

**Der BCL-2 Inhibitor ABT-199/Venetoclax  
transaktiviert NOXA und wirkt mit Proteasom-  
Inhibition bei der Zelltod-Induktion synergistisch**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
M.Sc. Sandra Katharina Weller  
aus Stuttgart

Tübingen  
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	04.04.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. Doron Rapaport
2. Berichterstatter/-in:	PD Dr. Frank Essmann

# I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	III
II Abbildungsverzeichnis.....	VIII
III Tabellenverzeichnis.....	XI
IV Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract.....	3
3. Einleitung.....	5
3.1 Maligne Tumorerkrankungen.....	5
3.2 Sarkome.....	6
3.2.1 Subtypen und Auftreten.....	6
3.2.2 Therapieansätze bei Sarkomen.....	7
3.3 Tumorsuppressorgen <i>TP53</i> .....	8
3.4 Apoptose.....	9
3.4.1 Extrinsischer Apoptose-Signalweg.....	10
3.4.2 Caspasen.....	10
3.4.3 Intrinsischer Apoptose-Signalweg.....	10
3.4.4 BCL-2-Proteinfamilie.....	12
3.4.4.1 Das BH3- <i>only</i> Protein NOXA ( <i>PMAIP1</i> ).....	15
3.4.5 Die integrierte Stress-Antwort (ISR).....	17
3.5 Neue Generation der Krebs-Therapie.....	20
3.5.1 BH3-Mimetika in der Krebstherapie.....	21
3.5.2 Proteasom-Inhibition in der Krebstherapie.....	22
4. Zielsetzung.....	25
5. Material und Methoden.....	26
5.1 Bakterienkultur.....	26
5.1.1 Kultivierung von Bakterien.....	26
5.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	26

5.2	Molekularbiologische Methoden .....	27
5.2.1	Midi-Präparation von Plasmid-DNA .....	27
5.2.2	DNA/RNA Konzentrationsbestimmung .....	27
5.2.3	DNA Sequenzierung.....	27
5.3	Zellkultur .....	28
5.3.1	Verwendete Zelllinien .....	28
5.3.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	29
5.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	31
5.3.4	Kryokonservierung .....	31
5.3.5	Auftauen eukaryotischer Zellen .....	31
5.3.6	Transfektion von Plasmid-DNA .....	31
5.4	Virologische Methoden.....	32
5.4.1	Produktion von Lentiviren.....	32
5.4.2	Bestimmung des Virus-Titers .....	34
5.4.3	Transduktion der Zielzellen zur Generierung klonaler Knock-Out-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-Technologie.....	35
5.5	Reagenzien.....	35
5.5.1	A-1155463/BCL-xL-Inhibitor.....	36
5.5.2	A-1210477/MCL-1-Inihibitor .....	36
5.5.3	ABT-199/Venetoclax .....	36
5.5.4	Actinomycin-D.....	36
5.5.5	Bortezomib/Velcade .....	37
5.5.6	Carfilzomib .....	37
5.5.7	Cycloheximid.....	37
5.5.8	ISRIB (Integrated Stress Response Inhibitor).....	37
5.5.9	Ixazomib.....	37
5.5.10	Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketon.....	38
5.5.11	Glutathion (GSH).....	38
5.5.12	N-Acetylcysteinamid.....	38
5.6	Durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis von Zelltod.....	38

5.7	Lumineszenz-Assays .....	39
5.7.1	Nachweis der Caspase-Aktivität mittels Caspase-Glo 3/7 Assay.....	39
5.7.2	Aktivitätsbestimmung proteasomaler Untereinheiten mittels Proteasome-Glo-Assays	40
5.8	Zelltod-Analyse im <i>Cytation 1 Imaging Reader</i> .....	41
5.9	Proteinanalytik.....	43
5.9.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	43
5.9.2	SDS-PAGE .....	44
5.9.3	Western Blot .....	46
5.10	RNA-Interferenz .....	49
5.11	RNA-Analysen.....	51
5.11.1	RNA-Isolation .....	51
5.11.2	cDNA-Synthese.....	51
5.11.3	Analyse der Genexpression mittels TaqMan-basiertem Assay .....	52
5.12	Metabolomics / Massenspektrometrische Analyse .....	53
5.12.1	Extraktion intrazellulärer Metabolite.....	54
5.12.2	Analyse der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen.....	54
5.13	Anreicherung von Mitochondrien.....	54
5.14	Statistik .....	56
6.	Ergebnisse .....	57
6.1	ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion in Sarkoma-Zelllinien .....	57
6.2	Das Effektorprotein BAX als Vermittler der ABT-199&BTZ-induzierten synergistischen Apoptose .....	60
6.3	ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion in SW982/WT .....	68
6.4	Der NOXA- <i>Knock-Down</i> reduziert die ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion ...	73
6.5	BAX und NOXA sind wichtige Schlüsselmoleküle in der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion.....	75
6.6	Unterschiedliche Spezifitäten der PIs beeinflussen die ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion .....	76
6.7	Partielle TP53-abhängige Induktion von NOXA .....	79

6.8	Größtenteils TP53-unabhängige Induktion von NOXA.....	89
6.9	Potentielle Mechanismen der <i>PMAIP1</i> /NOXA-Induktion.....	91
6.10	ABT-199 induziert die Integrierte Stress-Antwort (ISR).....	94
6.11	Mitochondrialer Import.....	97
6.12	Expression von BCL-2-Proteinen als prädiktive Marker des ABT-199&PI-vermittelten Zelltods.....	100
7.	Diskussion.....	104
7.1	Neue Therapieansätze in der Krebsforschung durch die Entwicklung niedermolekularer BCL-2-Inhibitoren/BH3-Mimetika .....	104
7.2	Proteasom-Blockierung als Alternative zur MCL-1-Inhibition .....	105
7.3	ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion mit Erfordernis von BAX und NOXA. 106	
7.3.1	ABT-199&PI-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion .....	109
7.4	<i>TP53</i> -abhängige und <i>TP53</i> -unabhängige NOXA-Induktion .....	112
7.5	Mögliche Mechanismen der <i>PMAIP1</i> /NOXA-Induktion .....	115
7.5.1	ABT-199-vermittelte Transaktivierung von NOXA.....	115
7.5.2	Die Rolle von ATF3&ATF4 in der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion 119	
7.5.3	ROS-Produktion als möglicher Induktor der ISR.....	119
7.5.4	ABT-199 induziert mitochondrial metabolisches <i>Reprogramming</i> .....	120
7.5.5	Mitochondrialer Import.....	122
7.1	Identifizierung prognostischer Marker für Therapieansprechen .....	124
8.	Fazit und Ausblick .....	126
9.	Literatur.....	129
10.	Erklärungen zum Eigenanteil .....	149
11.	Veröffentlichungen.....	150
11.1	Abstracts .....	150
12.	Danksagung .....	151
13.	Anhang.....	152
13.1	Laborgeräte.....	152
13.2	Verbrauchsmaterialien .....	154

13.3	Rolle der Effektorproteine BAK und BOK .....	155
13.4	Der ISR-Inhibitor ISRIB hemmt die durch die ABT-199&BTZ-aktivierte ISR nicht.	156
13.5	Detektion verschiedener basaler BCL-2-Protein-Expressionen in 12 Krebs-Zelllinien	158

