit den Inhibitoren an Tag 1, 2 und 3 behandelt. Bei Decitabin lag die hinzu gegebene Konzentration bei 30-180 nM, bei Talazoparib 2,5-15 nM und bei APE1i 100-600 nM (Tab.8). Die Inhibitoren wurden zunächst mit PBS verdünnt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS. Bei einem Ansatz wurden je Well $3x10^4$ $CD34^+$ Zellen genutzt.

Tab.8 Eingesetzte Konzentrationen der Inhibitoren bei $CD34^+$ Zellen

APE1i [nM]	Decitabin [nM]	Talazoparib [nM]
100	30	2,5
200	60	5
300	90	7,5
400	120	10
500	150	12,5
600	180	15

2.2.7 *In vitro* Behandlung der Zelllinien

Die Versuche wurden für MDS-L sowie SKM1 analog durchgeführt, allerdings mit Unterschieden in der Konzentration der hinzugegebenen Inhibitoren. Für einen Versuch wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, sodass diese anschließend in frischem RPMI-1640 aufgenommen werden konnten. Je Konzentration wurden $4x10^4$ Zellen verwendet. Die Inhibitoren wurden an Tag 1, 2 und 3 zu den Zellen dazu gegeben. Bei SKM1 lag die höchste Konzentration bei Decitabin, Talazoparib und APE1i bei 10 µM. Diese wurde bei allen drei Inhibitoren in weiteren Verdünnungsschritten jeweils 1:2 mit PBS verdünnt, bis die niedrigste Konzentration bei Decitabin 78,13 nM, bei Talazoparib 156 nM und APE1i bei 312,5 nM lag. Auch bei MDS-L wurden alle Inhibitoren im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die höchste Konzentration bei Decitabin lag bei 256 µM, die geringste bei 250 nM. Bei Talazoparib lag die höchste Konzentration bei 1600 nM und die niedrigste bei 50 nM. Die höchste Konzentration bei APE1i lag bei 8000 nM die niedrigste bei 250 nM (Tab.9).

Tab. 9 Eingesetzte Konzentrationen der Inhibitoren bei MDS-L und SKM1

MDS-L			SKM1		
APE1i [nM]	**Decitabin [nM]**	**Talazoparib [nM]**	**APE1i [nM]**	**Decitabin [nM]**	**Talazoparib [nM]**
--	78,125	--	250	250	50
--	156,25	156,25	500	500	100
312	312,5	312,5	1000	1000	200
625	625	625	2000	2000	400
1250	1250	1250	4000	4000	800
2500	2500	2500	8000	8000	1600
5000	5000	5000	--	16000	--
10000	10000	10000	--	32000	--
--	--	--	--	64000	--
--	--	--	--	128000	--
--	--	--	--	256000	--

2.2.8 Viabilitätsassay

An Tag 6 wurde die Viabilität der behandelten Zellen gemessen. Hierzu wurde der CellTiter-Glo® Assay gemäß Herstellerprotokoll genutzt. Dieser bestimmt die Anzahl viabler Zellen in einer Zellkultur basierend auf der Quantifizierung von ATP. Dieses ist in metabolisch aktiven Zellen präsent. Zu der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 das CellTiter-Glo® Reagenz hinzugegeben. Dieses enthält eine thermostabile Luciferase sowie Luciferin. Durch die Reaktion mit ATP und der Luciferase wird die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Hierbei entsteht ein lumineszentes Signal, welches in einem Tecan Microplate Reader mit der i-Tecan™ Software gemessen wurde. Das lumineszente Signal ist proportional zu dem ATP-Gehalt, und dieser ist wiederum direkt proportional zur Zahl der viablen Zellen in der Kultur.

2.2.9 RNA Isolation

Bevor die $CD34^+$ Zellen behandelt wurden, wurden $1x10^5$ Zellen zur Isolierung von RNA genutzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Darauffolgend wurde die RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kit nach Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.10 cDNA Synthese

Mittels reverser Transkription wurde die zuvor isolierte RNA, unter Verwendung des QuantiTect® Reverse Transcription Kit, in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA Synthese wurden 500 ng/µl RNA eingesetzt. Diese wurde mit Nuklease freiem Wasser zu einem Volumen von 12 µl aufgefüllt, und zusammen mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer für 2 min bei 42°C in einem Thermocycler inkubiert. Zu der Probe wurde nun ein Master Mix hinzugefügt, der die Reverse Transkriptase, einen Primer Mix und einen Reverse Transkriptase Puffer entsprechend der Konzentrationen des Herstellers enthielt. Der fertige Reaktionsmix wurde für 30 min bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase durch Inkubation bei 95°C für 3 min inaktiviert. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.11 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop® ND-1000 bestimmt. Dieser kann die Konzentration von Proteinen, RNA sowie DNA messen und deren Reinheit anzeigen. Um den Nullwert zu bestimmen, wurde das Gerät zunächst mit Wasser beladen. Anschließend wurde die Probe aufgetragen, hierbei bildet das Gerät aus der Probe eine flüssige Säule, die als Strahlenweg dient. Das Spektrometer kann nun das Licht messen, welches durch die Probe passiert und so mit Hilfe des Programmes ND 1000 3.3 RNA analysieren. Neben der RNA-Konzentration erhält man Werte der optischen Dichte (OD). Bei einer 100% Reinheit der RNA liegt die OD260/OD280 bei 2,0. Für die Versuche wurde RNA mit Werten zwischen 1,8 und 2,2 genutzt.

2.2.12 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Bei der qRT PCR kann die Menge eines Zielgenes, basierend auf einer PCR in Echtzeit, quantifiziert werden. Hierbei wird die Fluoreszenz eines Farbstoffs gemessen, welcher spezifisch mit der DNA interkaliert. Durch die Amplifikation der DNA kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz, die proportional zur Menge des Zielgenes ist. Die mRNA Expression von *PARP1* und *APE1* wurde in gesunden Spender Zellen, in MDS/CMML sowie in AML Zellen gemessen. Für die qRT-PCR wurde das QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit mit kommerziellen, bioinformatisch validierten Primersets für *PARP1* und *APE1* gemäß des Herstellerprotokolls verwendet (Tab. 10).

Tab. 10 Konzentration und Programm der QuantiFast® SYBR® Green PCR

Komponenten pro Probe	PCR Programm	Temperatur	Zeit
2,5 µL Primer Mix	Aktivierung	95°C	5 min
12,5 µL SYBR Green Master Mix	40 Zyklen		
2 µL cDNA	Denaturierung	95°C	10 sec
8 µL PCR Wasser	Annealing/ Extension	60°C	30 sec

Die Proben wurden in Triplikaten mit einem LightCycler® 480 II System gemessen. Um die Daten zu normalisieren, wurde zudem die Expression des Housekeeping

Genes *GUSB* gemessen. Ausgewertet wurden die Daten mit Hilfe der Software LightCycler™ Systems.

2.2.13 Immunofluoreszenzfärbung von γH2AX

Zur Erfassung von DNA-Schäden dient die Färbung γH2AX Foci. Hierbei handelt es sich um die phosphorylierte Form des Histons H2AX, die dann als γH2AX bezeichnet wird. Durch die Phosphorylierung bildet sich ein stabiler Reparaturkomplex an der Stelle des DNA Bruchs. Durch Fluoreszenzfärbung lassen sich diese am Mikroskop als sogenannte Foci erkennen. Die Anzahl an Foci entspricht der Anzahl an DNA-Brüchen innerhalb einer Zelle (Sedelnikova et al. 2002).
In dieser Arbeit wurden unbehandelte $CD34^+$ Zellen durch Zentrifugation bei 250 g für 10 min in einem Zytocontainer auf einen Objektträger gebracht. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen 3 mal für 5 min mit 5% Chemiblocker inkubiert. Die Färbung des 1. Antikörpers (Maus Monoklonal anti-γH2AX, clone JBW301; 1:500 verdünnt) erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Inkubation mit dem zweiten AK (Alexa-Fluor 488 konjugiert Ziege anti-Maus; 1:500 verdünnt) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur (RT), nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und 2% Chemiblocker inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit Mountingmedium eingedeckt, letzteres enthält 4,6-Diamidino-2-Phenylindole. Analysiert wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop bei einer 100 fachen Vergrößerung, wobei jeweils 50 Zellen mit Hilfe der Isis Software ausgewertet wurden.

2.2.14 Zytogenetik

In Bezug auf das Ansprechen auf eine Therapie sowie das Überleben, stellt der Karyotyp der leukämischen Blasten einen wichtigen prognostischen Parameter dar. Für die zytogenetische Analyse wurde zunächst eine entsprechende Menge KM (abhängig von der Leukozytenzahl) in 10 ml RPMI-1640 Medium mit Zusätzen überführt und für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurde 100 µl

Colcemid zu der Kultur hinzugegeben, und für einmal 0,5 und einmal 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Durch die Zugabe des Zellgiftes Colcemid werden die Zellen in der Metaphase arretiert, indem die Ausbildung der Mitosespindel verhindert wird. Nach der Inkubation mit Colcemid wurde die Kultur in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Zellpellet mit 12 ml 37°C warmer Kaliumchlorid-Lösung (KCl, 0,075 mol/l) resuspendiert. Die KCl-Lösung sorgte in einer 15 minütigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C für ein Aufquellen der Zellen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde abermals der Überstand entfernt und das Zellpellet vorsichtig mit dem Fixativ resuspendiert. Hierzu wurde das -20°C kalte Fixativ, bestehend aus einem Methanol/Eisessig Gemisch (3:1), tröpfchenweise zu den Zellen hinzugegeben bis ein Volumen von 12 ml erreicht war. Die Fixation erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet wurde mit Fixativ resuspendiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Die Zellen wurden mit Fixativ aufgenommen und mit einer Pasteurpipette auf einen, zuvor mit 100% Ethanol entfetteten, Objektträger getropft und anschließend direkt mit Fixativ abgespült. Durch den Aufprall zerplatzten die Zellen und die Chromosomen standen anschließend für die Färbung bereit. Die Objektträger wurden zunächst bei RT getrocknet und anschließend für 16h bei 58°C im Wasserbad, in einer Küvette mit 2x SSC Puffer inkubiert.
Alle genannten Zentrifugationsschritte wurden für 10 min bei 270 g durchgeführt.

2.2.15 Giemsa-Färbung

Um die Chromosomen mikroskopisch analysieren zu können, mussten diese zunächst mit Giemsa gefärbt werden. Dadurch entsteht eine Bänderung von hellen und dunklen Abschnitten auf jedem Chromosom, wobei jedes Chromosom eine eigene spezifische Bänderung hat. Anhand der Bänderung können die Chromosomen eindeutig identifiziert werden. Zunächst wurden 100 ml einer 1:9 Verdünnung von Phosphatpuffer mit ddH_2O, die zusätzlich 8 ml Giemsa enthält, hergestellt. In diese Färbelösung wurden die Objektträger für 3 min gestellt und gefärbt. Abschließend wurden letztere mit ddH_2O gespült und luftgetrocknet.

Die Chromosomenanalyse erfolgte mit dem Plan Neofluar x 100/1.30 Öl Objektiv des Axioskop 2 im Phasenkontrast. Die Bestimmung des Karyotyps erfolgte gemäß der ISCN 2016, wobei immer 25 Metaphasen analysiert wurden.

2.2.16 Genmutationsanalysen

Molekulare Aberrationen können eine wichtige Rolle in der Diagnostik und Prognose bei AML und MDS spielen. Genmutationen wurden routinemäßig im Münchner Leukämie Labor analysiert.

2.2.17 Kryokonservierung der Zellen

Für den Fall, dass zuvor isolierte Zellen nicht direkt für einen Versuch genutzt werden konnten, wurden diese zunächst vital asserviert. Hierzu wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 500 µl RPMI-1640 Medium aufgenommen. Zu den Zellen wurde im Verhältnis 1:1 Einfriermedium hinzugegeben. Dieses enthielt 60% FKS, 20% DMSO und 20% RPMI-1640 Medium. Zusammen mit dem Einfriermedium wurden die Zellen in einem Kryoröhrchen zunächst für 1 Tag bei -80°C in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol langsam heruntergekühlt, eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.18 Auftauen kryokonservierter Zellen

Nachdem die vital asservierten Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden, wurden diese unverzüglich bei 37°C im Wasserbad erwärmt bis die Zellsuspension wieder flüssig war. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, und mit 15 ml RPMI-1640 Medium tropfenweise aufgefüllt. Um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern wurden den 15 ml RPMI-1640 Medium noch 500 µl DNase zugegeben. Diese 15 ml wurden anschließend mit RPMI-1640 Medium auf 30 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde bei 270 g für 8 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen, sodass die Zellen gezählt und für die Versuche eingesetzt werden konnten.

2.2.19 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit der SAS Software, sowie GraphPad Prism und Excel durchgeführt. Für die quantitativen Variablen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Mit dem Kruskal-Wallis Test wurden Gruppen, die größer als 2 waren, verglichen. Für den paarweisen Vergleich zweier Gruppen wurde der Wilcoxon 2-Proben Test genutzt. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0.05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, wobei die p-Werte wie folgt dargestellt wurden: *** $p < 0.001$, ** $p = 0.001$-0.01, * $p = 0.01$-0.05.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche an SKM1 und MDS-L Zelllinien

Bevor der Effekt der Inhibitoren Talazoparib, APE1i und Decitabin an Patientenzellen untersucht wurde, wurden diese zunächst an einer MDS (MDS-L) und einer AML (SKM1) Zelllinie getestet. Hierbei wurden die Inhibitoren in aufsteigenden Konzentrationen für drei Tage mit den Zellen inkubiert. An Tag 3 wurde die Vitalität der Zellen gemessen. Mit Hilfe der Messwerte konnte anschließend eine Überlebenskurve erstellt werden. Anhand dieser Überlebenskurve lässt sich die sogenannte IC_{50} berechnen. Dies ist die Konzentration bei der die Hälfte (50%) der Inhibition erreicht wird. Die Inhibition wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand des Überlebens der Zellen definiert, sodass bei der IC_{50} noch 50% der Zellen vital sind. Sowohl bei MDS-L als auch bei SKM1 nahm das Überleben der Zellen mit steigender Konzentration der Inhibitoren ab (Abb.5).

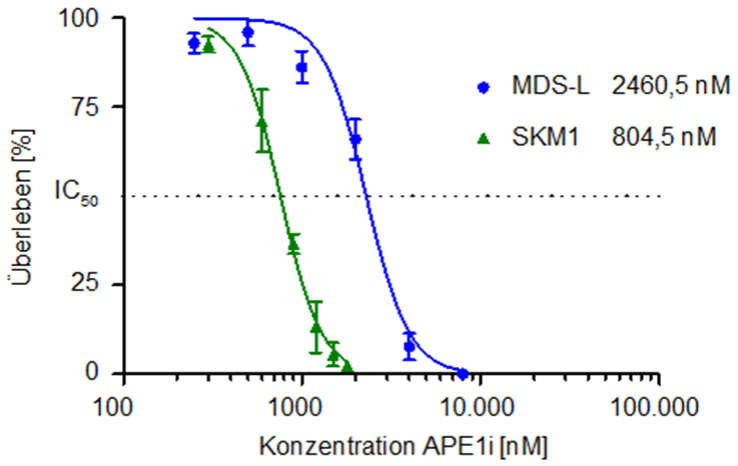

Abb. 5 Überlebenskurve MDS-L und SKM1 bei APE1 Inhibition
Zytotoxischer Effekt von APE1i nach drei Tagen Inkubation bei MDS-L und SKM1 Zellen. Mit steigender Konzentration sinkt das prozentuale Überleben der Zellen.