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg. ....	12
Abbildung 2: Das Interaktions-Netzwerk der BCL-2-Proteine und deren Regulation der äußeren Mitochondrienmembran-Integrität. ....	15
Abbildung 3: Integrierte Stress-Antwort (ISR - <i>integrated stress response</i> ). ....	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Protein-Homöostase und des Proteasomstoffwechsels. ....	23
Abbildung 5: Struktur des 26S Proteasoms und Angriffspunkte von Inhibitoren. ....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Umwandlung des Caspase-Glo 3/7-Substrates in Z-DEVD- und Aminoluciferin. ....	40
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Umwandlung des Proteasom-Glo-Zell-basierten Reagenzes in Suc-LLVY, Z-LRR oder Z-nLPnLD und Aminoluciferin. ....	41
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Messung des Fluoreszenzsignals anhand des CellTOX <i>Green Cytotoxicity Assay</i> Cyanin-Farbstoffs. ....	42
Abbildung 9: ABT-199&BTZ induzieren in SW982/WT, SK-LMS und RD synergistisch Apoptose. ....	58
Abbildung 10: Expression verschiedener BCL-2-Proteine. ....	60
Abbildung 11: Erfolgreicher <i>Knock-Out</i> der Effektorproteine. ....	61
Abbildung 12: Einfluss der Effektorproteine BAX, BAK und BOK auf die ABT-199&BTZ- vermittelte Apoptose-Induktion. ....	65
Abbildung 13: Der SW982/BAX <sup>KO</sup> resultierte in signifikant reduzierter relativer Caspase 3/7- Aktivität nach Inkubation mit ABT-199&BTZ. ....	66
Abbildung 14: Verstärkte Proteinexpression von NOXA bei der Inkubation mit ABT-199&BTZ. .....	67
Abbildung 15: ABT-199&PIs induzieren synergistisch Zelltod. ....	70
Abbildung 16: Die Induktion der NOXA-Expression korreliert mit der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion. ....	73
Abbildung 17: Reduktion der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion bei <i>PMAIP1/NOXA-Knock-Down</i> . ....	74
Abbildung 18: Reduzierte Zelltod-Induktion bei <i>Knock-Down</i> von <i>BAK</i> , <i>BOK</i> und <i>PMAIP1</i> in SW982/BAX <sup>KO</sup> . ....	76
Abbildung 19: Unterschiedlich hervorgerufene Reduktion des Lumineszenzsignals der proteolytisch aktiven UE des Proteasoms durch die PIs. ....	77
Abbildung 20: Die PIs (BTZ, CFZ und IXZ) zeigen zeitversetzte Wirkungen und unterschiedlich stark hervorgerufene Zelltod-Induktionen in Kombination mit ABT-199. ....	78
Abbildung 21: Das BH3- <i>only</i> Protein NOXA liegt <i>Upstream</i> der Caspasen. ....	79



Abbildung 22: ABT-199 erhöht die NOXA-Expression unabhängig vom KO der Effektorproteine BAX, BAK und/oder BOK. ....	80
Abbildung 23: Reduktion des ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltods in Abwesenheit von BAX und/oder BAK. ....	81
Abbildung 24: Konzentrations-abhängige NOXA-Induktion.....	81
Abbildung 25: Teilweise TP53-abhängige Induktion von NOXA.....	83
Abbildung 26: Partiell abhängige TP53-regulierte PMAIP1-Induktion. ....	84
Abbildung 27: Anhaltende Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ trotz Knock-Downs von TP53.....	85
Abbildung 28: Zelllinien- und TP53-Status-unabhängige Zelltod-Induktion. ....	87
Abbildung 29: Teilweise TP53-vermittelte NOXA-Expression. ....	88
Abbildung 30: CHX blockiert effizient die NOXA-Expression. ....	89
Abbildung 31: ABT-199 vermittelt die transkriptionelle Induktion von PMAIP1.....	90
Abbildung 32: ABT-199 verändert die transgene Expression von NOXA nicht.....	91
Abbildung 33: ABT-199&BTZ vermitteln keine ROS-abhängige Apoptose.....	92
Abbildung 34: Das signifikant ansteigende Verhältnis von $\alpha$ -KG:Citrat bestätigt die Induktion des mitochondrialen metabolischen <i>Reprogrammings</i> .....	93
Abbildung 35: Die Induktion von ATF3 und ATF4 durch ABT-199 erhöht parallel die PMAIP1/NOXA-Expression mittels Aktivierung der integrierten Stress-Antwort (ISR).....	94
Abbildung 36: Der Knock-Down von ATF&ATF4 reduziert sowohl die PMAIP1/NOXA-Induktion als auch den ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod. ....	96
Abbildung 37: ABT-199 führt zu einer Reduktion der MCL-1 <sub>s</sub> -Form in der mitochondrialen Fraktion. ....	99
Abbildung 38: Erhöhtes relatives MCL-1 <sub>L</sub> -Level und signifikante Reduktion von MCL-1 <sub>s</sub> in der mitochondrialen Fraktion in Anwesenheit von ABT-199. ....	100
Abbildung 39: Die basale BCL-xL-Expression korreliert mit der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion. ....	103
Abbildung 40: Pharmakologische Modulation zur Aktivierung/Inhibierung verschiedener Komponenten der ISR. ....	118
Abbildung 41: Postulierter Mechanismus der durch ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion durch Transaktivierung von NOXA. in metabolischem <i>Reprogramming</i> (reduktiver Carboxylierung) mit einhergehender Aktivierung der ISR. ....	126
Abbildung 42: Knock-Down von BOK in SW982/BAK <sup>KO</sup> bzw. Knock-Down von BAK in SW982/BOK <sup>KO</sup> zeigte keinen ersichtlichen Einfluss auf die Zelltod-Induktion. ....	155

Abbildung 43: Der ISR-Inhibitor ISRIB zeigt keine effiziente Abschwächung der ISR und der damit einhergehenden Zelltod-Induktion.....	157
Abbildung 44: Die Proteinexpressionen von MCL-1, BCL-xL, BCL-2 und NOXA zeigen Unterschiede in den verschiedenen Krebs-Zelllinien.....	159

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme .....	26
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide .....	28
Tabelle 3: Verwendete und generierte Säugerzelllinien .....	28
Tabelle 4: Verwendete Plasmide für die Transfektion des NOXA-Expressionskonstruktes .....	32
Tabelle 5: Verwendete Plasmide für die Generierung von <i>Knock-Out</i> -Zelllinien .....	33
Tabelle 6: Verwendetes Plasmid als Referenz zur Bestimmung des Virustiters .....	34
Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren und BH3-Mimetika .....	35
Tabelle 8: Zusammensetzung eines Gradientengels .....	45
Tabelle 9: Verwendete Primär-Antikörper. WB = Western Blot .....	47
Tabelle 10: Verwendete Sekundär-Antikörper. WB = Western Blot, HRP = Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase) .....	48
Tabelle 11: Verwendete siGENOME SMARTpool siRNAs .....	50
Tabelle 12: cDNA-Synthese-Reaktionsmix .....	51
Tabelle 13: TagMan Gen-Expressions-Reaktionsmix .....	52
Tabelle 14: Verwendete TaqMan Gen-Expressions Assays .....	52
Tabelle 15: PCR-Programm für die Amplifikationsreaktion mittels TaqMan-basiertem Assay .....	53
Tabelle 16: Verwendete Zelllinien für die Bestimmung der basalen Expressionslevel verschiedener BCL-2-Proteine .....	101
Tabelle 17: Allgemein verwendete Laborgeräte .....	152
Tabelle 18: Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien .....	154

## IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
α-KG	α-Ketoglutarat
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (ATP-bindende Kasette)
ACM-D	<i>Actinomycin-D</i> (Aktinomycin-D)
ALL	<i>acute lymphatic leukemia</i> (akute lymphatische Leukämie)
AML	<i>acute myeloid leukemia</i> (akute myeloische Leukämie)
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i> (aktivierender Transkriptionsfaktor)
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCP-ALL	<i>B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia</i> (akute, lymphoblastische B-Zell-Vorläufer Leukämie)
BH	BCL-2-Homologie
BTZ	Bortezomib
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i> (Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne)
CDS	<i>coding DNA sequence</i> (kodierende DNA-Sequenz)
CFZ	Carfilzomib
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHX	Cycloheximid
CLL	<i>chronic lymphatic leukemia</i> (chronische lymphatische Leukämie)
CML	<i>chronic myeloid leukemia</i> (chronische myeloische Leukämie)
CReP	<i>constitutive repressor of eIF2α phosphorylation</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	<i>death-effector domain</i> (Todeseffektor-Domäne)
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i> (Todes-induzierender Signalkomplex)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure
EIF2AK1	<i>eukaryotic translation initiation factor 2-α kinase 1</i> (eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 2α Kinase)
eIF2α	<i>eukaryotic translation initiation factor 2α</i> (eukaryotischer Initiationsfaktor 2α)
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i> (elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay)
ERAD	<i>endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> (ER-assoziiertes Proteinabbau)
ETC	<i>electron transport chain</i> (Elektronentransportkette)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FADD	<i>Fas associated via death domain</i> (FAS-assoziiertes Todesdomänenprotein)

FCS	fötales Kälberserum
FLIP	<i>FADD-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i> (FADD-ähnliches IL-1 $\beta$ -konvertierendes Enzym hemmendes Protein)
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	4-(2 Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HHV8	humanes Herpesvirus Typ 8
HIF1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i> (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$ )
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> (Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses)
HRE	<i>hypoxia-response element</i>
HSR	<i>heat shock response</i> (Hitzeschock-Antwort)
IAPs	<i>inhibitors of apoptosis protein</i> (Apoptose-Inhibitoren)
IgH	Immunglobin H
IP3R	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
ISR	<i>integrated stress response</i> (integrierte Stress-Antwort)
ISRIB	<i>integrated stress response inhibitor</i> (integrierter Stress-Antwort-Inhibitor)
IXZ	Ixazomib
KO	<i>Knock-Out</i>
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma virus</i>
LB	Luria-Bertani
LMS	<i>Leiomyosarcoma</i> (Leiomyosarkom)
MAZ	Marizomib
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i> (Mantelzell-Lymphom)
MCL-1	<i>myeloid leukemia 1</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute-2</i>
MDP	<i>multidomain protein</i> (Multidomänen-Protein)
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> (Maus-embryonale-Fibroblasten)
MM	Multipl. Myelom
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran)
MT-CO1/COX1	Mitochondrial kodierte Cytochrom C Oxidase I
NAC	N-Acetylcystein
OATP	Organo-Anion-Transporter
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
ORR	<i>overall response rate</i> (Ansprechrate)
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP)
PEI	Polyethylenimin
PERK	<i>protein kinase RNA-like ER kinase</i> (Proteinkinase R-ähnliche endoplasmatische Retikulumkinase)
P-gp	P-Glykoprotein

PI	Proteasom-Inhibitor
PKR	Proteinkinase R
PMAIP1	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat induzierbares Protein 1
PP1c	Protein-Phosphatase 1c
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
Q-VD-OPh	Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketon
RD	Rhabdomyosarkom
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RQ	relative Quantifizierung
SDHA	Succinat-Dehydrogenase
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
sg	<i>single-guide</i>
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI</i>
SQR	Succinate-Coenzym Q Reduktase
STS	<i>soft-tissue sarcomas</i> (Weichteilsarkome)
tBID	trunkiertes BID
TC	<i>ternary complex</i> (ternärer Komplex)
TCA-Zyklus	<i>tricarboxylic acid cycle</i> (Citratzyklus)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TMD	Transmembrandomäne
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UE	Untereinheit
UPR	<i>unfolded protein response</i> (entfaltete Proteinantwort)
WHO	<i>world health organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

## 1. Zusammenfassung

Charakteristisch für die Entstehung neoplastischer Transformationen ist die anhaltende Proliferation sowie die Deregulation des Apoptose-Signalwegs. Die verminderte Apoptose beruht häufig auf der Überexpression anti-apoptotischer Proteine der BCL-2 Proteinfamilie. Diese sind folglich therapeutische Angriffspunkte, beispielweise durch den Einsatz spezifischer BCL-2-Inhibitoren, die bei der Behandlung des Multiplen Myeloms (MM) effektiv sind. Kürzlich veröffentlichte Vorarbeiten haben gezeigt, dass der spezifische BCL-2-Inhibitor ABT-199 in Kombination mit Bortezomib (BTZ) auch in soliden Tumoren effektiv Zelltod auslöst. ABT-199 blockiert das anti-apoptotische Protein BCL-2 und induziert in Kombination mit BTZ synergistisch Apoptose in Weichteilsarkomen (STS – *soft-tissue sarcomas*). Der klinisch relevante Proteasom-Inhibitor BTZ ist ein effektives und etabliertes Krebs-Therapeutikum, das ebenfalls im MM und speziell beim Mantelzell-Lymphom (MCL - *mantle cell lymphoma*) eingesetzt wird.

Basierend auf dem identifizierten Synergismus von ABT-199 und BTZ war ein Ziel dieser Arbeit, den zugrundeliegenden Wirkmechanismus als spezifischen Effekt von BTZ oder als einen generell durch Proteasom-Inhibition vermittelten Effekt zu charakterisieren. Hierfür wurden weitere klinisch angewandte Proteasom-Inhibitoren (PIs) mit unterschiedlicher Substrat-Spezifität hinzugezogen und untersucht, ob die Inhibition spezifischer Untereinheiten (UE) des Proteasoms die synergistische Wirkung in Kombination mit ABT-199 beeinflusst.

Ein weiteres Ziel war es, einerseits relevante Schlüsselmoleküle für die ABT-199&BTZ-vermittelte Apoptose-Induktion zu identifizieren und andererseits die Relevanz der in Vorarbeiten festgestellten verstärkten Expression von NOXA bei ABT-199&BTZ-induziertem Zelltod aufzuklären. Da das BH3-*only* Protein NOXA spezifisch MCL-1 blockiert und daher parallel zur BCL-2-Inhibition wirkt, ist die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus der NOXA-Induktion von großer Wichtigkeit.

Mit Hilfe der CRISPR/CAS9-Technologie wurden klonale Zelllinien mit *Knock-Out* der Effektorproteine BAX, BAK oder BOK generiert. Zusätzliche Herunterregulation mittels siRNA führte zur Identifikation der Schlüsselmoleküle BAX und NOXA bei der ABT-199&PI-vermittelten Zelltod-Induktion. Des Weiteren zeigten proteasomale Aktivitätsbestimmungen und durchflusszytometrische Analysen eine durch allgemein Proteasom-Inhibition-vermittelte Zelltod-Induktion. Es konnte hier das erste Mal gezeigt werden, dass nicht nur Proteasom-Inhibition die NOXA-Proteinexpression mit einhergehender MCL-1-Proteinexpression verstärkt, sondern dass ABT-199 die Expression von *PMAIP1/NOXA* durch transkriptionelle Induktion deutlich erhöht. Diese ABT-199 vermittelte transkriptionelle Induktion von NOXA ist vorwiegend *TP53*-unabhängig. Analysen der mRNA- und Proteinexpression zeigen, dass

ABT-199 durch Aktivierung der integrierten Stress-Antwort (ISR) die Expression von *PMAIP1*/NOXA induziert. Die ISR-Stress-Markerproteine ATF3&ATF4 wurden als kritische Transkriptionsfaktoren der NOXA-Induktion identifiziert. Ursache der verstärkten NOXA-Expression und synergistischen Apoptose-Induktion ist somit die durch ABT-199 aktivierte *PMAIP1*-Transkription.

Zusammenfassend schlagen die in dieser Arbeit erhobenen Daten einen molekularen Mechanismus vor, bei dem ABT-199 auf zweifache Weise Apoptose fördert: i) ABT-199 blockiert als BH3-Mimetikum das anti-apoptotisch wirkende BCL-2 und ii) ABT-199 transaktiviert NOXA und inhibiert so MCL-1. Der identifizierte Synergismus kommt zum Tragen, wenn zusätzlich durch Proteasom-Inhibition der NOXA-Abbau gehemmt wird. Die bisher nicht beschriebene Wirkung von ABT-199, NOXA transkriptionell zu induzieren, könnte nicht nur in hämatopoetischen Erkrankungen Anwendung finden, sondern auch auf andere Tumor-Entitäten ausgeweitet werden.



## 2. Abstract

The development of neoplastic transformations is characterized by persistent proliferation as well as deregulation of the apoptosis signalling pathway. Reduced apoptosis is often caused by overexpression of anti-apoptotic proteins of the BCL-2 protein family. Consequently, these are therapeutic targets, for example by using specific BCL-2 inhibitors, which are effective in the treatment of multiple myeloma (MM). Our recently published preliminary work showed that the specific BCL-2 inhibitor ABT-199 in combination with bortezomib (BTZ) is effective in inducing cell death also in solid tumours. ABT-199 blocks the anti-apoptotic protein BCL-2 and synergizes with BTZ to induce apoptosis in soft-tissue sarcomas (STS). The clinically relevant proteasome inhibitor BTZ is an effective and established cancer therapeutic agent approved for therapy of MM and specifically for mantle cell lymphoma (MCL).