Dieser Effekt konnte für alle drei Inhibitoren beobachtet werden. Bei SKM1 sind die Durchschnittswerte der IC_{50} bei APE1i (804,5 nM) und Decitabin (680,2 nM) deutlich

niedriger als bei MDS-L (APE1i 2460,5 nM, Decitabin 4080,5 nM). Bei APE1i ist der Wert somit 2,9 fach, bei Decitabin 5,9 fach höher. Die Werte bei Talazoparib liegen mit 463,1 nM bei MDS-L und 553,7 nM bei SKM1 in einem ähnlichen Bereich.
Neben der alleinigen Gabe der Inhibitoren wurden diese auch in Kombination zu den Zellen gegeben. Hierbei wurden Decitabin und Talazoparib in absteigenden Konzentrationen, zusammen mit APE1i beziehungsweise Talazoparib inkubiert. Letztere wurden in gleich bleibenden Mengen zu den Zellen gegeben. Im Fall von Talazoparib war die Konzentration 50 nM bei MDS-L und SKM1, bei APE1i wurde bei SKM1 eine Konzentration von 300 nM und bei MDS-L von 500 nM genutzt. Diese Werte liegen alle unter der zuvor bestimmten IC_{50} für die entsprechende Zelllinie. Die Werte der IC_{50} bei Decitabin in Kombination mit Talazoparib waren in beiden Zelllinien deutlich niedriger als bei Decitabin alleine. So konnte Talazoparib die IC_{50} von 4080,5 nM bei MDS-L auf 143,8 nM verringern. APE1i hatte in Kombination mit beiden Inhibitoren kaum einen Effekt auf das Überleben der Zellen, lediglich bei Decitabin mit APE1i bei SKM1 konnte ein Effekt von 680,2 nM alleine zu 442,5 nM in Kombination beobachtet werden (Tab. 11).

Tab. 11 Durchschnittswerte der IC_{50} bei MDS-L und SKM1

	MDS-L	**SKM1**
APE1i [nM]	2460,5 (+/- 107,5)	804,5 (+/- 5,6)
Decitabin [nM]	4080,5 (+/- 1416,5)	680,2 (+/- 14,1)
+ APE1i [nM]	3908,0 (+/- 2401,0)	442,5 (+/- 23,5)
+Talazoparib [nM]	143,8 (+/- 114,7)	96,5 (+/- 12,63)
Talazoparib [nM]	463,1 (+/- 12,4)	553,7 (+/- 17,3)
+APE1i [nM]	389,8 (+/- 65,5)	545,9 (+/- 48,6)

3.2 Patientencharakteristika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die $CD34^+$ Zellen von 28 Patienten untersucht. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 68 Jahre (33-89). Mehr als die Hälfte der Patienten war männlich (64%; 18/28).

Mit 71% waren die meistern der Patienten (20/28) an einer AML erkrankt. Bei 45% (9/20) wurde eine sAML diagnostiziert, bei 55% (11/20) eine *de novo* AML. 14% (4/28) der Patienten waren an einem MDS erkrankt, von denen 50% (2/4) ein MDS-EB-1 und 50% (2/4) ein MDS-MLD aufwiesen. 14% (4/28) der Patienten hatten eine CMML, wobei 25% (1/4) eine CMML0 beziehungsweise CMML1 und 50% (2/4) der Patienten eine CMML2 aufwiesen.

Bei den 28 Patienten konnten insgesamt 82 Mutationen in 25 verschiedenen Genen nachgewiesen werden. Mit 13% (11/82) waren Mutationen in *ASXL1* am häufigsten. Auch Mutationen in den Genen *RUNX1, DNMT3A, FLT3-ITD, SRSF2*, *IDH2, NRAS, KMT2A-PTD, NPM1, TET2* und *U2AF1* wurden mit einer Häufigkeit von 10% bis 4% detektiert. Seltener wurden Mutationen in den Genen *BCOR, CBL, FLT3-TKD*, *GATA2*, *IDH1*, *JAK2*, *KRAS*, *RAEB2, SF3B1*, *TP53*, *WT1* und *ZRSR2* gefunden (jeweils 1-2%). Bei CMML Patienten gab es durchschnittlich 4 Mutationen pro Patient, bei MDS Patienten waren es durchschnittlich 2 und bei AML Patienten durchschnittlich 3 Mutationen pro Patient. Die am häufigsten vorkommende Mutation bei CMML und MDS Patienten waren Mutationen in *ASXL1*. Bei den AML Patienten war *DNMT3A* am häufigsten mutiert.

Von den 28 Patienten hatten 61% (17/28) einen normalen Karyotyp und 39% (11/28) einen aberranten Karyotyp (Tab. 12).

Als Kontrolle dienten 8 gesunde Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 30 Jahren (20-78). Alle gesunden Probanden hatten einen normalen Karyotyp, der Mutationsstatus wurde nicht untersucht.

Tab. 12 Patientencharakteristika von 28 Patienten mit AML, MDS und CMML

Parameter	Alle Patienten (n= 28)	CMML (n= 4)	MDS (n= 4)	AML (n= 20)
Alter				
Alter in Jahren (von-bis)	68 (33- 89)	75 (65-84)	64 (57-73)	67 (33-89)
Geschlecht				
Männlich, n (%)	18 (64)	3 (75)	2 (50)	13 (65)
Weiblich, n (%)	10 (36)	1 (25)	2 (50)	7 (35)
Karyotyp				
Normal, n (%)	17 (61)	3 (75)	2 (50)	12 (60)
Aberrant, n (%)	11 (39)	1 (25)	2 (50)	8 (40)
Mutationen	n= 82	n= 17	n= 9	n =56*
ASXL1, n (%)	11 (13)	3 (18)	3 (33)	5 (9)
BCOR, n (%)	2 (2)	--	--	2 (4)
CBL, n (%)	1 (1)	--	1 (11)	--
CEBPA, n (%)	2 (2)	2 (12)	--	--
DNMT3A, n (%)	7 (9)	1 (6)	--	6 (11)
FLT3-ITD, n (%)	6 (7)	--	1 (11)	5 (9)
FLT3-TKD, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
GATA2, n (%)	2 (2)	--	1 (11)	1 (2)
IDH1, n (%)	2 (2)	1 (6)	--	1 (2)
IDH2, n (%)	5 (6)	1 (6)	--	4 (7)
JAK2, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
KMT2A-PTD, n (%)	4 (5)	--	--	4 (7)
NPM1, n (%)	4 (5)	--	--	4 (7)
NRAS, n (%)	5 (6)	1 (6)	--	4 (7)
KRAS, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
PTPN11, n (%)	2 (2)	1 (6)	--	1 (2)
RAEB2, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
RUNX1, n (%)	8 (10)	2 (12)	1 (11)	5 (9)
SF3B1, n (%)	2 (2)	--	--	2 (4)
SRSF2, n (%)	6 (7)	2 (12)	--	4 (7)
TET2, n (%)	3 (4)	2 (12)	--	1 (2)
TP53, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
U2AF1, n (%)	3 (4)	--	2 (22)	1 (2)
WT1, n (%)	1 (1)	--	--	1 (2)
ZRSR2, n (%)	1 (1)	1 (6)	--	--

Die Diagnose entspricht dem Zeitpunkt der Initialdiagnose. Gene, die eine Variante aufwiesen wurden in der Tabelle nicht aufgeführt. Abkürzungen: n, Anzahl; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, Myelodysplastisches Syndrom; AML, Akute Myeloische Leukämie.
* insgesamt 18 Patienten

3.3 Laborchemische Parameter

Relevante laborchemische Parameter der insgesamt 28 Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose wurden aus PB analysiert. Die medianen Werte der Alaninaminotransferase (20 U/l), der alkalischen Phosphatase (71,5 U/l), der Harnsäure (5,7 mg/dl) sowie der Leukozyten (7,9 x10^9/l) lagen im Normbereich. Bei 78,6% (22/28) Patienten lagen die gemessenen Werte der Leukozyten allerdings außerhalb des Normbereichs (Abb. 6). Auch bei den Messwerten der Alaninaminotransferase, der alkalische Phosphatase und der Harnsäure gab es Patienten, deren Messwerte sich außerhalb des Normbereiches befanden, obwohl der Median jeweils innerhalb dieses Bereiches lag.

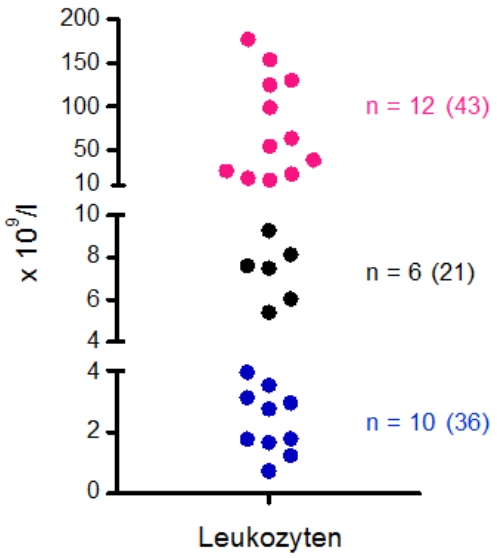

Abb. 6 Verteilung der Leukozytenwerte bei 28 Patienten mit AML, CMML sowie MDS
Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Die blauen Punkte repräsentieren Leukozytenmesswerte, die unterhalb des Normbereichs gemessen wurden (10/28). Schwarze Punkte zeigen Messwerte im Normbereich (6/28) und rosa Punkte kennzeichnen Messwerte oberhalb der Norm (12/28). Die Werte in den Klammern zeigen den jeweiligen prozentualen Anteil.

Die medianen Messwerte bei den Thromboyzten (43 x10^9/l), des Hämoglobins (9,1 g/dl), der Erythrozyten (3 x10^{12}/l) und des Hämatokrits (28%) lagen unterhalb der Norm. Dagegen war die Zahl an Monozyten (12%), der Laktat Dehydrogenase (330 U/l) sowie des C-reaktiven Proteins (CRP) (12,4 mg/l) im Median erhöht.

Bei den einzelnen Krankheitsentitäten gab es bei einigen Parametern wie der Alaninaminotransferase, dem Hämoglobin und den Erythrozyten kaum Unterschiede

in den medianen Werten. Die g-Glutamyltransferase im Plasma war im Median lediglich bei den CMML Patienten (49,5 U/l) erhöht. Bei der Laktat-Dehydrogenase war der mediane Wert der CMML und AML Patienten erhöht (298 bzw. 355 U/l), der Wert der MDS Patienten (195,5 U/l) lag im Referenzbereich. Der mediane Wert der Leukozyten lag bei den CMML Patienten (7,7 $x10^9$/l) im Referenzbereich, bei den MDS Patienten (3 $x10^9$/l) zu niedrig und bei den AML Patienten (20,9 $x10^9$/l) erhöht vor. Die Monozyten waren im Median bei den CMML und AML Patienten erhöht (14 bzw. 12%) und bei den MDS Patienten (8,6%) in der Norm. Die Thrombozyten waren bei allen drei Krankheitsentitäten zu niedrig (CMML 37/ MDS 119,5/ AML 40,5 $x10^9$/l) (Tab.13).

Tab. 13 Laborchemische Parameter von 28 Patienten mit AML, CMML und MDS

	Referenzwerte	Alle Patienten	CMML	MDS	AML
Alaninaminotransferase im Plasma, U/l	0- 35	20 (7- 87)	18,5 (18- 87)	25,5 (11- 43)	20,5 (7- 37)
Alkalische Phosphatase im Plasma, U/l	40- 130	71,5 (44- 311)	67 (60- 137)	68,5 (65- 84)	76 (44- 311)
C- reaktives Protein im Plasma, mg/l	0- 5	12,4 (2,9- 163)	17,2 (2,9- 148)	11,3 (11,2- 23,6)	15,5 (2,9- 163)*
Erythrozyten, $x10^{12}$/l	4,4-5,9	3 (1,72- 4,9)	2,9 (2,3- 4,3)	3,1 (2,7- 3,4)	3 (1,72- 4,9)
g-Glutamyltransferase im Plasma, U/l	0- 40	29,5 (17- 185)	49,5 (23- 115)	27,0 (22- 31)	30,5 (17- 185)
Hämatokrit, %	33,4- 46,2	28 (10- 290)	29,5 (22- 37)	24,5 (20- 31)	28 (10- 290)
Hämoglobin, g/dl	13,2-16,7	9,05 (5,8- 13,9)	8,9 (7- 12,6)	9 (8,1- 10,2)	9,4 (5,8- 13,9)
Harnsäure im Plasma, mg/dl	2,3 -6,1	5,7 (1,8- 13,1)	6,5 (3- 8,1)	4,6 (1,8- 6,6)	5,7 (2,9- 13,1)
Laktat- Dehydrogenase im Plasma, U/l	109- 250	330 (16- 2418)	298 (214- 995)	195,5 (16- 413)	355 (154- 2418)
Leukozyten, $x10^{9}$/l	4,2-10,2	7,9 (0,8- 177)	7,7 (4- 16,3)	3 (1,8- 7,6)	20,9 (0,8- 177)
Monozyten (morphologisch), %	5-11	12 (2- 58,2)	14 (10- 33)	8,6 (4- 22,5)	12 (2- 58,2)**
Thrombozyten, $x10^{9}$/l	145-348	43 (4- 324)	37 (28- 64)	119,5 (21- 134)	40,5 (4- 324)

Alle Werte entsprechen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose der Patienten. Abkürzungen: CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, Myelodysplastisches Syndrom; AML, Akute Myeloische Leukämie. *Informationen waren bei 27/28 Patienten verfügbar. **Informationen waren bei 25/28 Patienten verfügbar.

3.4 Effekt von Talazoparib und APE1 Inhibitor III in CD34$^+$ Patientenzellen

Zunächst wurde die durchschnittliche IC_{50} der gesunden Probanden nach dreitägiger Behandlung mit den Inhibitoren ermittelt. Diese lag bei Talazoparib bei 15,5 nM (+/- 2,2 nM) sowie 1041,1 nM (+/-149,0) bei APE1i. Anhand dieser Werte wurden später die Patienten in ‚Ansprecher' und ‚Nicht Ansprecher' unterteilt. ‚Ansprecher' wurden definiert als Patienten, deren IC_{50} niedriger als der Standardfehler des Mittelwertes der gesunden Probanden war. Bei Talazoparib wiesen 6 von insgesamt 28 Patientenproben eine durchschnittliche IC_{50} von 7,85 nM und damit einen signifikant niedrigeren Wert im Vergleich zu den gesunden Probanden auf. Sie wurden als ‚Ansprecher' eingeteilt. Die ‚Ansprecher' Rate bei Talazoparib entsprach somit 21%. Bei dem APE1i haben 8 von 26 Patientenproben, mit einer durchschnittlichen IC_{50} von 658,28 nM, eine signifikant niedrigere IC_{50} im Vergleich zu den gesunden Probanden. Die ‚Ansprecher' Rate bei APE1i lag damit bei 30%. Bei beiden Inhibitoren war die durchschnittliche IC_{50} der ‚Nicht Ansprecher' größer als in der gesunden Kontrollgruppe. Bei Talazoparib betrug diese 63 nM, bei dem APE1i 2058,72 nM (Abb.7).