Based on the identified synergism of ABT-199 and BTZ, one aim of this work was to elucidate whether the underlying mechanism of action is a specific effect of BTZ or generally mediated by proteasome inhibition. For this purpose, other clinically applied proteasome inhibitors (PIs) with different substrate specificity were included and the differences due to inhibition of specific proteasome subunits (UE) on synergistic apoptosis induction in combination with ABT-199 were investigated.

Another aim was to identify relevant key molecules for ABT-199&BTZ-mediated apoptosis induction and to elucidate the relevance of the increased expression of NOXA in ABT-199&BTZ-induced cell death. Since the BH3-only protein NOXA specifically blocks MCL-1 and therefore acts parallel to BCL-2, the elucidation of the underlying mechanism of NOXA induction is of great importance.

Using CRISPR/CAS9 technology, clonal cell lines with knock-out of the effector proteins BAX, BAK or BOK were generated. The loss-of-function studies by additional downregulation of BCL-2 proteins using siRNA identified BAX and NOXA as key molecules in ABT-199&PI-mediated cell death induction. Furthermore, proteasomal activity assays and flow cytometric analyses showed that synergistic cell death induction is mediated by general proteasome inhibition. It was shown here for the first time that not only proteasome inhibition enhances NOXA protein expression with concomitant MCL-1 protein expression, but moreover ABT-199 markedly increases *PMAIP1*/NOXA expression through transcriptional induction. This ABT-199-mediated transcriptional induction of NOXA is predominantly *TP53*-independent. Analyses of mRNA and protein expression showed that ABT-199 induces *PMAIP1*/NOXA expression through activation of the integrated stress response (ISR). Thus, the ISR stress marker proteins ATF3&ATF4 were identified as critical transcription factors of NOXA induction. The cause of synergistic apoptosis is the ABT-199-induced enhanced transcription of *PMAIP1*.

In summary, the data presented in this work propose a molecular mechanism whereby ABT-199 promotes apoptosis in a twofold manner: i) ABT-199 blocks as a BH3 mimetic anti-apoptotic BCL-2 and ii) ABT-199 transactivates NOXA and thus inhibits MCL-1. The identified synergism comes into play when NOXA degradation is additionally inhibited by proteasome inhibition. The formerly unidentified effect of ABT-199 to transcriptionally induce NOXA could not only find application in hematopoietic diseases, but furthermore be extended to other tumour entities.

## 3. Einleitung

### 3.1 Maligne Tumorerkrankungen

Laut der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization (WHO) 2022) betrug die weltweit geschätzte Zahl maligner Tumor-Neuerkrankungen im Jahr 2020 mehr als 19 Millionen, wobei Brust-, Lungen- und kolorektaler Krebs die drei Tumorentitäten mit den höchsten Inzidenzzahlen waren (WHO, 2020). Dabei sind fast 10 Millionen Tote auf maligne Tumore zurückzuführen (WHO, 2020). Mit steigender Lebenserwartung wird die Zahl an Tumor-Neuerkrankungen bis in das Jahr 2040 auf geschätzte 29 Millionen ansteigen. Mit steigender Inzidenzzahl wird sich auch die Mortalität auf geschätzte 16 Millionen Tote im Jahr 2040 weiter erhöhen (WHO, 2020).

Die Entstehung von malignen Neoplasien kann von verschiedenen Organen des Körpers und von unterschiedlichen Zellarten ausgehen. Ausgangspunkte sind unter anderem Epithelien (Adenokarzinome, kleinzellige Lungenkarzinome), das blutbildende Knochenmark (Leukämie, Lymphome), aber auch das Binde- und Stützgewebe (Sarkome) oder die pigmentbildenden Zellen (Melanome) (Krebs - Das ZfKD 2023). In gesunden Geweben herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation mittels mitotischer Zellteilung und dem Zellsterben über den programmierten Zelltod, der Apoptose. Bei der malignen Tumorentstehung kommt es bei dem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Regulationsmechanismen zu einem Ungleichgewicht, wodurch gesunde Zellen zu „Krebszellen“ mit veränderten Zellproliferations- und Zelltodeigenschaften transformieren. Diese veränderten Eigenschaften wurden von Hanahan und Weinberg in grundlegende und aufkommende Merkmale von Tumorzellen eingeteilt und als die „*Hallmarks of Cancer*“ bezeichnet (Hanahan und Weinberg 2011). Eines dieser Merkmale ist die verminderte Apoptose-Empfindlichkeit. Dies bedeutet, dass der programmierte Zelltod über Apoptose als natürliche Barriere für die Krebsentwicklung dient und Tumorzellen eine Vielzahl von Strategien entwickeln, um verschiedene Signalwege der Apoptose zu beeinträchtigen oder zu umgehen. Strategien sind beispielsweise der Verlust des Tumorsuppressors TP53 oder die Überexpression anti-apoptotischer Regulatoren (Hanahan und Weinberg 2011). Ein häufiges Ereignis bei der Transformation ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53* (Hanahan und Weinberg 2011), welches ein häufiges Ereignis in der Onkogenese darstellt. Auch die gesteigerte Expression von anti-apoptotischen BCL-2-Proteinen oder Herunterregulation bzw. Mutation von pro-apoptotischen Faktoren wie die BCL-2 *only* Proteine treten häufig auf. Nicht nur bei hämatopoetischen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom (MM), sondern auch in soliden Tumoren kann eine Überexpression von MCL-1 (*myeloid leukemia 1*) beobachtet werden (Algarín *et al.* 2020; Gores und Kaufmann 2012; Kaufmann *et al.* 1998). Das MM, aber auch die akute und chronische myeloische Leukämie (AML und CML) zeigen häufig eine Überexpression von BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*)

(DiNardo *et al.* 2019; Roberts *et al.* 2016). Das BCL-2-Gen wurde erstmals 1984 bei der Kartierung einer t(14;18) Translokation in einer akuten B-lymphatischen Leukämie-Zelllinie (ALL) identifiziert (Tsujiimoto *et al.* 1984). Durch die chromosomale Translokation wurde das auf dem Chromosom 18q21 lokalisierte BCL-2-Gen unter die Kontrolle des *Enhancers* des schweren Immunglobulinketten-Gens H (IgH) auf Chromosom 14q32 transloziert, was zur konstitutiven BCL-2-Überexpression führte (Kelly und Strasser 2011). Auch für Synovial-Sarkome ist eine spezifische Chromosomenaberration bekannt, bei der die reziproke Translokation t(X;18) zu einem chimären Fusionsprotein führt. Durch Klonierungsarbeiten der Translokationsbruchpunkte der Chromosomen konnte die Fusion zweier neuer Gene identifiziert werden, die als SYT (auf 18q11) und SSX (auf Xq11) bezeichnet werden (Kawai *et al.* 1998). Dieses chimäre Fusionsprotein SYT-SSX führt zur Herunterregulation der Transkription und damit der Expression bestimmter Zielgene in Synovial-Sarkomen.

Durch die oben beispielhaft aufgeführten Mechanismen wird die Tumorzelle vor Apoptose geschützt und besitzt damit einhergehend effektive Resistenzmechanismen gegenüber Krebs-Behandlungen, eingeschlossen der Strahlen- und Chemotherapie (Wang *et al.* 2021).

## 3.2 Sarkome

### 3.2.1 Subtypen und Auftreten

Weichteilsarkome sind eine sehr heterogene und seltene Gruppe von Tumorerkrankungen mesenchymalen Ursprungs mit mehr als 100 verschiedenen histologischen Subtypen und Entitäten (Hoang *et al.* 2018). Sarkome können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Sarkome des Skelettsystems (*bone sarcoma*), die mit etwa 15% seltener vorkommen als die Weichteilsarkome (STS – *soft-tissue sarcomas*), die mit mehr als 85% die überwiegenden Fälle darstellen (Amankwah *et al.* 2013). Laut WHO machen Sarkome allerdings weniger als 1% der weltweit auf 19 Millionen geschätzten Zahl an jährlichen Tumor-Neuerkrankungen aus (WHO, 2020), wobei vorrangig Kinder und junge Erwachsene betroffen sind (Amankwah *et al.* 2013). Die vom Gewebe der Skelettmuskulatur abstammenden Rhabdomyosarkome (RD) treten fast ausschließlich bei Kindern und Jugendlichen auf. Die häufigsten Krankheitsformen im Erwachsenenalter hingegen sind neben dem Synovial-Sarkom das Leiomyosarkom mit Ursprung im glatten Muskelgewebe und das aus dem Fettgewebe hervorgehende Liposarkom (Amankwah *et al.* 2013). Im Gegensatz zu einigen anderen Krebserkrankungen, bei denen Auslöser und Risikofaktoren wie erhöhter Tabakkonsum (Lungenkrebs), Übergewicht und Bewegungsmangel, aber auch Umweltfaktoren wie UV-Strahlung (Melanome), das Edelgas Radon (Lungenkrebs) oder auch chronische Infektionen (Leberkrebs) oder genetische Prädispositionen (Brust- und Eierstockkrebs oder Darmkrebs) bekannt sind, lässt sich bei den meisten Fällen der Weichteilsarkome keine eindeutige Ursache finden (Amankwah *et al.*

2013). Wenige Risikofaktoren, wie das Vorliegen einzelner oder mehrerer genetischer Varianten, können das Erkrankungsrisiko vermutlich erhöhen. Auch virale Infektionen können zur Sarkom-Entstehung beitragen, wie das humane Herpesvirus Typ 8 (HHV8) beim Kaposi-Sarkom. Auch das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem mit der Entstehung von Weichteilsarkomen in Verbindung gebracht werden (Amankwah *et al.* 2013). Chronische Entzündungsprozesse können auch das Risiko für Weichteilsarkome steigern. Ebenfalls sind Umweltgifte und Chemikalien (Vinylchlorid) mit der Entstehung von Sarkomen, wie dem Angiosarkom der Leber, assoziiert (Amankwah *et al.* 2013).

Aufgrund ihrer genetischen Heterogenität, wie genomische Translokationen, Mutationen von Tumorsuppressor- und regulatorischen Zellzyklus-Genen oder Variationen in der Kopienanzahl einzelner Gene, sind Sarkome auch heute noch schwierig zu therapieren.

### **3.2.2 Therapieansätze bei Sarkomen**

Im Laufe des 20. Jahrhunderts hat sich die Behandlung maligner Tumore erheblich weiterentwickelt. Trotzdem stellt die Behandlung von Sarkomen bis heute eine große Herausforderung dar und Therapiemöglichkeiten bleiben limitiert, nicht zuletzt aufgrund der genetischen Heterogenität und des seltenen Auftretens von Sarkomen (Krebs - Das ZfKD 2023). Lange Zeit standen als Therapieoptionen lediglich die komplette chirurgische Resektion des Sarkoms oder deren Bestrahlung zur Verfügung. Neuentwickelte Chemotherapeutika bieten die Chance, Sarkome auch im fortgeschrittenem Stadium, in dem keine primäre Resektion mehr durchgeführt werden kann, zu behandeln. Je nach Sarkom-Subtyp und Erkrankungsstadium werden die verschiedenen Therapieverfahren wie Resektion, Bestrahlung und/oder Chemotherapie im Wechsel oder aufeinander abgestimmt, miteinander kombiniert eingesetzt. Solche multimodalen Therapiekonzepte aus chirurgischer Resektion bei operablen Sarkomen, kombiniert mit adjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie bei Rezidiven oder metastasierten, irresektablen Sarkomen, verlängern die mittlere Überlebensdauer und verbessern die Lebensqualität der Patienten. Bei metastasierten oder irresektablen Sarkomen wird auf die systemische Chemotherapie zurückgegriffen.

Die Standard-Erstlinientherapie von Weichteilsarkomen ist die alleinige Gabe von Doxorubicin (Demetri und Elias 1995) oder eine Kombination aus Doxorubicin mit Ifosfamid (van Oosterom *et al.* 2002; Sleijfer *et al.* 2010). Doxorubicin ist ein zytotoxisches Anthrazyklin, das durch Interkalation in die genomische DNA die DNA-Synthese hemmt (Hilmer *et al.* 2004), dadurch die DNA-Replikation und -Reparatur beeinträchtigt, worauf die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin beruht (Buchholz *et al.* 2002). Ifosfamid ist ebenfalls ein Zytostatikum und hemmt die Zellteilung durch Alkylierung der DNA, da die DNA-Polymerase die alkylierte DNA nicht mehr korrekt ablesen kann.

Für die Zweitlinientherapie wird hochdosiertes Ifosfamid verwendet (Casali *et al.* 2018). Bei Versagen von Doxorubicin ± Ifosfamid wurde als Zweit-/Drittlinientherapie Trabectedin zugelassen, wobei die meisten klinischen Phase II Studienerfahrungen in Leiomyo- und Liposarkomen gesammelt wurden (Demetri *et al.* 2009). Trabectedin kann auch bei Synovial-Sarkomen wirksam sein. Eine weitere Zweit-/Drittlinientherapie-Möglichkeit bietet Pazopanib, das allerdings bei Liposarkomen nicht zugelassen ist. Für Liposarkome kann das Zytostatikum Eribulin eingesetzt werden. Eine weitere etablierte Therapieoption stellt Gemcitabin dar, welches in Kombination mit Docetaxel gegenüber einer Monotherapie von Gemcitabin eine verbesserte Therapie-Antwort, vor allem in Leiomyosarkomen (*Leiomyosarcoma* - LMS), zeigte (In *et al.* 2017; López-Pousa *et al.* 2016).

Metastasierte oder irresektable Sarkome und Sarkom-Rezidive, bei denen die systemische Chemotherapie aufgrund von Resistenz-Entwicklungen fehlgeschlagen ist, können durch technische Fortschritte und dem raschen Erkenntnisgewinn im Bereich der Tumorgenetik mittels personalisierter Therapien behandelt werden. Zielgerichtete Kombinations-Therapien aus Doxorubicin, dem HSP-90 Inhibitor 17-DMAG und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDAC) Vorinostat zeigten synergistisch induzierten Zelltod in Zellkultur-Experimenten und können das progressionsfreie Überleben von Patienten verbessern (Dumont *et al.* 2014). Aktuell laufen klinische Studien für den HDAC-Inhibitor Vorinostat (z.B. Phase 1 NCT04308330), den Tyrosinkinase-Inhibitor Apatinib (anti-VEGFR2) in Kombination mit SHR-1210 (anti-PD1) (Phase 2 NCT04239443) und auch Immuntherapien mit Pembrolizumab (anti-PD1) (Phase 2 NCT02301039) oder Ipilimumab (anti-CTLA-4) (Phase 2 NCT00140855). Oftmals erschweren primäre und/oder sekundäre Resistenzen durch Mutationen der Ziel-Gene, z. B. PDGFR beim Glioblastom (Corless *et al.* 2005) oder KIT beim Melanom (Corless *et al.* 2002) die Effizienz der zielgerichteten Therapie. Weitere Angriffspunkte für die Behandlung von Sarkomen sind neben den Wachstumssignalwegen auch Veränderungen der Zellzyklus-Progression oder Stressantworten als Adaption an die Tumorumgebung.