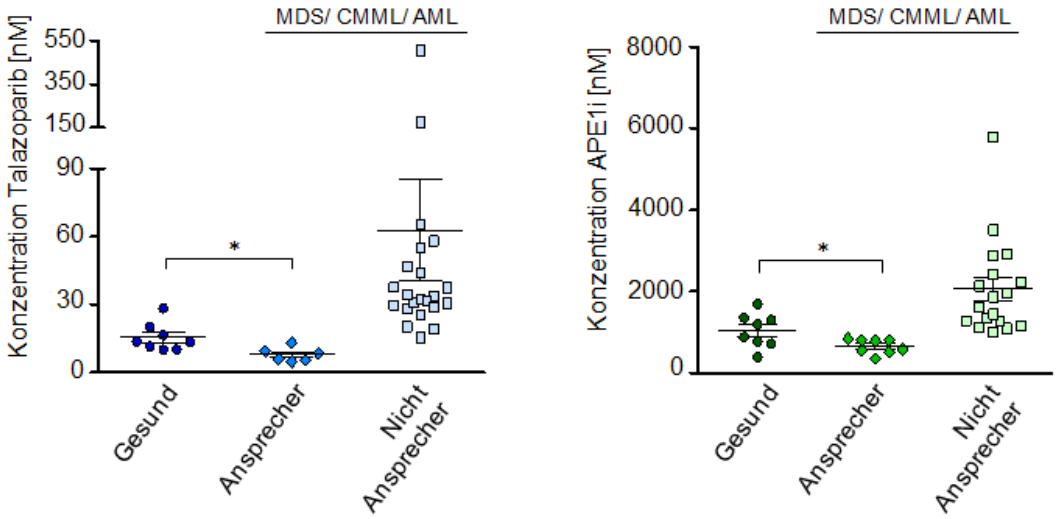

Abb. 7 Zytotoxischer Effekt von Talazoparib und APE1i
Die durchschnittliche IC_{50} nach 3 Tagen Inkubation von CD34$^+$ mit Talazoparib war in 6 Proben signifikant niedriger verglichen mit CD34$^+$ Zellen von 8 gesunden Probanden (links). Nach 3 tägiger Inkubation mit dem APE1i war die durchschnittliche IC_{50} bei 8 Proben signifikant niedriger im Vergleich zu den gesunden Proben (rechts). Abkürzungen: CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, Myelodysplastisches Syndrom; AML, Akute Myeloische Leukämie; APE1i, APE1 Inhibitor III.

Mit steigender Konzentration der Inhibitoren nahm die Vitalität der Zellen sowohl bei den ‚Ansprechern' als auch bei den ‚Nicht Ansprechern' ab. Der Anteil an vitalen Zellen sank bei den ‚Ansprechern' schneller als bei den ‚Nicht Ansprechern' (Abb.8).

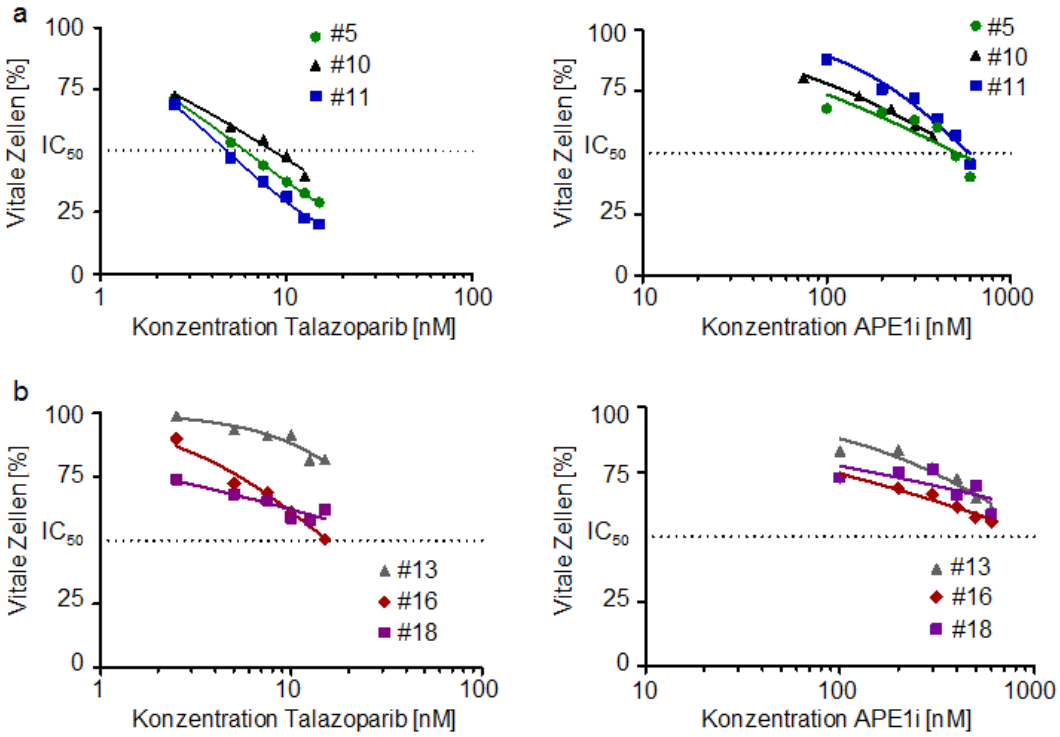

Abb. 8 Konzentrations-Wirkungskurve von Talazoparib und APE1i
Exemplarische Konzentrations-Wirkungskurven nach 3 tägiger Inkubation von $CD34^+$ Patientenzellen mit Talazoparib (links) und APE1i (rechts). (a) Bei den ‚Ansprechern' nahm der Anteil an vitalen Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration ab. (b) Die gezeigten Kurven gehören zu ‚Nicht Ansprechern' auf Talazoparib und APE1i. Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III; #, Patientennummer.

Insgesamt hatten 7 der ‚Ansprecher' auf APE1i eine AML und 1 Patient ein MDS-MLD (#5). Von den 7 AML Patienten wiesen 4 Patienten eine sAML auf (#9, #10, #27, #28) und 3 Patienten eine *de novo* AML (#11, #14, #20). Das durchschnittliche Alter der ‚Ansprecher' auf APE1i lag bei 73 Jahren (63-83). Fünf der Patienten waren männlich (#9, #10, #11, #14, #28) und 3 weiblich (#5, #20, #27).

Fünf der APE1i ‚Ansprecher', sprachen auch auf Talazoparib an (#5, #9, #10, #11, #27), zusätzlich konnte noch Patient #2 als Talazoparib ‚Ansprecher' eingeteilt werden. Somit gab es bei Talazoparib 4 Patienten mit einer AML, 1 Patient mit MDS und 1 Patient mit CMML, die als ‚Ansprecher' eingeteilt wurden. Das durchschnittliche Alter der Talazoparib ‚Ansprecher' lag ebenfalls bei 73 Jahren (63-

79) (Tab.14). Männliche und weibliche ‚Ansprecher' auf Talazoparib waren gleich verteilt (#9, #10, #11 männlich; #2, #5, #27 weiblich).

Tab. 14 Übersicht der IC_{50} Werte nach Talazoparib und APE1i Inkubation

#	Alter/Geschlecht	Erkrankung	Talazoparib IC_{50}[nM]	APE1i IC_{50} [nM]
Gesund 1	25/m	Gesund	20,2	1359
Gesund 2	24/w	Gesund	28,4	392
Gesund 3	78/w	Gesund	11,6	1195
Gesund 4	25/m	Gesund	10,0	881,9
Gesund 5	20/m	Gesund	13,5	724,4
Gesund 6	22/w	Gesund	10,3	1697
Gesund 7	21/w	Gesund	13,7	1305
Gesund 8	25/w	Gesund	16,6	774,5
1	77/m	CMML1	27,9	1095
2	73/w	CMML2	13,11	1286
3	84/m	CMML0	175,4	1008
4	65/m	CMML2	47,0	1954
5	73/w	MDS-MLD	6,0	509
6	68/m	MDS-MLD	25,5	1281
7	57/w	MDS	30,6	2921
8	59/m	MDS-EB-1	20,2	1357
9	79/m	sAML	5,4	350
10	63/m	sAML	8,4	563,5
11	76/m	*de novo* AML	4,8	593,2
12	63/w	*de novo* AML	65,4	2407
13	78/m	sAML	30,9	1148
14	83/m	*de novo* AML	29,7	792,5
15	72/m	sAML	43,8	1867
16	70/w	*de novo* AML	15,51	1122
17	53/w	*de novo* AML	32,5	5781
18	33/w	*de novo* AML	37,7	3511
19	66/m	*de novo* AML	34,26	2893
20	68/w	*de novo* AML	505,1	807,8
21	89/m	sAML	33,9	2131
22	47/m	*de novo* AML	54,8	Nicht erfasst
23	63/m	*de novo* AML	31,5	Nicht erfasst
24	69/m	sAML	19,43	1443
25	69/m	sAML	58,1	2226
26	59/w	*de novo* AML	29,05	1626
27	76/w	sAML	9,4	807,5
28	69/m	sAML	37,51	842,7

Abkürzungen: CMML, chronischen myelomonozytäre Leukämie; MDS, Myelodysplastisches Syndrom; MDS-MLD, MDS mit Mehrliniendysplasie; MDS-EB, MDS mit Blastenexzess; AML, Akute Myeloische Leukämie; #, Patientennummer.

3.5 Individuelle zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika

Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen dem Ansprechen der $CD34^+$ Zellen auf einen der Inhibitoren und spezifischen Gen-Mutationen beziehungsweise chromosomalen Aberrationen gibt, wurden vergleichende Analysen von Gen-Mutationen sowie von chromosomalen Aberrationen in allen MDS, CMML und AML Patientenproben durchgeführt. 22 von 28 Patienten wiesen einen normalen Karyotyp auf, lediglich 2 Patienten zeigten einen komplex aberranten Karyotyp. Die am häufigsten vorkommende chromosomale Veränderung war eine Trisomie 8 (4/28). Alle weiteren chromosomalen Aberrationen kamen jeweils in einem Patienten vor. Die zytogenetischen Analysen zeigten keine spezifischen Veränderungen, die eine Sensitivität auf Talazoparib oder APE1i der Patientenzellen erkennen lassen. Dennoch hatten alle ‚Ansprecher' auf Talazoparib einen normalen Karyotyp, bei APE1i wiesen 75% der ‚Ansprecher' einen normalen Karyotyp auf (#5, #9, #10, #11, #14, #27).

Durchschnittlich gab es drei Genmutationen in einem Patienten, zwei Patienten besaßen nur eine Mutation (#7, #20), mit sechs Mutationen besaß Patient #11 die meisten Mutationen. Die Genmutationsanalysen konnten zeigen, dass 50% der *KMT2A-PTD* und *NRAS* mutierten Patientenproben (#10, #11) sowie 67% der *U2AF1* (#5, #11) sensitiv auf Talazoparib und APE1i waren. Die Probe, die mit einer IC_{50} von 505 nM am wenigsten sensitiv auf Talazoparib reagiert hatte, war *TP53* mutiert und wies einen komplex aberranten Karyotyp auf (#20). Am wenigsten sensitiv, mit einem Wert von 5781 nM, auf APE1i war die Patientenprobe #17, die *DNMT3A-, FLT3-TKD-, IDH1-, NPM1-, NRAS*-mutiert war und einen normalen Karyotyp besaß (Abb. 9).

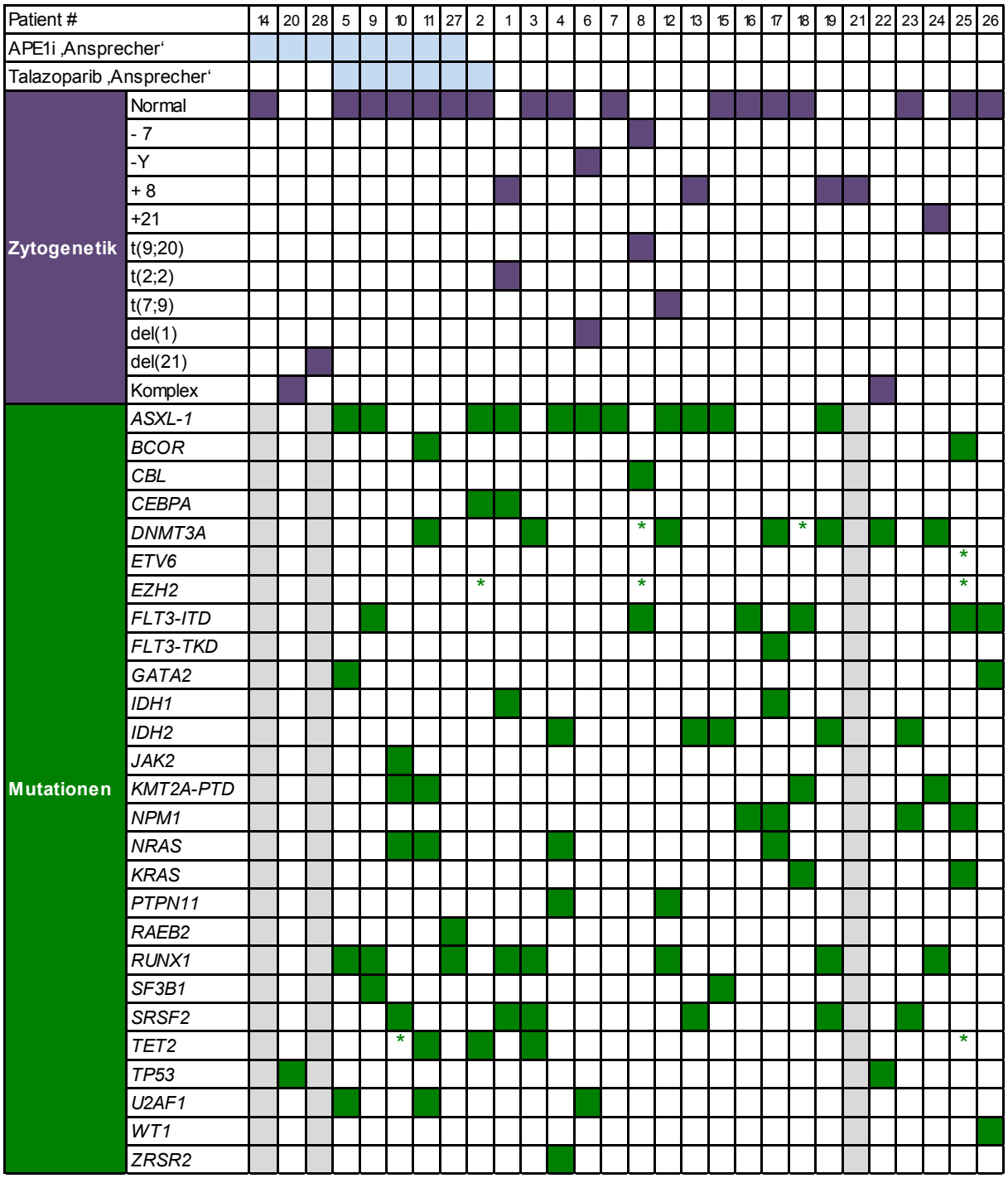

Abb. 9 Detaillierte zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika
Jede Spalte entspricht einem Patienten und beschreibt Erkrankung, Karyotyp und Mutationen. Die grünen Sterne stehen für eine Variante in dem Gen. Bei den grau hinterlegten Kästchen wurde keine Analyse durchgeführt. Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; MDS, Myelodysplastisches Syndrom; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie.