### **3.3 Tumorsuppressorgen TP53**

Alterationen in der Zellzyklus-Regulation werden häufig von beeinträchtigter Apoptose begleitet. Die Apoptose wird unter anderem durch das Tumorsuppressorprotein TP53 reguliert, dessen zentrale Rolle die Funktion eines Transkriptionsfaktors ist. Das Protein P53 wurde 1979 durch verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig identifiziert (Lane und Crawford 1979). Zuerst wurde TP53 fälschlicherweise als Protoonkogen klassifiziert (Eliyahu *et al.* 1984) und 1993 als Tumorsuppressor-Protein reklassifiziert, wobei sich in TP53 Knock-Out Mäusen und Mäusen mit einem Verlust der typischen Funktion von TP53 (*Loss-of-function* Mutation) spontane Tumore mit 100% Inzidenz nach spätestens 9 Monaten entwickelt haben (Donehower *et al.* 1992; Harvey *et al.* 1993). P53 wird von seinem negativen Regulator MDM2

(*Mouse Double Minute-2*), einer E3-Ubiquitin-Ligase, für den Abbau markiert und proteasomal degradiert (Ashcroft und Vousden 1999; Marine und Lozano 2010). Infolge verschiedener zellulärer Stress-Signale, wie DNA-Schäden, oxidativer Stress, Hypoxie oder Onkogen-Aktivierung wird P53 phosphoryliert. Die Phosphorylierung verhindert die Bindung von MDM2 und somit die Ubiquitinierung und den gezielten proteasomalen Abbau (Lakin und Jackson 1999; Shieh *et al.* 1997). Akkumuliertes P53 aktiviert Signalwege in der Zelle, die über einen G<sub>1</sub>-Arrest die DNA-Reparatur in der Zelle ermöglichen sollen. Sollte dies nicht mehr möglich sein, löst P53 den programmierten Zelltod aus (Aubrey *et al.* 2016). Häufig kommt es in Tumorerkrankungen zur Alteration der Funktion von *TP53* durch Mutationen oder durch Überexpression von MDM2 und damit zur Störung der Apoptose. Eine Störung der Apoptose kann beispielsweise durch funktionsbeeinträchtigtes TP53-Protein hervorgerufen werden (Eischen *et al.* 1999). Zu den Zielgenen von TP53 gehören pro-apoptotische Proteine wie NOXA oder PUMA; deren transkriptionelle Aktivierung durch die Inaktivierung von *TP53* verhindert wird (Riley *et al.* 2008; Wei *et al.* 2006). Das TP53-Protein ist auch ein Negativ-Regulator anti-apoptotischer Proteine. Eine Mutation im *TP53*-Gen und eine daraus entstehende Inaktivierung des TP53-Proteins kann zu einer Beeinträchtigung als Negativ-Regulator führen und dadurch zur Überexpression anti-apoptotischer Proteine beitragen. Dies wiederum fördert das Überleben der Zelle (Wu *et al.* 2001). Die Inaktivierung des *TP53*-Gens und damit enhergehender gestörter Apoptose ist bei etwa 60% aller neoplastischen Transformationen nachweisbar und ein wiederkehrendes Ereignis in der Onkogenese.

### 3.4 Apoptose

Die Apoptose ist ein genetisch konserviertes Programm zur Regulation des Zelltods. Dieses Programm wird in Folge spezifischer Signalereignisse aktiviert und führt zur Elimination überflüssig gewordener, infizierter, transformierter oder verletzter Zellen (Galluzzi *et al.* 2007; Green und Llambi 2015). Charakteristische Veränderungen im Apoptose-Prozess sind die schrittweise Kondensation und Degradierung des Chromatins, die Bildung blasenartiger Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an der Außenseite der Plasmamembran als Erkennungssignal für Makrophagen, die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, der Abbau des Mitochondriums, das Schrumpfen der Zelle und schlussendlich die Fragmentierung der Zelle in kleine Membranhüllte Teilstücke, die sogenannten Apoptosekörperchen (Galluzzi *et al.* 2007; Green und Llambi 2015). Die Elimination apoptotischer Zellen erfolgt über Phagozytose der apoptotischen Körperchen, wobei der Zellinhalt nicht freigesetzt wird. Im Gegensatz hierzu kommt es im Zuge der Nekrose als passiver Prozess zum Anschwellen bis hin zum Platzen der Zelle unter Freisetzung des Zellinhalts, wodurch eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (Rock und Kono 2008). Die Apoptose kann durch extrazelluläre oder intrazelluläre Signale induziert

werden, was jeweils über eine mehrstufige, komplexe Signalkaskade erfolgt. Die Aktivierung des Zelltods wird daher in extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalweg unterteilt.

### 3.4.1 Extrinsischer Apoptose-Signalweg

Für die Initiierung der Apoptose über den extrinsischen Signalweg ist die Beteiligung von Transmembran-Rezeptor-vermittelten Interaktionen erforderlich. Durch die Bindung eines Todesliganden an den zugehörigen Todesrezeptor nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip wird gezielt Apoptose induziert (Abbildung 1) (Elmore 2007; Locksley *et al.* 2001). Die Todesrezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie (TNF-R Superfamilie). Die bis heute am besten charakterisierten Liganden und zugehörigen Todesrezeptoren sind FasL/FasR(Apo1/CD95), TNF- $\alpha$ /TNF-R1, Apo3L/DR3, Apo2L(TRAIL)/DR4(TRAILR-1) und Apo2L(TRAIL)/DR5(TRAILR-2) (Gravestien und Borst 1998; Hehlhans und Pfeffer 2005; Wajant 2003). Die TNF-R besitzen eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne und eine homologe, cytoplasmatische Todesdomäne. Durch die Bindung der Liganden an die Rezeptoren kommt es zu einer Rezeptor-Clusterung, Konformationsänderung der Rezeptoren und der Exposition der Todesdomäne (Green und Llambi 2015). Durch das Rezeptor-Clustering werden Adaptormoleküle wie FADD (*Fas associated via death domain*) rekrutiert, die mit ihrer DED-Domäne (*death-effector domain*) mit der DED der Initiatorcaspasen-8/-10 interagieren (Reed *et al.* 2004). Der Proteinkomplex, bestehend aus Ligand, Rezeptor, FADD und Initiatorcaspase, wird auch als DISC (*death-inducing signaling complex*) bezeichnet (Kischkel *et al.* 1995).

### 3.4.2 Caspasen

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Zielmoleküle spezifisch durch Spaltung der Peptidbindung nach einem Aspartat spalten. Die Initiatorcaspasen sind apikale Caspasen der Apoptose-Signalkaskade und aktivieren weitere Effektorcaspasen, die Caspasen 3, 6 und 7. Initiatorcaspasen werden durch Rekrutierung an Adaptormoleküle wie FADD dimerisiert und dadurch aktiviert (Chang *et al.* 2003). Effektorcaspasen hingegen liegen inaktiv als Effektor-Pro-Caspasen (Zymogen) vor und werden mittels Spaltung beispielsweise durch aktive Initiatorcaspasen aktiviert. Effektorcaspasen sind für ihre Aktivierung von Initiatorcaspasen abhängig. Aktive Effektorcaspasen führen zur Exekution der Zelle (Bao und Shi 2007; Green und Llambi 2015). Durch Bindung der DED des FADD-Moleküls können FLIP-Proteine (*FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme*) die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8/-10 verhindern (Roth und Reed 2004).