3.6 Proliferationsverhalten der Zellen

Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate der $CD34^+$ Zellen und einem Ansprechen auf die Inhibitoren gibt, wurde die Zellzahl in der unbehandelten Kontrolle täglich erfasst. Sowohl bei den ‚Ansprechern' als auch bei den ‚Nicht Ansprechern' konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Zellzahl an Tag 3 und einem Ansprechen auf die Inhibitoren festgestellt werden.

Die durchschnittliche Zellzahl der Talazoparib ‚Ansprecher' lag bei $1{,}2x10^5$, bei den ‚Nicht Ansprechern' war diese im Durchschnitt $1{,}1x10^5$. Die gesunde Kontrollgruppe lag mit einem Wert von $11{,}4x10^4$ zwischen diesen beiden Werten. Bei APE1i betrug die durchschnittliche Zellzahl bei den ‚Ansprechern' an Tag 3 $1{,}1x10^5$ Zellen und $1{,}1x10^5$ bei den ‚Nicht Ansprechern'. Die Patientenzellen mit der höchsten Zellzahl an Tag 3 waren in der Gruppe der ‚Nicht Ansprecher' zu finden (#1, #19). In dieser Gruppe waren ebenfalls einige Patienten, die an Tag 3 eine geringere oder ähnliche Zellzahl zeigten, wie zu Beginn des Versuchs (#15, #16, #21, #22, #23, #26). Bei den ‚Ansprechern' gab es lediglich einen Patienten, bei dem die Zellzahl mit $0{,}5x10^5$ Zellen an Tag 3 nur gering höher war als zu Versuchsbeginn (#28) (Abb. 10).

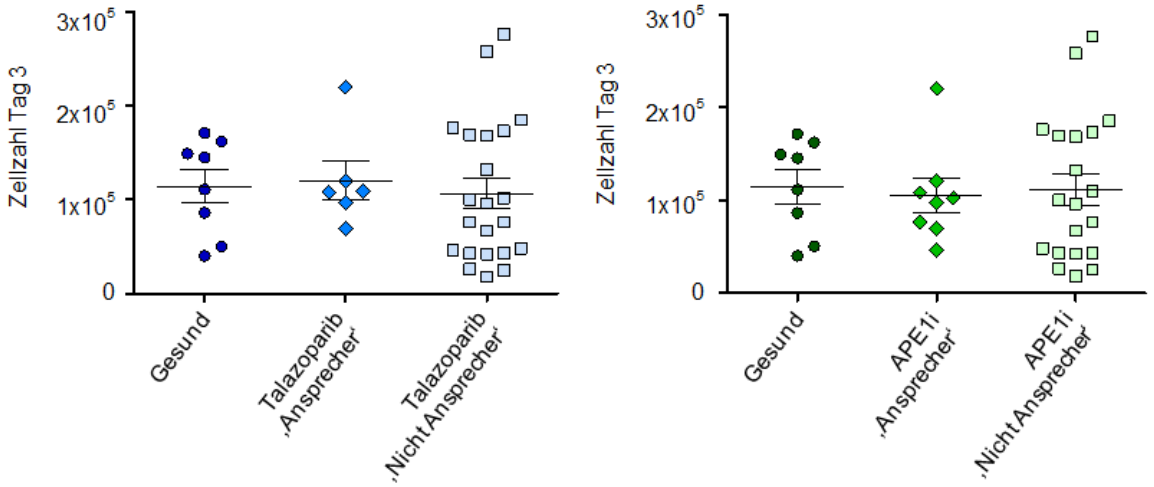

Abb. 10 Proliferationsverhalten unbehandelter Patientenzellen nach 3 Tagen
Das Proliferationsverhalten unbehandelter Patientenzellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Talazoparib ‚Ansprechern' und Talazoparib ‚Nicht Ansprechern' (links). Auch bei APE1i ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl an Tag 3. Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III.

3.7 Analyse von *PARP1* und *APE1* mRNA Expression in CD34$^+$ Patientenzellen

Die *PARP1* und *APE1* mRNA Expression der CD34$^+$ Patientenzellen könnte Aufschluss darüber geben, ob Patienten auf die jeweiligen Inhibitoren ansprechen. Zu diesem Zweck wurde die *PARP1* und *APE1* mRNA Expression in unbehandelten Zellen untersucht und mit dem Ansprechverhalten der Zellen verglichen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der relativen *PARP1* Expression zwischen den Talazoparib ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern', ebenso galt dies für die relative *APE1* Expression bei den APE1 ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern'. Der größte Unterschied in der *fold change* lag bei *PARP1* bei einem ‚Nicht Ansprecher' auf Talazoparib. Auch bei der APE1 Expression war der größte *fold change* bei einem ‚Nicht Ansprecher' auf APE1i (Abb. 11).

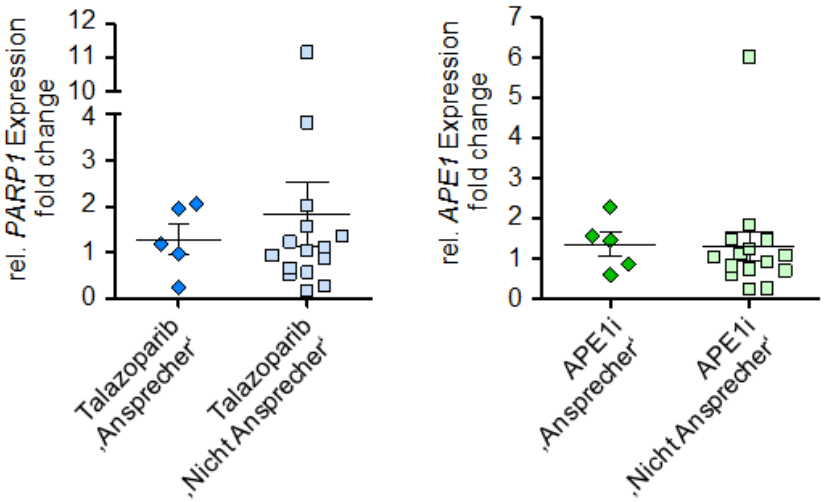

Abb. 11 Effekt von Talazoparib und APE1i in Relation zur *PARP1* und *APE1* mRNA Expression
PARP1 und *APE1* mRNA Expression von CD34$^+$ Patientenzellen bei ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' der entsprechenden Inhibitoren. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der relativen *PARP1* mRNA Expression bei Talazoparib ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' (links). Auch bei APE1i gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der relativen *APE1* mRNA Expression bei APE1i ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern'. Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III.

3.8 Analyse von γH2AX Foci in CD34$^+$ Patientenzellen

Sowohl Talazoparib, als auch der APE1i hemmen Proteine, die in der DNA Schadensreparatur eine Rolle spielen. Um zu sehen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an DNA-Schäden und der Wirksamkeit der Inhibitoren gibt, wurden γH2AX Foci analysiert. Hierbei wurden unbehandelte CD34$^+$ Patientenzellen ausgewertet. Die Menge an Foci bei den Talazoparib ‚Ansprechern' (4,4 Foci/Zelle) sowie bei den APE1i ‚Ansprechern' (3,8 Foci/Zelle) war im Median signifikant höher als in den gesunden Kontrollen (0,4 Foci/Zelle). Zwischen den ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' gab es keinen signifikanten Unterschied in der Menge an γH2AX Foci (Abb.12). Die medianen Werte lagen bei den Talazoparib ‚Nicht Ansprechern' bei 4,1 Foci je Zelle, und bei den APE1 ‚Nicht Ansprechern' bei 4,3 Foci je Zelle.

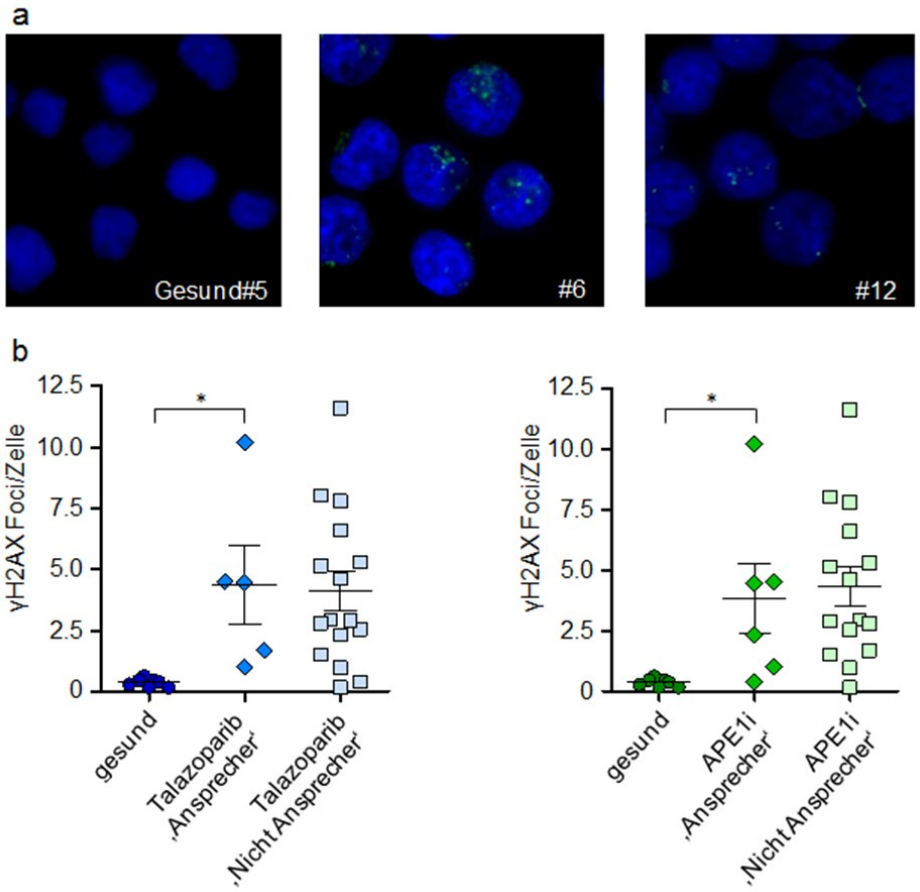

Abb. 12 Anzahl an γH2AX Foci in Abhängigkeit des Ansprechens
Exemplarische mikroskopische Aufnahmen von γH2AX Foci in einer gesunden Kontrolle, einem MDS und einem AML Patienten (a). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt, die γH2AX Foci sind als hellgrüne Punkte erkennbar. Die Anzahl an Foci bei den Talazoparib ‚Ansprechern', sowie APE1i ‚Ansprechern' war signifikant höher als in den gesunde Kontrollen. Zwischen den ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' gab es keinen signifikanten Unterschied (b). Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III; #, Patientennummer.

3.9 Laborchemische Parameter in Bezug auf das Ansprechverhalten der $CD34^+$ Patientenzellen

Um Parameter zu identifizieren, in denen sich Patienten unterscheiden, die auf die Inhibitoren angesprochen beziehungsweise nicht angesprochen haben, wurden die laborchemische Daten der Patienten gegenübergestellt (Tab.15). Die Daten wurden vor Therapiebeginn zum Zeitpunkt der Diagnose erhoben.

Sowohl bei den Talazoparib ‚Ansprechern' (824,5 U/l), als auch bei den APE1i Ansprechern (490 U/l) war der mediane Wert der Laktat-Dehydrogenase im Plasma signifikant höher als in den entsprechenden Proben der ‚Nicht Ansprecher' (303,5 U/L bei Talazoparib; 302 bei APE1i). Die medianen Werte lagen bei allen 4 Gruppen außerhalb des Normbereichs. Der Median der Leukozyten lag bei den APE1i ‚Nicht Ansprechern' mit 7,9 $x10^9$l innerhalb des Normbereiches. Der mediane Wert der Leukozyten bei den APE1i ‚Ansprechern' war mit 34,7 $x10^9$l erhöht. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Bei allen weiteren untersuchten Parametern gab es keine signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

Tab. 15 Laborchemische Parameter der ‚Ansprecher' und ‚Nicht Ansprecher' auf APE1i und Talazoparib

	Referenz-werte	‚Ansprecher' APE1i	‚Nicht Ansprecher' APE1i	p	‚Ansprecher Talazoparib'	‚Nicht Ansprecher' Talazoparib	p
Alaninaminotransferase im Plasma, U/l	0- 35	21 (12- 43)	20 (7- 87)	n. s.	21,5 (12- 43)	19,5 (7- 87)	n. s.
Alkalische Phosphatase im Plasma, U/l	40- 130	83 (65- 128)	66,5 (44- 311)	n. s.	79,5 (65- 137)	68,5 (44- 311)	n. s.
C- reaktives Protein im Plasma, mg/l	0- 5	18,6 (7,4- 163)*	12,2 (2,9- 152)	n. s.	72,1 (7,9- 163)*	11,7 (2,9- 152)	n. s.
Erythrozyten, $x10^{12}$/l	4,4- 5,9	3,42 (2,07- 4,9)	2,89 (1,7- 4,4)	n. s.	3,24 (2,56- 4,9)	2,9 (1,72- 4,4)	n. s.
g-Glutamyltransferase im Plasma, U/l	0- 40	28,5 (21- 133)	30,5 (17- 185)	n. s.	35,5 (21- 133)	29,5 (17- 185)	n. s.
Hämatokrit, %	33,4- 46,2	29,5 (10- 36)	27,5 (18- 290)	n. s.	29,5 (10- 31)	27,5 (17- 290)	n. s.
Hämoglobin, g/dl	13,2- 16,7	9,85 (6,1- 13,9)	8,8 (5,8- 12,6)	n. s.	9,6 (8,7- 13,9)	8,95 (5,8- 12,6)	n. s.
Harnsäure im Plasma, mg/dl	2,3- 6,1	5,3 (2,9- 13,1)	5,8 (1,8- 10,1)	n. s.	5,7 (2,9- 13,1)	5,7 (1,8- 10,1)	n. s.
Laktat-Dehydrogenase im Plasma, U/l	109- 250	490 (173- 2418)	302 (16- 1379)	0,042	824,5 (173- 2418)	303,5 (16- 1379)	0,003
Leukozyten, $x10^{9}$/l	4,2- 10,2	34,72 (0,75- 176,99)	7,88 (1,3- 124,8)	0,042	7,35 (0,75- 177)	7,9 (1,3- 153,7)	n. s.
Monozyten (morphologisch), %	5- 11	4 (2- 40)*	13,5 (4- 58,2)**	n. s.	4 (2- 40)*	12,5 (4- 58,2)**	n. s.
Thrombozyten, $x10^{9}$/l	145- 348	26,5 (4- 148)	77 (20- 324)	n. s.	27,5 (4- 119)	77 (7- 324)	n. s.

Alle Werte entsprechen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose der Patienten. Abkürzung: n.s., nicht signifikant.* Informationen waren bei 27/28 Patienten verfügbar. ** Informationen waren bei 25/28 Patienten verfügbar. Die Werte entsprechen dem Median, die Werte in den Klammern entsprechen der Spanne. Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III.

3.10 Effekt von Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1i sowie von Talazoparib± APE1i in CD34$^+$ Patientenzellen

Der zytotoxische Effekt von den Kombinationen Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1i sowie von Talazoparib± APE1i wurde in CD34$^+$ Patientenzellen untersucht. Der jeweils zweite Inhibitor wurde in geringen, subtoxischen Dosen zusätzlich mit dem anderen Inhibitor inkubiert. Bei Talazoparib als zweiter Inhibitor entsprach diese Konzentration 2,5 nM, bei APE1i 50 nM, diese Werte wurden anhand der vorher genannten Versuche festgelegt. Um zu vergleichen, welchen Effekt die Kombination der Inhibitoren mit Decitabin hat, wurde Decitabin zunächst ebenfalls als einzelne Substanz untersucht (Abb. 13). Die durchschnittliche IC_{50} der gesunden Probanden betrug 136,1 nM (+/- 24,0 nM). Wie auch bei Talazoparib und dem APE1i wurden ‚Ansprecher' definiert als Patientenzellen, bei denen die IC_{50} niedriger ist als der Standardfehler des Mittelwertes der gesunden Zellen. Von 25 untersuchten Proben konnten nach dieser Definition 7 Patienten als ‚Ansprecher' eingeteilt werden (#1, #5, #6, #16, #18, #19, #27), die mit einer durchschnittlichen IC_{50} von 60,4 nM einen signifikant niedrigeren Wert als die gesunde Kontrollgruppe aufwiesen. Die ‚Ansprecher' Rate entsprach somit 28%.

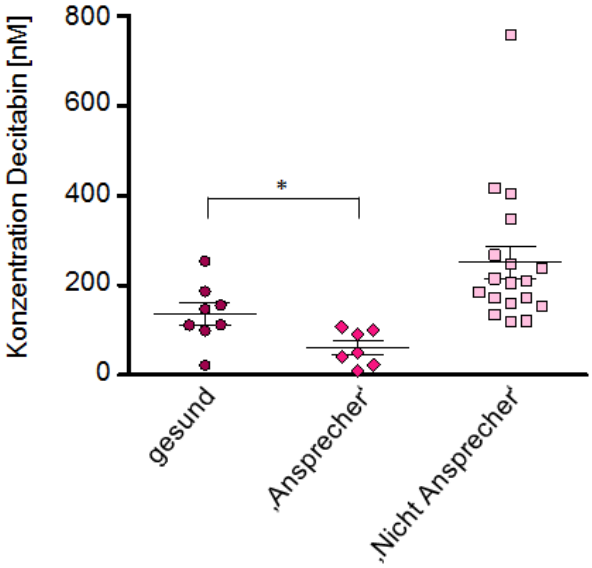

Abb. 13 Zytotoxischer Effekt von Decitabin
Die durchschnittliche IC_{50} nach 3 Tagen Inkubation von CD34$^+$ Zellen mit Decitabin war in 7 Proben signifikant niedriger, verglichen mit CD34$^+$ Zellen von 8 gesunden Probanden.

Insgesamt haben zwei Patienten auf alle 3 eingesetzten Inhibitoren angesprochen (#5, #27). In Kombination mit Talazoparib verringerte sich der Wert der IC_{50} bei 10 Patientenproben, sodass diese ebenfalls als ‚Ansprecher' auf Decitabin nach der 3 tägigen Inkubation mit beiden Inhibitoren eingeteilt werden konnten (#2, #3, #4, #7, #8, #9, #11, #12, #13, #24). Nach der Inkubation von Decitabin mit dem APE1i konnten anschließend 3 Patientenproben zusätzlich als ‚Ansprecher' eingeteilt werden (#3, #11, #13). Die Kombination aus APE1i und Talazoparib führte nicht dazu, dass weitere Proben als ‚Ansprecher' eingeteilt werden konnten. Die Kombination aus Decitabin und Talazoparib führte bei 3 Patientenproben zu einer höheren IC_{50}, als die alleinige Inkubation mit Decitabin (#16, #17, #21). Bei 5 Patientenproben wurde die IC_{50} durch die Kombination aus Decitabin mit Talazoparib verringert, die Patienten konnten aber nicht als ‚Ansprecher' eingeteilt werden (#14, #15, #23, #25, #28). Fünf Patientenproben, die mit Decitabin und APE1i inkubiert wurden, zeigten nach 3-tägiger Inkubation eine höhere IC_{50} als Decitabin allein (#14, #20, #21, #23, #28). Es gab 12 Patientenproben, bei denen sich die IC_{50} durch die eben genannte Kombination erniedrigte, die abschließend aber nicht als ‚Ansprecher' eingeteilt werden konnten (#2, #4, #7, #8, #9, #11, #12, #13, #15, #17, #24, #25). Bei den gesunden Kontrollproben verringerte die Kombination von Decitabin und Talazoparib bei allen 8 Proben die IC_{50}. Dies wurde ebenfalls bei APE1i, mit Ausnahme von #Gesund 6, beobachtet, hier blieb der Wert nahezu gleich. Auch bei der Kombination von Talazoparib mit dem APE1i wurde die IC_{50} bei allen Proben, im Vergleich zu Talazoparib alleine, verringert, zum Teil aber nur geringfügig (Tab. 16).

Tab. 16 Kombination von Decitabin± APE1i sowie von Talazoparib± APE1i in CD34$^+$ Patientenzellen

#	Decitabin IC_{50} [nM]	Dec+Tal IC_{50} [nM]	Dec+APE1i IC_{50} [nM]	Talazoparib IC_{50} [nM]	Tal+APE1i IC_{50} [nM]
Gesund 1	253,7	58,2	206,1	20,2	19,1
Gesund 3	156,2	52,2	128,4	11,6	10,3
Gesund 4	99,2	23,6	55,0	10,0	7,4
Gesund 5	112,5	14,3	101,6	13,5	7,9
Gesund 6	111,3	25,9	111,4	10,3	9,9
Gesund 7	147,2	35,1	122,6	13,7	11,7
Gesund 8	186,4	23,4	165,5	16,6	10,9
1	41,8	25,0	31,5	27,9	27,7
2	210,2	62,0	158,9	13,1	11,1
3	120,8	42,1	66,8	175,4	47,2
4	152,9	47,8	121,8	47	35,3
5	8,7	2,7	7,7	6	4,7
6	107,4	24,3	60,3	25,52	20,7
7	185,1	89,4	181,4	30,6	35,6
8	159,6	47,7	136,8	20,2	19,0
9	237,5	19,2	195,6	5,4	3,4
11	119,4	17,7	99,5	4,8	4,3
12	171,9	93,4	137,4	65,4	83,8
13	135,3	72,5	96,4	30,9	16,6
14	267,6	223,7	292,9	29,7	27,7
15	415,6	389,1	346,6	43,8	31,9
16	90,8	92,1	64,0	15,5	15,0
17	348,2	404,9	280,2	32,5	84,8
18	100,1	45,6	59,3	37,7	17,0
19	51,2	34,6	34,8	34,3	25,0
20	215,3	Nicht erfasst	231,3	505,1	Nicht erfasst
21	204,6	293,5	318,0	33,9	119,0
23	756,1	306,3	3077,0	31,5	39,5
24	172,3	87,8	135,8	19,4	21,3
25	248,2	145,1	181,2	58,1	31,7
27	22,8	7,2	18,0	9,4	6,9
28	403,4	293,2	593,3	37,51	Nicht erfasst

Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III; Dec, Decitabin; Tal, Talazoparib; #, Patientennummer.

Anhand exemplarisch ausgewählter Konzentrations-Wirkungskurven ließ sich erkennen, dass diese bei der Kombination der Inhibitoren niedriger verlief als mit einem Inhibitor alleine. Dies war sowohl bei Kombinationen zu erkennen, bei denen die IC_{50} sich durch die Kombination verringert hatte (Abb.14; A, C, D, E), als auch bei Ansätzen, bei denen die IC_{50} nach der Inkubation beider Inhibitoren zunahm (Abb.14; B, F).

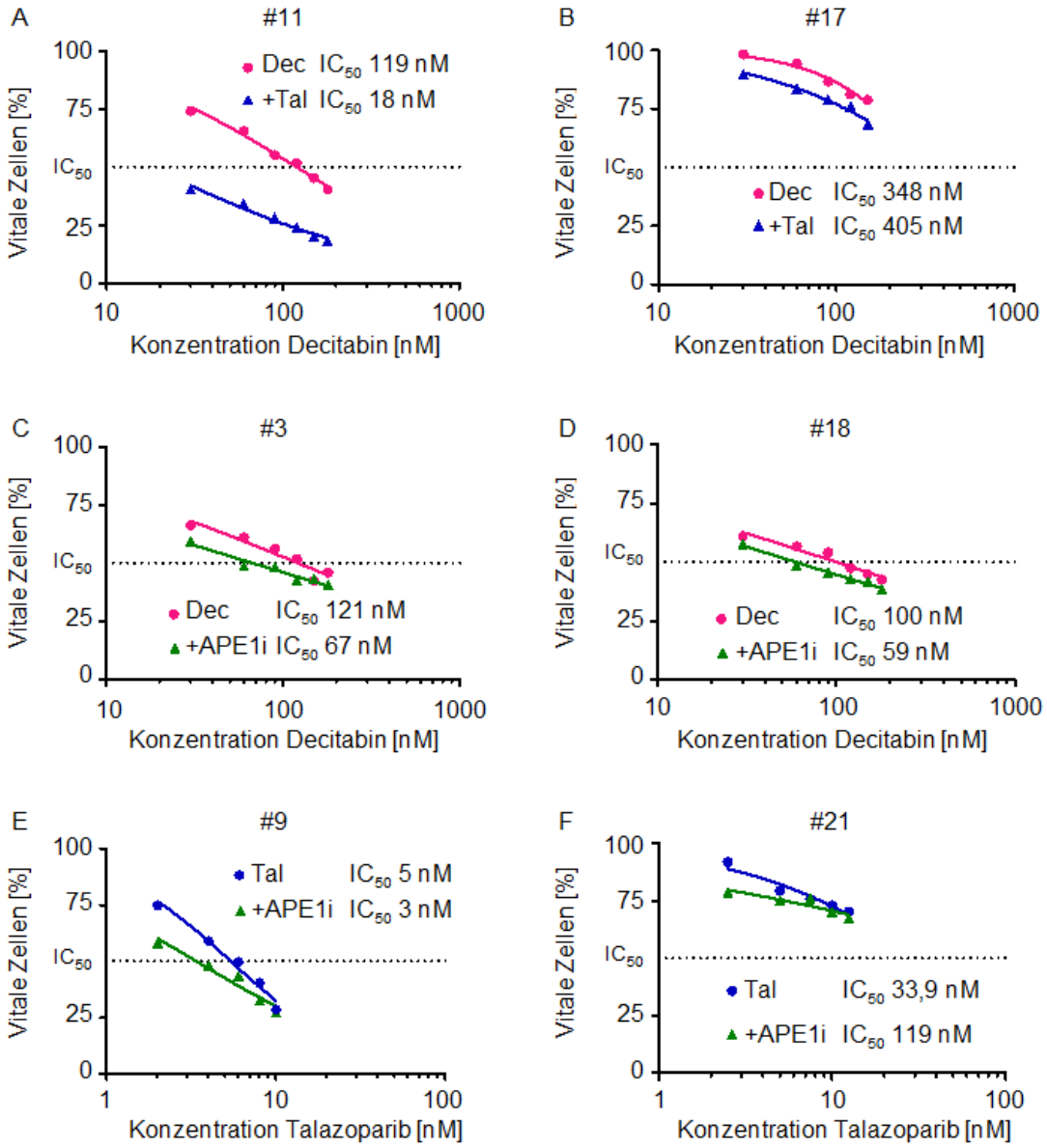

Abb. 14 Anteil vitaler CD34$^+$ Patientenzellen nach 3 tägiger Inkubation mit Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1i sowie Talazoparib± APE1i

Exemplarische Konzentrations-Wirkungskurve von CD34$^+$ AML und CMML Zellen, die mit Decitabin± Talazoparib behandelt wurden (A,B). Exemplarische Konzentrations- Wirkungskurve von CD34$^+$ AML Zellen, die mit Decitabin± APE1i behandelt wurden (C,D). Exemplarische Konzentrations-Wirkungskurve von CD34$^+$ AML Zellen, die mit Talazoparib± APE1i behandelt wurden (E,F). Abkürzungen: APE1i, APE1 Inhibitor III; Dec, Decitabin; Tal, Talazoparib; #, Patientennummer.

3.11 Klinischer Verlauf der Patienten

Im klinischen Verlauf wurden insgesamt 10 Patienten mit Decitabin behandelt (#2, #4, #9, #11, #14, #20, #21, #24, #25, #28). Patient #4, #21 und #24 erhielten neben Decitabin keine weitere Therapie. Bei Patient #2, #9 und #25 wurde nach Decitabin noch mindestens ein weiteres Medikament verabreicht. Alle weiteren Patienten erhielten Decitabin als letzte Therapie (#11, #14, #20, #28), wobei Patient #20 unter Decitabin ein Rezidiv entwickelte und anschließend Decitabin in Kombination mit Venetoclax erhielt. Bis auf Patient #20 verstarben alle der bereits genannten Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung.

Alle Patienten, die *in vivo* Decitabin erhielten, sprachen bei der *in vitro* Behandlung der $CD34^+$ Patientenzellen mit Decitabin nicht auf das Medikament an. Um zu analysieren, ob es einen Unterschied im klinischen Verlauf der *in vitro* ‚Ansprecher' und ‚Nicht Ansprecher' auf Decitabin gab, wurde eine Kaplan-Meier Überlebenskurve erstellt. Hierbei wurde Patient #27 von der Analyse ausgeschlossen, da dieser nach dem Zeitpunkt der Diagnose innerhalb einer Woche ohne erhaltene Therapie verstarb. Das mediane Überleben der ‚Nicht Ansprecher' lag bei 10,6 Monaten, das der ‚Ansprecher' bei 20,7 Monaten. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Abb.15).