### 3.4.3 Intrinsischer Apoptose-Signalweg

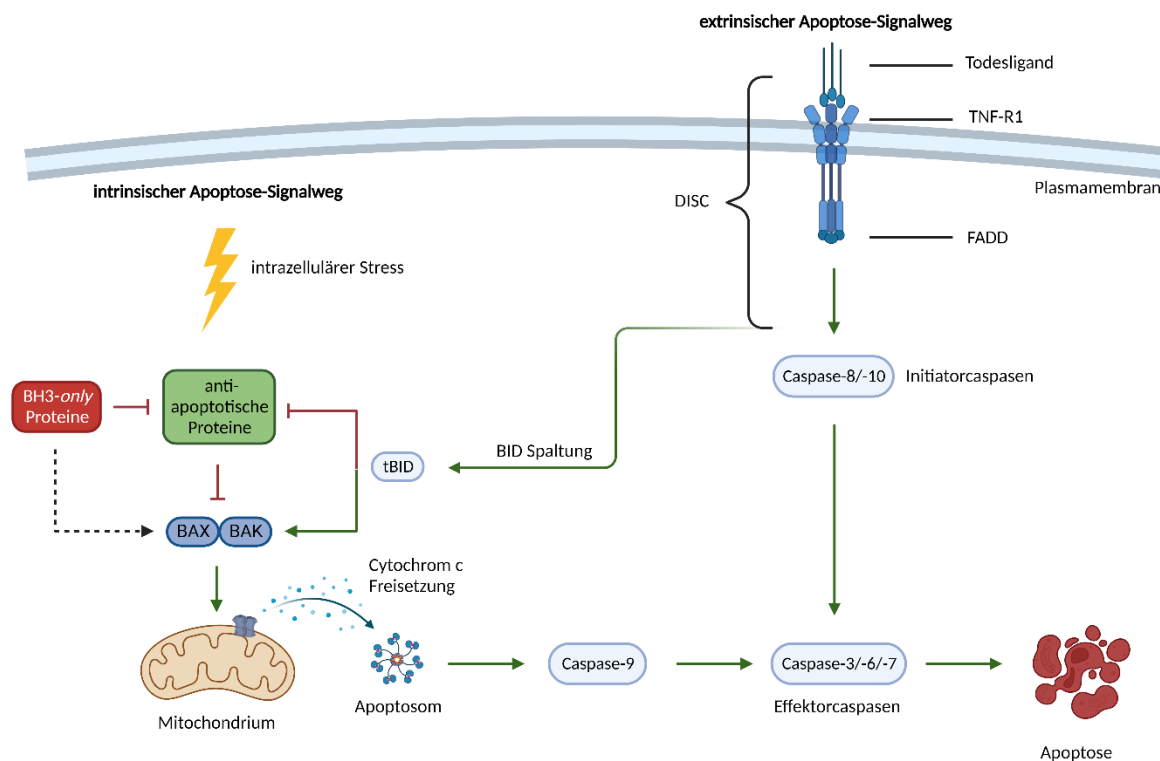
Die Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalwegs wird durch diverse intrazelluläre Signale wie DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Cytokinen, virale



Infektionen, Hypoxie, oxidativer Stress, oder auch Expression von Onkogenen oder onkogene Dysregulation (Elmore 2007) vermittelt (Abbildung 1). Diese Stimuli führen zur MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*). Dabei oligomerisieren die Effektorproteine BAX und BAK und bilden Poren in der Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine, insbesondere Cytochrom c und Smac/DIABLO (*second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI*), aus dem Intermembranraum ins Cytosol führen (Saelens *et al.* 2004). Cytochrom c initiiert die Bildung des Apoptosoms, einem Komplex aus dem cytosolischen Adapterprotein APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Cytochrom c und Pro-Caspase-9 (Chinnaiyan 1999). Durch Konformationsänderung in APAF-1 bindet dessen CARD (*caspase activation and recruitment domain*) an die Pro-Caspase-9-CARD. Die durch Dimerisierung in räumliche Nähe gebrachte aktivierte Caspase-9 im Apoptosom kann durch gezielte Proteolyse die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktivieren, was schlussendlich zur Exekution der Zelle führt (Fischer *et al.* 2006). Das bei der MOMP ebenfalls freigesetzte Smac bindet als Inhibitor an IAPs (*inhibitors of apoptosis protein*) und verhindert deren Bindung an Caspasen, wodurch die endogene Inhibitionswirkung der IAPs auf die Caspasenaktivität gehemmt wird (Berthelet und Dubrez 2013; Crook *et al.* 1993). Die Hauptakteure des intrinsischen Apoptose-Signalwegs sind die Mitochondrien und deren MOMP-Ereignis mit der Freisetzung von Cytochrom c.

Durch die komplexe Interaktion pro- und anti-apoptotischer Faktoren der BCL-2-Proteinfamilie wird die mitochondrial vermittelte Apoptose streng reguliert (Galluzzi *et al.* 2012; Leber *et al.* 2007; Pistritto *et al.* 2016). Die BH3-*only* Proteine spielen hierbei eine zentrale Rolle, da sie mit den pro-apoptotischen Effektor-Proteinen um die Bindung in der hydrophoben Furche der anti-apoptotischen Proteine konkurrieren.

Eine Verbindung (*cross-talk*) zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalweg stellt das BH3-*only* Protein BID her (Li *et al.* 1998). Über aktivierte Caspase-8 kann BID zu trunkiertem BID (tBID) gespalten werden und transloziert zum Mitochondrium. tBID vermittelt daraufhin das Dissoziieren von anti-apoptotischen Proteinen durch direkte Bindung an BAX und BAK, sodass es zu einer vermehrten BAX- und BAK-Aktivierung kommt. Dadurch wird der extrinsische Signalweg über einen positiven Kopplungsmechanismus durch Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs verstärkt.



**Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg.** Die extrinsisch vermittelte Apoptose kann über Zelloberflächen-Rezeptoren (bspw. TNF-R1) durch Ligandenbindung induziert werden. Der dabei entstehende Proteinkomplex (DISC) aktiviert die Effektorcaspasen-3/ -6 und -7, was in der Zerstörung der Zelle endet. Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Apoptose-Signalweg über intrazelluläre Signale aktiviert. Der intrinsische Apoptose-Signalweg startet mit der Induktion der BH3-only Proteine, die die Aktivität der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine neutralisieren und dabei die pro-apoptotischen Effektor-Proteine BAX und BAK aktivieren. Die Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Oligomerisierung von BAX und BAK führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma. Nach Bildung des Apoptosoms wird die Caspase-9 aktiviert, was wiederum zur Aktivierung der Caspase-3 und schlussendlich zur Apoptose der Zelle führt. Die BCL-2-Protein-Familie reguliert den intrinsischen Signalweg und kann den extrinsischen Signalweg modulieren, indem die Spaltung von BID zwischen den beiden Wegen vermittelt wird (modifiziert nach (Czabotar *et al.* 2014; Youle und Strasser 2008), mit BioRender.com erstellt).

### 3.4.4 BCL-2-Proteinfamilie

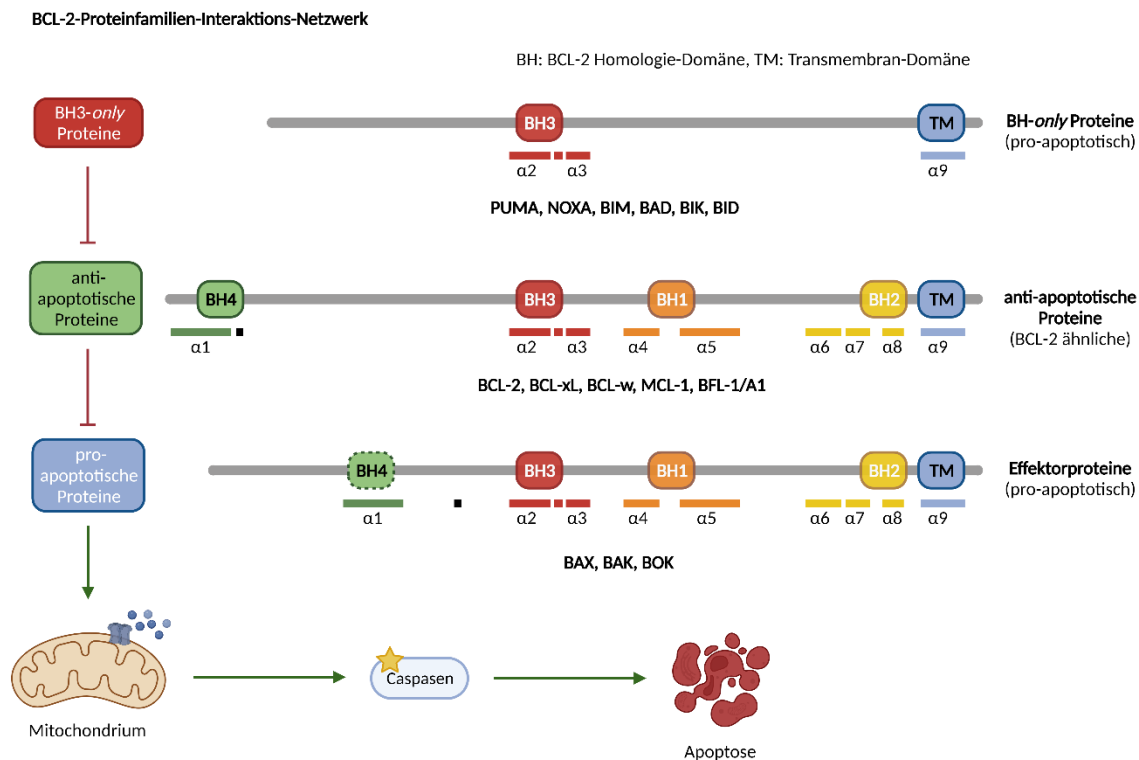
Die BCL-2-Proteinfamilie besteht aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen, die durch komplexe Interaktion untereinander ein Rheostat-Gleichgewicht aufrechterhalten. Sowohl das Verhältnis der pro- und anti-apoptotischen BCL-2-Proteine innerhalb einer Zelle als auch deren Interaktion mit Konformations- und auch Lokalisationsänderungen tragen dazu bei, die Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium zu kontrollieren. So kann über das Schicksal der Zelle, zu überleben oder zu sterben, bestimmt werden (Galluzzi *et al.* 2012; Leber *et al.* 2007; Pistritto *et al.* 2016). Das Gleichgewicht wird sowohl auf transkriptioneller