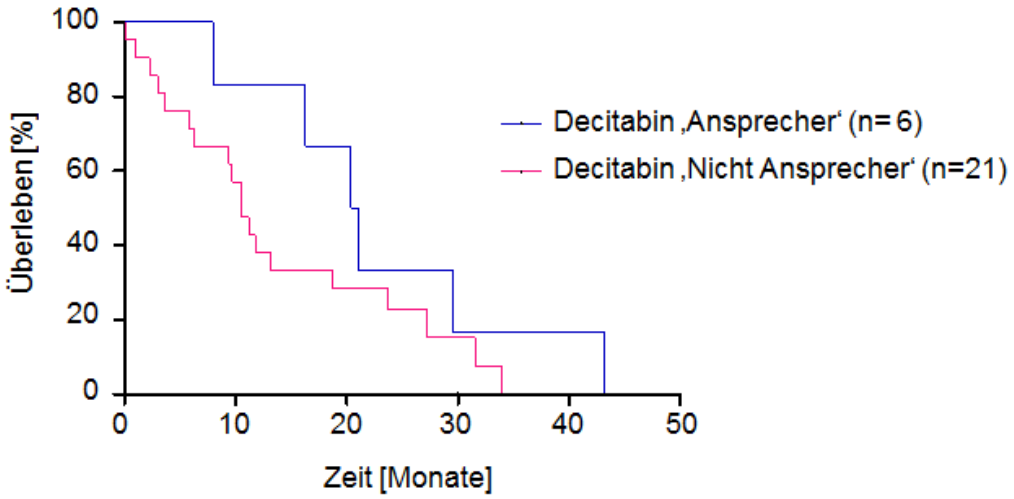

Abb. 15 Kaplan-Meier Überlebenskurve von 27 AML,CMML und MDS Patienten
Patienten, die in vitro auf Decitabin angesprochen haben, hatten keine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten, die nicht auf Decitabin angesprochen haben.

4. Diskussion

Aufgrund der geringen Überlebenswahrscheinlichkeit nach einem Therapieversagen bei Hochrisiko-MDS Patienten sowie AML-Patienten ist die Erforschung neuer Therapieoptionen erforderlich. Beim Einsatz von Zytostatika werden neben den hochproliferativen Tumorzellen ebenso gesunde Zellen, die sich physiologisch schnell teilen, beispielsweise die Immunzellen oder die Zellen der Haarwurzel geschädigt. Dadurch können zum Teil schwerwiegende Infekte oder aber auch ein Ausfallen der Haare auftreten.
Mit der Entwicklung einer neuen, innovativen Therapieoption, basierend auf synthetischer Letalität, könnten diese unerwünschten Nebeneffekte umgangen werden. Der Effekt der synthetischen Letalität induziert, im Gegensatz zu Zytostatika, eine selektive Tumortoxizität, und richtet sich damit vorwiegend gegen pathologisch veränderte Zellen. Da sowohl Talazoparib, als auch APE1i die Reparatur von SSB verhindern, können sich aus diesen DSB entwickeln, die in Zellen mit Defekten in der DSB-Reparatur den Zelltod auslösen. Ob dieses Verfahren auch bei MDS, AML und CMML Patienten therapeutisch genutzt werden kann, soll die vorliegende Arbeit klären. Die hier gewählte Patientenkohorte bestand aus n=28 Patienten, bei denen insgesamt n=82 Mutationen aus n=25 verschiedenen Genen nachgewiesen werden konnten.

Im Rahmen der ersten Fragestellung sollte untersucht werden, ob es möglich ist, $CD34^+$ Zellen aus AML, CMML und MDS Patienten durch synthetische Letalität zu schädigen. Hierbei wurden die Inhibitoren Talazoparib und der APE1i verwendet, welche beide in DNA-Reparaturmechanismen eingreifen.

Zunächst wurde die Frage geklärt, ob die beiden Inhibitoren die Vitalität einer MDS-L und einer SKM1 Zelllinie beeinflussen. Bei beiden Zelllinien konnte die Vitalität der Zellen mit steigender Konzentration der Inhibitoren herabgesetzt werden. Bei APE1i ist die IC_{50} mit einem Wert von 2460,5 nM bei MDS-L ungefähr 3-mal höher als bei SKM1 (804,5 nM). Bei Talazoparib sind die Werte der IC_{50} bei beiden Zelllinien ähnlich (MDS-L 463,1 nM; SKM1 553,7 nM). In einer Studie von Gaymes et al.

konnte gezeigt werden, dass die AML Zelllinie Mutz-3 und die MDS Zelllinie P39 sensitiv gegenüber dem PARP Inhibitor KU-0058948 reagieren. Allerdings gab es auch leukämische Zelllinien in der Studie, die nicht sensitiv gegenüber diesem PARP Inhibitor waren (Gaymes et al. 2009). Weitere Forschungsprojekte, die den Einfluss von Talazoparib auf SKM1 oder MDS-L Zellen untersuchen, sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. Eine weitere Studie konnte eine Wirksamkeit verschiedener APE1 Inhibitoren durch synthetische Letalität an unterschiedlichen Krebszelllinien zeigen (Sultana et al. 2012). Die unterschiedliche Wirksamkeit beider Inhibitoren könnte einerseits auf das individuelle Mutationsprofil der verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sein, andererseits könnte auch eine spezifische zytotoxische Wirkung der Inhibitoren selbst für die Apoptose der Zellen unter verschiedenen Dosen verantwortlich sein.

Um die Frage zu beantworten, ob die Inhibitoren einen letalen Effekt auf CMML, MDS und AML Zellen haben, wurde ein Patientenkollektiv von 28 Patienten untersucht. Von 26 der Patienten wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Bei den 18 untersuchten AML Patienten gab es insgesamt 56 Mutationen in 22 Genen. Die meisten Mutationen waren in dem Gen *DNMT3A* (6/56) zu finden, gefolgt von Mutationen in den Genen *ASXL1*, *FLT3-ITD* und *RUNX1* mit jeweils 5 von insgesamt 56 Mutationen. Vergleichbare Ergebnisse lieferte eine Studie mit 1540 AML Patienten, bei der die häufigsten Mutationen in *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, *NPM1* und *NRAS* auftraten (Papaemmanuil et al. 2016). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass rund 40% der AML Patienten einen normalen Karyotyp besaßen (Grimwade et al. 2010). Bei den Patienten dieses Projekts wiesen 60% der AML Patienten einen normalen Karyotyp auf.
Bei Patienten mit CMML gehören zu den am häufigsten vorkommenden molekulargenetischen Veränderungen *TET2, SRSF2, ASXL1* und *RUNX1* Mutationen. Chromosomale Aberrationen weißen zwischen 10 bis 40% der CMML Patienten auf (Itzykson et al. 2018). Bei den CMML Patienten (n=4) in diesem Projekt war die am häufigsten vorkommende Mutation in dem Gen *ASXL1* (3/17), danach folgten *RUNX1, SRSF2, TET2* und *CEBPA* Mutationen mit jeweils 2 von insgesamt 17 Mutationen. Ein Patient (25%) besaß einen aberranten Karyotyp, alle weiteren einen normalen. Dies entspricht den Beobachtungen von Itzykson.

Bei den MDS Patienten (n=4) in diesem Projekt gab es insgesamt 9 Mutationen. Mit 3 Mutationen in *ASXL1* war dieses Gen am häufigsten mutiert. Zwei der Patienten (50%) hatten einen aberranten Karyotyp, die andere Hälfte hatte einen normalen Karyotyp. Zu den am häufigsten mutierten Genen gehören bei MDS *ASXL1, TP53, DNMT3A, TET2, RUNX1* und *SF3B1* (Lindsley et al. 2017). Rund 50% der MDS Patienten haben einen aberranten Karyotyp (Haase et al. 2007). Somit entspricht das Mutations- und zytogenetische Profil der 4 Patienten in dieser Arbeit den Daten, die von Lindsley und Haase beschrieben wurden.

Neben dem molekulargenetischen Profil wurden ebenfalls die laborchemischen Parameter der Patienten erhoben, um im Verlauf des Projektes zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen diesen und dem Ansprechverhalten der $CD34^+$ Patientenzellen auf die Inhibitoren gibt. Bei allen 3 Krankheitsentitäten war der CRP Wert des Patientenkollektives im Median erhöht. Die Erythrozytenwerte sowie die Thrombozytenwerte waren im Median bei allen drei Krankheitsentitäten verringert. Bei den MDS Patienten lagen zudem die Leukozytenwerte und die Monozyten im Median unterhalb des Referenzbereiches. Diese Zytopenien des peripheren Blutes sind charakteristisch für MDS. Ein Kriterium zur Diagnosestellung bei CMML sind Monozytosen mit einem Monozytenanteil ≥10%, dies war mit einem medianen Wert von 14 % bei den CMML Patienten in diesem Projekt der Fall. Bei allen 3 Krankheitsentitäten waren sowohl der Hb-Wert, als auch der Hämatokrit unterhalb des Normbereiches. Liegt der Hb-Wert unterhalb des Referenzbereiches, spricht man von einer Anämie. Diese sind häufig im Blutbild von Patienten mit hämatologischen Neoplasien zu finden. Bei den AML Patienten lag der mediane Wert der Leukozyten mit 20,9 $x10^9$/l oberhalb des Normbereiches. Es gab allerdings auch Patienten bei denen dieser Wert deutlich unterhalb des Normbereiches lag. Die Leukozytenzahl kann bei einer AML erhöht oder verringert sein (Al Dahouk und Karges 2014). Aufgrund des erhöhten Zellumsatzes erklären sich die erhöhten Werte der Harnsäure sowie der Laktat-Dehydrogenase. Diese waren ebenfalls nur bei den Patienten mit AML erhöht.

Talazoparib hat in den *in vitro* Versuchen an den $CD34^+$ Patientenzellen als Einzelreagenz die Viabilität einiger Proben im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant verringert und damit einen antileukämischen Effekt gezeigt. Diese

Beobachtungen konnten durch weitere, bereits durchgeführte Studien bestätigt werden, die ebenfalls einen antileukämischen Effekt von Olaparib und Talazoparib detektieren (Esposito et al. 2015; Faraoni et al. 2015; Gaymes et al. 2009). Auch der APE1i war bei einigen der $CD34^+$ Patientenproben in der Lage, die Vitalität der Zellen *in vitro* zu verringern. Die ‚Ansprecher' Rate war mit einem Wert von 30% bei APE1i höher als die ‚Ansprecher' Rate von 21% bei Talazoparib.

Marker, welche einen zytotoxischen Effekt von Talazoparib und APE1i in MDS, CMML und AML Zellen prognostizieren, sind weitestgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen verschiedenen möglichen Markern wie der a) Zellproliferation, der b) *PARP1* und *APE1* mRNA Expression, der Menge an c) γH2AX Foci, d) chromosomalen Aberrationen, e) Genmutationen und f) laborchemische Parameter und einem Ansprechen der Patientenzellen auf die Inhibitoren gibt.

Da DSB Zellen nur in sich teilenden Zellen letztendlich zur Apoptose führen, wurde das Proliferationsverhalten der Patientenzellen untersucht. Nach 3 tägigem Zellwachstum gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der gesunden Probanden, sowie den Talazoparib beziehungsweise APE1 ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern'.

Wir konnten kürzlich zeigen, dass gesunde Kontrollen im Median 0,2 γH2AX Foci je Zelle aufweisen, MDS Patienten haben mit 2,8 γH2AX Foci je Zelle einen höheren Wert und AML Patienten besitzen mit 5,5 γH2AX Foci je Zelle eine noch größere Anzahl an Foci (Popp et al. 2017). Die gesunden Probanden in dieser Arbeit wiesen vergleichbare Werte mit einem medianen Wert von 0,36 Foci je Zelle auf, die Werte der ‚Ansprecher' lagen mit 3,8 und 4,4 Foci je Zelle in dem zuvor genannten Bereich von MDS und AML Patienten. Allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den medianen Werten der ‚Ansprecher' sowie der ‚Nicht Ansprecher'.

Als Hypothese sollte untersucht werden, ob die *PARP1* Expression beziehungsweise *APE1* Expression in den Zellen mit einem Ansprechen auf die Inhibitoren korreliert. In einer ovarialen Krebszelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von *PARP1* positiv mit einem Ansprechen auf die Inhibitoren Olaparib und Talazoparib korrelierte (Sander Effron et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Talazoparib beziehungsweise APE1i ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' festgestellt werden. Somit gab es bei dem Proliferationsverhalten der Zellen, der *PARP1* und *APE1* mRNA Expression und der

Menge an γH2AX keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem zytotoxischen Effekt der Inhibitoren und dem Überleben der Patientenzellen.

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden keine spezifischen chromosomalen Aberrationen mit einer prognostischen Bedeutung detektiert. Allerdings hatten 100% der Talazoparib sowie 75% der APE1i ‚Ansprecher' einen normalen Karyotyp. Das molekulargenetische Profil der Patienten war sehr heterogen. Dennoch gab es Mutationen in Genen, die nur bei den ‚Nicht Ansprechern' auftraten wie: *IDH1* (2), *IDH2* (5), *PTPN11* (2), *KRAS* (2), *NPM1* (4); Mutationen die insgesamt nur einmal auftraten, wurden in der Aufzählung nicht berücksichtigt. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte in einem MDS und AML Maus Model gezeigt werden, dass der PARP Inhibitor Olaparib wirksam bei *IDH1* und *IDH2* Mutationen ist (Gbyli et al. 2019). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *NPM1* die APE1 Aktivität in der BER stimuliert. Zelllinien, denen *NPM1* fehlte, reagierten im Vergleich zu Kontrollen sensitiver auf verschieden DNA schädigende Substanzen, die durch die BER repariert werden (Vascotto et al. 2014). Patienten mit einer *NPM1* Mutation in dieser Arbeit sprachen nicht sensitiver auf den APE1i, im Vergleich zu den Kontrollen an. Möglicherweise kann NPM1 durch die Mutation nicht mehr mit APE1 interagieren, sodass auch keine Sensitivität gegenüber APE1i entsteht. In ovarialen Zelllinien waren Zellen mit einer *KRAS* Mutation resistent gegenüber Talazoparib (Sun et al. 2017). Auch im Rahmen dieses Projektes haben $CD34^+$ Patientenzellen mit einer *KRAS* Mutation nicht auf Talazoparib angesprochen. Somit waren beide Inhibitoren zwar bei einigen Patienten wirksam, es konnte allerdings keine prognostische Mutation identifiziert werden. Es ist zu vermuten, dass andere Mechanismen zusätzlich zur synthetischen Letalität eine wichtige Rolle spielen wie zum Beispiel das PARP trapping bei Talazoparib.

In Bezug auf die laborchemischen Parameter gab es zwischen den APE1i beziehungsweise Talazoparib ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern' kaum signifikante Unterschiede. Bei APE1i als auch bei Talazoparib war aber der mediane Wert der Laktat-Dehydrogenase im Median bei den ‚Ansprechern' (APE1i 490 U/l; Talazoparib 824,5 U/l) signifikant höher als bei den ‚Nicht Ansprechern' (APE1i 302 U/L; Talazoparib 303,5 U/l). Somit sind alle medianen Werte der Laktat-Dehydrogenase erhöht. Die Laktat-Dehydrogenase ist ein Enzym, das die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat in der Glykolyse katalysiert. In einer Studie haben Zellen der ovarialen Krebszelllinie A2780 sensitiv auf den PARP Inhibitor Rucaparib

reagiert, zusätzlich hat dieser die Umsetzung der Laktat-Dehydrogenase von Pyruvat zu Laktat unterdrückt. Es wurde vermutet, dass die Effekte von Rucaparib unter anderem auf der Unterdrückung des Laktat-Dehydrogenase vermittelten Stoffwechselkreislaufs beruhen (Nonomiya et al. 2019). Möglicherweise hat auch Talazoparib einen Einfluss auf die Laktat-Dehydrogenase, sodass bei einem höheren Wert des Enzyms ein größerer Effekt von Talazoparib erreicht werden könnte. Um dies zu überprüfen, könnte man unter anderem die metabolischen Veränderungen der Zellen nach Talazoparibgabe untersuchen. Des Weiteren könnte in einem größeren Patientenkollektiv analysiert werden, ob eine deutlich erhöhte Laktat-Dehydrogenase als Marker für ein Ansprechen der Zellen auf die Inhibitoren Talazoparib und APE1i gesehen werden kann. Mit einem Wert von 37,7 $x10^9$/l bei den APE1i ‚Ansprechern' ist der mediane Wert der Leukozyten signifikant höher als bei den APE1i ‚Nicht Ansprechern' (7,9 $x10^9$/l). Allerdings gab es bei den APE1i Ansprechern auch Patienten, deren Leukozyten- Werte deutlich zu niedrig waren (0,8 $x10^9$/l), sodass die Menge an Leukozyten vermutlich nicht als Marker herangezogen werden kann, der einen zytotoxischen Effekt des APE1i prognostiziert.

Bei zwei Patientenproben waren die Werte der IC_{50} bei den Talazoparib ‚Nicht Ansprechern' deutlich höher als bei anderen Patientenproben der gleichen Gruppe (#3, #20). Resistenz gegenüber PARP Inhibitoren ist ein klinisches Problem. Verschiedene Arten von PARP Inhibitor Resistenzmechanismen wurden bereits beschrieben und können in 4 Gruppen unterteilt werden (Noordermeer und van Attikum 2019):

I) ein erhöhten Medikamenten-Efflux, zum Beispiel durch eine Hochregulation der ABC Transporter

II) vermindertes PARP1 trapping an die DNA

III) die Wiederaufnahme der homologen Rekombination

IV) die Stabilisierung blockierter Replikationsgabeln

Weitere Arbeiten sind nötig um zu klären, welche Rolle diese Resistenzmechanismen in MDS, CMML und AML spielen könnten. Auch bei den APE1i ‚Nicht Ansprechern' gab es zwei Patientenproben deren IC_{50} Werte deutlich höher waren als alle weiteren Werte der gleichen Gruppe (#17, #18). Zum aktuellen Zeitpunkt sind in der Literatur keine Daten zu Resistenzen bei dem APE1i vorhanden.

Momentan werden mehrere klinische Studien durchgeführt, die den Effekt von Talazoparib alleine, sowie in Kombination mit Decitabin bei AML und MDS untersuchen (Studienidentifikationsnummern: NCT01399840, Pfizer; NCT02878785, University of Maryland, Baltimore; NCT03974217, Dana-Farber Cancer Institute). In dieser Arbeit wurden ebenfalls der Effekt von Decitabin in Kombination mit Talazoparib, Decitabin mit APE1i sowie Talazoparib mit APE1i untersucht. Der zweite Inhibitor wurde jeweils in einer geringen subletalen Konzentration eingesetzt. Von 25 untersuchten Patienten, die *in vitro* mit Decitabin behandelt wurden, konnten bei alleiniger Decitabingabe insgesamt 7 als ‚Ansprecher' definiert werden. Durch die Kombination mit Talazoparib konnten 10 weitere Patientenproben als ‚Ansprecher' eingeteilt werden. Ein synergistischer Effekt zwischen Talazoparib und einem DNTMi konnte in einer anderen Studie ebenfalls an AML Zelllinien, und an primären Zellen gezeigt werden (Muvarak et al. 2016). Hierbei wurde vermutet, dieser Effekt könne durch die Bildung von PARP1-DNTM1-DNA Komplexen verursacht worden sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PARP nicht kovalente Bindungen mit DNMT1 eingeht (Reale et al. 2005). Durch die Kombination aus Talazoparib und einem DNMTi wurde PARP bei der Studie von Muvarak et al. stärker an die DNA gebunden, als bei der alleinigen Gabe von Talazoparib. Dadurch erhöhte sich der zytotoxische Effekt der beiden Inhibitoren. Bei der Kombination von Decitabin mit dem APE1i konnten durch die Kombination 3 weitere Patientenproben als ‚Ansprecher' definiert werden. Es wird vermutet, dass die BER in die Reparatur von Decitabin induzierten DNA Schäden involviert ist (Orta et al. 2014). Der APE1i könnte synergistisch mit Decitabin die BER unterbinden, sodass sich DNA-Schäden in der Zelle akkumulieren. Des Weiteren könnte der APE1i synergistisch mit Talazoparib interagieren, indem eine letale Vernetzung von PARP1 an eine AP Stelle induziert wird (Prasad et al. 2014). Bei der Kombination von Talazoparib mit dem APE1 hatten sich zwar einige Werte der IC_{50} verringert, allerdings nicht so stark, dass diese als ‚Ansprecher' eingeteilt werden konnten. Die Kombination von Talazoparib und Decitabin könnte für Patienten, die Resistenzen gegenüber Decitabin entwickeln, interessant sein.

Um zu untersuchen, ob es bei den Patienten, die bei der *in vitro* Behandlung mit Decitabin als ‚Ansprecher' beziehungsweise ‚Nicht Ansprecher' eingeteilt wurden

einen Unterschied im klinischen Verlauf gibt, wurde eine Kaplan-Meier Überlebenskurve erstellt. Hierbei war das Überleben der ‚Ansprecher' mit 20,7 Monaten fast doppelt so hoch wie das der ‚Nicht Ansprecher'. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, deutet aber auf einen Unterschied hin.

Neben dem Ansprechen *in vitro* ist es von klinischer Relevanz, ob die Inhibitoren auch *in vivo* Wirkung zeigen. Insgesamt 10 Patienten in dieser Arbeit erhielten während ihrer Therapie Decitabin. 9 von 10 Patienten verstarben (bis auf #20) im Verlauf ihrer Erkrankung. Patient #20 entwickelte unter Decitabin ein Rezidiv und wird aktuell mit Decitabin und Venetoclax behandelt. Auch bei den *in vitro* Versuchen haben alle 10 Patienten nicht auf Decitabin angesprochen. Wenn diese Beobachtungen in einem größeren Patientenkollektiv bestätigen werden könnten, ergäbe sich die Möglichkeit, vor einer Behandlung *in vivo* zu untersuchen, ob die Zellen *in vitro* auf das Medikament ansprechen beziehungsweise nicht ansprechen.

5. Zusammenfassung

Die Prognose bei Hochrisiko-MDS und AML Patienten ist ungünstig, was die Erforschung neuer Therapien notwendig macht. Ein Ansatz beruht auf der Inhibition wichtiger Enzyme in der DNA-Schadensreparatur. Zwei dieser Enzyme sind APE1 und PARP. In vorangegangen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass PARP Inhibitoren besonders effektiv bei Tumoren mit Defekten in BRCA1/2 wirken. Dieser Effekt wird als synthetische Letalität bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der APE1 Inhibitor III und der PARP-Inhibitor Talazoparib bei CMML, MDS und AML Patientenzellen eine antileukämische Wirkung zeigen. Es wurden insgesamt 28 Patientenproben untersucht, von denen 6 auf Talazoparib (21%) und 8 auf den APE1 Inhibitor III (30%) angesprochen haben. Ziel war es zu überprüfen, ob es Marker gibt, die ein Ansprechen auf die Inhibitoren prognostizieren können. Bei möglichen Markern, wie dem Proliferationsverhalten der Zellen, der Menge an γH2AX Foci und de*r APE1* beziehungsweise *PARP* Expression gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen ‚Ansprechern' und ‚Nicht Ansprechern'. Auch spezifische chromosomale Aberrationen mit einem prognosefähigen Einfluss wurden nicht detektiert. Das molekulargenetische Profil der Patienten war heterogen und Mutationen, die ausschließlich in der Gruppe der ‚Ansprechern' auftraten, wurden nicht detektiert. Es konnten aber Mutationen in Genen bei den ‚Nicht Ansprechern' detektiert werden: *IDH1* (2), *IDH2* (5), *PTPN11* (2), *KRAS* (2), *NPM1* (4). Bei den Laborparametern war die Laktat-Dehydrogenase sowohl bei den APE1 Inhibitor III ‚Ansprechern' als auch bei den Talazoparib ‚Ansprechern' signifikant erhöht.

Zusätzlich wurden noch Kombinationsversuche mit Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1 Inhibitor III sowie Talazoparib± APE1 Inhibitor III durchgeführt. Hierbei war besonders die Kombination von Decitabin mit Talazoparib hervorzuheben, bei der durch die Kombination beider Inhibitoren die Zahl der ‚Ansprecher' von 7 (28%) mit Decitabin alleine auf 17 (60%) ‚Ansprecher' erhöht wurde. Dies könnte bei der Therapie Decitabin-resistenter Patienten ein interessanter Ansatz sein.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Patienten, die im klinischen Verlauf resistent gegenüber Decitabin waren, auch *in vitro* nicht auf das Medikament ansprachen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der APE1 Inhibitor III als auch Talazoparib einen anti-leukämischen Effekt aufweisen. Beide Inhibitoren können in Kombination mit Decitabin dessen Wirkung verstärken. Die hier gewonnen Erkenntnisse liefern Daten für mögliche zukünftige klinische Studien.

6. Literaturverzeichnis

Al Dahouk, Sascha; Karges, Wolfram (2014): Hämatologie. Wolfram Karges und Sascha al Dahouk (Hg.): Innere Medizin … in 5 Tagen. 3., überarb. Aufl. Berl *Springer* (Springer-Lehrbuch), 293–342.

Amé, Jean-Christophe; Spenlehauer, Catherine; Murcia, Gilbert de (2004): The PARP superfamily. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26 (8), 882–893.

Arber, Daniel A.; Orazi, Attilio; Hasserjian, Robert; Thiele, Jürgen; Borowitz, Michael J.; Le Beau, Michelle M. et al. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127 (20), 2391–2405.

Betz, Bryan L.; Hess, Jay L. (2010): Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Archives of pathology & laboratory medicine* 134 (10), 1427–1433.

Bloomfield, Clara Derber; Estey, Elihu; Pleyer, Lisa; Schuh, Andre C.; Stein, Eytan M.; Tallman, Martin S.; Wei, Andrew (2018): Time to repeal and replace response criteria for acute myeloid leukemia? *Blood reviews* 32 (5), 416–425.

Brandsma, Inger; Gent, Dik C. (2012): Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome integrity* 3 (1), 9.

Brown, Anna L.; Churpek, Jane E.; Malcovati, Luca; Döhner, Hartmut; Godley, Lucy A. (2017): Recognition of familial myeloid neoplasia in adults. *Seminars in hematology* 54 (2), 60–68.

Bu, Yiwen; Cao, Deliang (2012): The origin of cancer stem cells. *Frontiers in bioscience* (Scholar edition) 4, 819–830.

Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), 495–506.

Craig, Jeffrey W.; Hasserjian, Robert P.; Kim, Annette S.; Aster, Jon C.; Pinkus, Geraldine S.; Hornick, Jason L. et al. (2020): Detection of the KITD816V mutation in myelodysplastic and/or myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes predicts concurrent systemic mastocytosis. *Modern pathology*, Inc 33 (6), 1135–1145.

Dinmohamed, Avinash G.; van Norden, Yvette; Visser, Otto; Posthuma, Eduardus F. M.; Huijgens, Peter C.; Sonneveld, Pieter et al. (2015): The use of medical claims to assess incidence, diagnostic procedures and initial treatment of

myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia in the Netherlands. *Leukemia research* 39 (2), 177–182.

Döhner, Hartmut; Estey, Elihu; Grimwade, David; Amadori, Sergio; Appelbaum, Frederick R.; Büchner, Thomas et al. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129 (4), 424–447.

Esposito, Maria Teresa; Zhao, Lu; Fung, Tsz Kan; Rane, Jayant K.; Wilson, Amanda; Martin, Nadine et al. (2015): Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nature medicine* 21 (12), 1481–1490.

Estey, Elihu; Döhner, Hartmut (2006): Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* 368 (9550), 1894–1907.

Evers, Bastiaan; Helleday, Thomas; Jonkers, Jos (2010): Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends in pharmacological sciences* 31 (8), 372–380.

Faraoni, Isabella; Compagnone, Mirco; Lavorgna, Serena; Angelini, Daniela Francesca; Cencioni, Maria Teresa; Piras, Eleonora et al. (2015): BRCA1, PARP1 and γH2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochimica et biophysica acta* 1852 (3), 462–472.

Gaymes, Terry J.; Shall, Sydney; MacPherson, Lee J.; Twine, Natalie A.; Lea, Nicholas C.; Farzaneh, Farzin; Mufti, Ghulam J. (2009): Inhibitors of poly ADP-ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. 1 *94* (5), 638–646.

Gbyli, Rana; Song, Yuanbin; Liu, Wei; Gao, Yimeng; Chandhok, Namrata S.; Fu, Xiaoying et al. (2019): PARP Inhibitors Are Effective in IDH1/2 Mutant MDS and AML Resistant to Targeted IDH Inhibitors. *Blood* 134 (Supplement_1), 4222.

Germing, Ulrich; Kobbe, Guido; Haas, Rainer; Gattermann, Norbert (2013): Myelodysplastic Syndromes. *Deutsches Aerzteblatt Online*.

Gibson, Bryan A.; Kraus, W. Lee (2012): New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (7), 411–424.

Greenberg, Peter L.; Tuechler, Heinz; Schanz, Julie; Sanz, Guillermo; Garcia-Manero, Guillermo; Solé, Francesc et al. (2012): Revised international

prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120 (12), 2454–2465.

Grimwade, David; Hills, Robert K.; Moorman, Anthony V.; Walker, Helen; Chatters, Stephen; Goldstone, Anthony H. et al. (2010): Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116 (3), 354–365.

Haas, Simon; Trumpp, Andreas; Milsom, Michael D. (2018): Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell stem cell* 22 (5), 627–638.

Haase, Detlef; Germing, Ulrich; Schanz, Julie; Pfeilstöcker, Michael; Nösslinger, Thomas; Hildebrandt, Barbara et al. (2007): New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110 (13), 4385–4395.

Haase, Detlef; Stevenson, Kristen E.; Neuberg, Donna; Maciejewski, Jaroslaw P.; Nazha, Aziz; Sekeres, Mikkael A. et al. (2019): TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* 33 (7), 1747–1758.

Helleday, Thomas (2011): The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Molecular oncology* 5 (4), 387–393.

Hinz, John M.; Czaja, Wioletta (2015): Facilitation of base excision repair by chromatin remodeling. *DNA repair* 36, 91–97.

Hoeijmakers, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835), 366–374.

International Agency for Research on Cancer (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Unter Mitarbeit von Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy L. Harris, Elaine Sarkin Jaffe, Stefano Pileri, Harald Stein und Jürgen Thiele. Revised 4th edition. Lyon: *International Agency for Research on Cancer* (World Health Organization Classification of Tumours).

ISCN 2016. Simons, A.,Schmid, M. (2016). An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (Basel: Krager).

Itzykson, Raphael; Fenaux, Pierre; Bowen, David; Cross, Nicholas C. P.; Cortes, Jorge; Witte, Theo de et al. (2018): Diagnosis and Treatment of Chronic Myelomonocytic Leukemias in Adults: Recommendations From the European

Hematology Association and the European LeukemiaNet. *HemaSphere* 2 (6), e150.

Juliusson, Gunnar; Antunovic, Petar; Derolf, Asa; Lehmann, Sören; Möllgård, Lars; Stockelberg, Dick et al. (2009): Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 113 (18), 4179–4187.

Kantarjian, Hagop M.; Thomas, Xavier G.; Dmoszynska, Anna; Wierzbowska, Agnieszka; Mazur, Grzegorz; Mayer, Jiri et al. (2012): Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (21), 2670–2677.

Lieber, Michael R. (2010): NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nature structural & molecular biology* 17 (4), 393–395.

Lindsley, R. Coleman; Saber, Wael; Mar, Brenton G.; Redd, Robert; Wang, Tao; Haagenson, Michael D. et al. (2017): Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *The New England journal of medicine* 376 (6), 536–547.

Löwenberg, B.; Downing, J. R.; Burnett, A. (1999): Acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 341 (14), 1051–1062.

Malcovati, Luca; Hellström-Lindberg, Eva; Bowen, David; Adès, Lionel; Cermak, Jaroslav; Del Cañizo, Consuelo et al. (2013): Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 122 (17), 2943–2964.

Muvarak, Nidal E.; Chowdhury, Khadiza; Xia, Limin; Robert, Carine; Choi, Eun Yong; Cai, Yi et al. (2016): Enhancing the Cytotoxic Effects of PARP Inhibitors with DNA Demethylating Agents - A Potential Therapy for Cancer. *Cancer Cell* 30 (4), 637–650.

Nonomiya, Yuma; Noguchi, Kohji; Katayama, Kazuhiro; Sugimoto, Yoshikazu (2019): Novel pharmacological effects of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib on the lactate dehydrogenase pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 510 (4), 501–507.

Noordermeer, Sylvie M.; van Attikum, Haico (2019): PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. *Trends in cell biology* 29 (10), 820–834.

Ogawa, Seishi (2019): Genetics of MDS. *Blood* 133 (10), 1049–1059.

Oran, Betul; Weisdorf, Daniel J. (2012): Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. *Haematologica* 97 (12), 1916–1924.

Orta, Manuel Luis; Höglund, Andreas; Calderón-Montaño, José Manuel; Domínguez, Inmaculada; Burgos-Morón, Estefanía; Visnes, Torkild et al. (2014): The PARP inhibitor Olaparib disrupts base excision repair of 5-aza-2'-deoxycytidine lesions. *Nucleic Acids Res* 42 (14), 9108–9120.

Papaemmanuil, Elli; Gerstung, Moritz; Bullinger, Lars; Gaidzik, Verena I.; Paschka, Peter; Roberts, Nicola D. et al. (2016): Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 374 (23), 2209–2221.

Patel, Jay P.; Gönen, Mithat; Figueroa, Maria E.; Fernandez, Hugo; Sun, Zhuoxin; Racevskis, Janis et al. (2012): Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 366 (12), 1079–1089.

Popp, Henning D.; Naumann, Nicole; Brendel, Susanne; Henzler, Thomas; Weiss, Christel; Hofmann, Wolf-Karsten; Fabarius, Alice (2017): Increase of DNA damage and alteration of the DNA damage response in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leukemia research* 57, 112–118.

Prasad, Rajendra; Horton, Julie K.; Chastain, Paul D.; Gassman, Natalie R.; Freudenthal, Bret D.; Hou, Esther W.; Wilson, Samuel H. (2014): Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic Acids Res* 42 (10), 6337–6351.

Prébet, Thomas; Gore, Steven D.; Esterni, Benjamin; Gardin, Claude; Itzykson, Raphael; Thepot, Sylvain et al. (2011): Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (24), 3322–3327.

Reale, Anna; Matteis, Giovanna de; Galleazzi, Giada; Zampieri, Michele; Caiafa, Paola (2005): Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24 (1), 13–19.

Röllig, Christoph; Bornhäuser, Martin; Thiede, Christian; Taube, Franziska; Kramer, Michael; Mohr, Brigitte et al. (2011): Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (20), 2758–2765.

Rouleau, Michèle; Patel, Anand; Hendzel, Michael J.; Kaufmann, Scott H.; Poirier, Guy G. (2010): PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews. Cancer* 10 (4), 293–301.

Sander Effron, Samuel; Makvandi, Mehran; Lin, Lilie; Xu, Kuiying; Li, Shihong; Lee, Hsiaoju et al. (2017): PARP-1 Expression Quantified by 18FFluorThanatrace: A Biomarker of Response to PARP Inhibition Adjuvant to Radiation Therapy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 32 (1), 9–15.

Schlenk, Richard F. (2014): Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 99 (11), 1663–1670.

Schlenk, Richard F.; Döhner, Hartmut (2013): Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology. American Society of Hematology.* Education Program 2013, 324–330.

Schlenk, Richard F.; Müller-Tidow, Carsten; Benner, Axel; Kieser, Meinhard (2017): Relapsed/refractory acute myeloid leukemia: any progress? *Current opinion in oncology* 29 (6), 467–473.

Sedelnikova, Olga A.; Rogakou, Emmy P.; Panyutin, Igor G.; Bonner, William M. (2002): Quantitative Detection of 125 IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with γ-H2AX Antibody. *Radiation Research* 158 (4), 486–492.

Shen, Yuqiao; Aoyagi-Scharber, Mika; Wang, Bing (2015): Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 353 (3), 446–457.

Stauder, Reinhard; Valent, Peter; Theurl, Igor (2018): Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood* 131 (5), 505–514.

Stone, Richard M.; Mandrekar, Sumithra J.; Sanford, Ben L.; Laumann, Kristina; Geyer, Susan; Bloomfield, Clara D. et al. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England journal of medicine* 377 (5), 454–464.

Such, Esperanza; Germing, Ulrich; Malcovati, Luca; Cervera, José; Kuendgen, Andrea; Della Porta, Matteo G. et al. (2013): Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 121 (15), 3005–3015.

Sultana, Rebeka; McNeill, Daniel R.; Abbotts, Rachel; Mohammed, Mohammed Z.; Zdzienicka, Malgorzata Z.; Qutob, Haitham et al. (2012): Synthetic lethal targeting of DNA double-strand break repair deficient cells by human apurinic/apyrimidinic endonuclease inhibitors. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 131 (10), 2433–2444.

Sun, Chaoyang; Fang, Yong; Yin, Jun; Chen, Jian; Ju, Zhenlin; Zhang, Dong et al. (2017): Rational combination therapy with PARP and MEK inhibitors capitalizes on therapeutic liabilities in RAS mutant cancers. *Science translational medicine* 9 (392).

Tyner, Jeffrey W.; Tognon, Cristina E.; Bottomly, Daniel; Wilmot, Beth; Kurtz, Stephen E.; Savage, Samantha L. et al. (2018): Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* 562 (7728), 526–531.

Vascotto, C.; Lirussi, L.; Poletto, M.; Tiribelli, M.; Damiani, D.; Fabbro, D. et al. (2014): Functional regulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 by nucleophosm impact on tumor biology. *Oncogene* 33 (22), 2876–2887.

Vos, Mike de; Schreiber, Valérie; Dantzer, Françoise (2012): The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochemical pharmacology* 84 (2), 137–146.

Weissman, Irving L. (2000): Stem Cells. *Cell* 100 (1), 157–168.

Yao, Yixin; Dai, Wei (2014): Genomic Instability and Cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis* 5. 1-3

Eigene Publikationen:

Kohl, Vanessa; Flach, Johanna; Naumann, Nicole; Brendel, Susanne; Kleiner, Helga; Weiss, Christel et al. (2019): Antileukemic Efficacy in Vitro of Talazoparib and APE1 Inhibitor III Combined with Decitabine in Myeloid Malignancies. *Cancers* 11 (10) 1493.

Luu, Maik; Pautz, Sabine; **Kohl, Vanessa**; Singh, Rajeev; Romero, Rossana; Lucas, Sébastien et al. (2019): The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nature communications* 10 (1), 760.

Popp, Henning D.; **Kohl, Vanessa**; Naumann, Nicole; Flach, Johanna; Brendel, Susanne; Kleiner, Helga et al. (2020): DNA Damage and DNA Damage Response in Chronic Myeloid Leukemia. *International journal of molecular sciences* 21 (4) 1177.

Kohl, Vanessa; Drews, Oliver; Costina, Victor; Bierbaum, Miriam; Jawhar, Ahmed; Roehl, Henning; Weiss, Christel; Brendel, Susanne; Kleiner, Helga; Flach, Johanna; Spiess, Birgit; Seifarth, Wolfgang; Nowak, Daniel; Hofmann, Wolf-Karsten; Fabarius, Alice; Popp, Henning D. Irradiated mesenchymal stromal cells induce genetic instability in human CD34+ cells. (eingereicht bei Science Signaling).

Kohl, Vanessa; Fabarius, Alice; Drews, Oliver ; Bierbaum, Miriam ; Jawhar, Ahmed; Darwich, Ali ; Weiss, Christel ; Flach, Johanna ; Brendel, Susanne ; Kleiner, Helga ; Seifarth, Wolfgang ; Hofmann, Wolf-Karsten ; Popp, Henning D. Genotoxic bystander signals from irradiated human mesenchymal stromal cells mainly localize in the 10 – 100 kDa fraction of conditioned medium. (eingereicht bei Cells).

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Normaler männlicher Karyotyp 3
Abb. 2 Strukturelle Chromosomenaberrationen 4
Abb. 3 Schematische Darstellung der Basen Exzisionsreparatur 18
Abb. 4 Schema: Struktur und Funktion von PARP1 20
Abb. 5 Überlebenskurve MDS-L und SKM1 bei APE1 Inhibition..... 37
Abb. 6 Verteilung der Leukozytenwerte bei 28 Patienten mit AML, CMML sowie MDS 41
Abb. 7 Zytotoxischer Effekt von Talazoparib und APE1i 44
Abb. 8 Konzentrations-Wirkungskurve von Talazoparib und APE1i..... 45
Abb. 9 Detaillierte zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika 48
Abb. 10 Proliferationsverhalten unbehandelter Patientenzellen nach 3 Tagen 49
Abb. 11 Effekt von Talazoparib und APE1i in Relation zur PARP1 und APE1 mRNA Expression 50
Abb. 12 Anzahl an γH2AX Foci in Abhängigkeit des Ansprechens..... 51
Abb. 13 Zytotoxischer Effekt von Decitabin..... 54
Abb. 14 Anteil vitaler $CD34^+$ Patientenzellen nach 3 tägiger Inkubation mit Decitabin± Talazoparib, Decitabin± APE1i sowie Talazoparib± APE1i..... 57
Abb. 15 Kaplan-Meier Überlebenskurve von 27 AML,CMML und MDS Patienten 58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Häufige Punktmutationen in myeloischen Neoplasien..... 5
Tab. 2 WHO Klassifikation der AML 7
Tab. 3 Prognostische Einteilung der AML nach ELN..... 9
Tab. 4 WHO Klassifikation des MDS 11
Tab. 5 Prognostische Einteilung des MDS nach IPSS-R 13
Tab. 6 WHO Klassifikation der CMML 15
Tab. 7 Prognostische Faktoren bei CMML nach dem CPSS molekular 16

Tab. 8 Eingesetzte Konzentrationen der Inhibitoren bei $CD34^+$ Zellen..... 29
Tab. 9 Eingesetzte Konzentrationen der Inhibitoren bei MDS-L und SKM1 30
Tab. 10 Konzentration und Programm der QuantiFast® SYBR® Green PCR 32
Tab. 11 Durchschnittswerte der IC_{50} bei MDS-L und SKM1 38
Tab. 12 Patientencharakteristika von 28 Patienten mit AML, MDS und CMML..... 40
Tab. 13 Laborchemische Parameter von 28 Patienten mit AML, CMML und MDS..... 43
Tab. 14 Übersicht der IC_{50} Werte nach Talazoparib und APE1i Inkubation 46
Tab. 15 Laborchemische Parameter der ‚Ansprecher' und ‚Nicht Ansprecher' auf APE1i und Talazoparib 53
Tab. 16 Kombination von Decitabin± APE1i sowie von Talazoparib± APE1i in $CD34^+$ Patientenzellen..... 56

8. Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname:	Kohl, Vanessa
Geburtsdatum:	20.11.1992
Geburtsort:	Heidelberg
Familienstand:	ledig
Vater:	Günter Kohl, Maschinenbauingenieur
Mutter:	Petra Kohl, Versicherungskauffrau

Schulischer Werdegang

09/2003- 05/2012	Lessing- Gymnasium Lampertheim mit Allgemeiner Hochschulreife
25.05.2012	Abitur

Universitärer Werdegang

10.2012- 09.2015	Biologie, Justus Liebig- Universität, Gießen Thesis: „Neuronale Regeneration bei der Stabheuschrecke *S. sipylus*“
02.09.2015	Bachelor of Science
10.2015- 03.2018	Molecular and Cellular Biology, Philipps-Universität, Marburg
04.2017-03.2018	Titel Masterarbeit: “The impact of short-chain fatty acids on regulatory B cells”
28.03.2018	Master of Science; Note:1,3

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei unserem Klinikdirektor Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann bedanken, dass ich meine Arbeit im Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik in Mannheim durchführen konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Alice Fabarius und Dr. med. Henning Popp für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und ihre hervorragende Betreuung bedanken. Danke für die Unterstützung und die für mich aufgebrachte Zeit.

Außerdem danke ich Susanne Brendel und Helga Kleiner für ihre Hilfe im Labor. Ein großer Dank geht an Dr. Nicole Naumann für jegliche Hilfe und die schöne Zeit, die wir zusammen im Büro verbracht haben. Ein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter des Labors.

Zudem danke ich auch meinem Freund und meiner Familie, die stets zu meiner Seite standen. Vielen Dank für die jahrelange moralische Unterstützung, sowie für den Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen konnte.