als auch auf posttranslationaler Ebene als Antwort auf intrazelluläre Stimuli reguliert. Die BCL-2-Proteinfamilie kann in drei Untergruppen eingeteilt werden, wobei die Verwandtschaft der BCL-2-Proteine auf dem Vorhandensein von mindestens einer der vier evolutionär konservierten verschiedenen BCL-2-Homologie (BH)-Domänen zurückzuführen ist (Youle und Strasser 2008). Die BH-Domänen sind für die Funktion der BCL-2-Proteine entscheidend. Eine Deletion oder Punktmutation in einer der BH-Domänen durch molekulares Klonen kann die Apoptoserate stark beeinflussen. Die drei funktionell wichtigen BCL-2-Homologiedomänen (BH1, BH2 und BH3) liegen in enger räumlicher Nähe und bilden eine verlängerte hydrophobe Furche, die die Bindungsstelle für andere Mitglieder der BCL-2-Familie bildet. Die als einziges in allen BCL-2-Proteinen vorkommende BH3-Domäne ist für die Homo-/Heterodimerisierung von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitgliedern verantwortlich. Die C-terminale Transmembrandomäne ist wiederum für die Lokalisation der BCL-2-Proteine und deren Verankerung in die Membran zuständig (Pistritto *et al.* 2016). Das ausschließliche Vorhandensein der BH3-Domäne unterscheidet die pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine (z.B. BAD, BID, BIK, BIM, NOXA und PUMA) von den pro-apoptotischen Multidomänen-Proteinen (*multidomain proteins* - MDP) BAX, BAK und BOK, welche die BH1-4-Domänen gemeinsam haben (Abbildung 2) (Youle und Strasser 2008). Das Protein BOK wurde trotz seiner Sequenzhomologie zu den porenbildenden Effektorproteinen BAX und BAK erst kürzlich als pro-apoptotisches MDP der BCL-2-Familie nachgewiesen (Einsele-Scholz *et al.* 2016; Llambi *et al.* 2016). Durch Aktivierung der Effektorproteine BAX, BAK und BOK kommt es im Zuge einer Konformationsänderung zur Homo-Oligomerisierung der Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran. Die Aktivierung von BOK ist eher unkonventionell, da BOK als intrinsisch instabil oder metastabil beschrieben wird. Dies bedeutet, dass BOK spontan seine Konformation von einem inaktiven zu einem aktiven Zustand wechselt (Moldoveanu und Zheng 2018). Durch Bildung von Poren vermitteln die Effektorproteine die MOMP und die Freisetzung von Cytochrom c. Im Cytosol bewirkt Cytochrom c die Aktivierung der Caspasen, was schlussendlich zum Zelltod führt (Chinnaiyan 1999; Fischer *et al.* 2006; Saelens *et al.* 2004). Die anti-apoptotischen BCL-2-ähnlichen Proteine (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1, A1) antagonisieren die pro-apoptotische Aktivität der BH3-*only* Proteine und der MDPs BAX und BAK. Hierfür dient die hydrophobe Furche der BH-Domänen 1 bis 3 der anti-apoptotischen Proteine als Bindungsstelle für die hydrophobe Oberfläche der amphipatischen  $\alpha$ -Helix einer anderen BH3-Domäne der Interaktionspartner BAX und BAK oder der BH3-*only* Proteine (Youle und Strasser 2008). Die Regulation der BOK-induzierten Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wurde wiederholt gezeigt, dass die Apoptose-Induktion von BOK durch MCL-1 gehemmt wird (Hsu *et al.* 1997; Lucendo *et al.* 2020; Stehle *et al.* 2018). Zum anderen wird in einer neueren Veröffentlichung postuliert, dass BOK weder die Aktivierung durch BH3-*only* Proteine benötigt noch mit anti-apoptotischen Proteinen interagiert

(Llambi *et al.* 2016). Vielmehr wird die Aktivität von BOK über dessen Proteinstabilität kontrolliert und es wird vorgeschlagen, dass die konstitutive Ubiquitylierung durch den AMFR/gp78 E3-Ubiquitin Ligase-Komplex und der proteasomale Abbau von BOK die Apoptoseinduktion verhindert (Llambi *et al.* 2016).

Die BH3-*only* Proteine wiederum neutralisieren die Fähigkeit der anti-apoptischen Proteine, die Effektorproteine BAX und BAK zu antagonisieren und den Zelltod zu fördern (Huang *et al.* 2019). Die antagonisierende Wirkung der BCL-2-ähnlichen Proteine auf bestimmte pro-apoptische Mitglieder wird über die spezifische Interaktion der Proteine miteinander gewährleistet; diese wiederum wird durch die Aminosäurezusammensetzung der hydrophoben Furche und die Sequenz der BH3-Domäne bestimmt (Czabotar *et al.* 2014). Zusätzlich unterscheidet sich die Lokalisation der MDPs innerhalb der Zelle und ebenso ihre bevorzugte Wechselwirkung mit anti-apoptischen BCL-2-Proteinen. In gesunden Zellen ist BAK auch im inaktiven Zustand bereits in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, während BAX vorwiegend im Cytosol vorzufinden ist. Bei Apoptose-Induktion wird aktives BAX an das Mitochondrium transloziert (Fletcher *et al.* 2008). Für BAK ist die bevorzugte Inhibition durch MCL-1 und BCL-xL beschrieben, während BAX präferentiell von BCL-2, BCL-xL und BCL-w inhibiert wird (Willis *et al.* 2005). Obgleich die Sequenz von BOK die größte Homologie zu BAX und BAK unter den BCL-2 Proteinen aufweist, unterscheidet sich BOK von den anderen Effektor-Proteinen unter anderem in der Lokalisation innerhalb der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Membrananker von BOK das Protein vornehmlich zum ER beziehungsweise assoziierten Membranen dirigiert. Des Weiteren scheint BOK dort vornehmlich an Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren (IP3R) gebunden zu sein, was wesentlich zur Stabilität von BOK beiträgt (Carpio *et al.* 2021; Schulman *et al.* 2016). Ob für BOK-induzierte Apoptose BOK in gleicher Weise wie BAX und BAK zu den Mitochondrien transloziert und Poren bildet, ist bislang unklar. Zwar gibt es verschiedene Belege dafür, dass BOK durch Überexpression beziehungsweise Akkumulation Apoptose induzieren kann und die Abwesenheit von BOK Zellen unter bestimmten Umständen vor Apoptose schützt. Der Mechanismus, auf welche Weise die Apoptose-Induktion erfolgt, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Neuste Erkenntnisse nach Carpio *et al.* zeigen beispielsweise, dass BOK durch seine Bindung an IP3R eine wichtige Rolle in der Regulation des mitochondrialen Calcium-Haushaltes einnimmt und somit auf anderem Wege als BAX und BAK die Apoptose-Induktion beeinflusst. Die Arbeitsgruppe von Llambi *et al.* zeigte, dass BOK infolge einer Proteasom-Inhibition akkumuliert und Zelltod induziert (Llambi *et al.* 2016). Das Indiz einer Stabilisation von BOK während der Proteasom-Inhibition deutet auf dessen proteasomalen Abbau hin. Das gleiche Phänomen wird auch für das BH3-*only* Protein NOXA beobachtet. Für NOXA wird in Publikationen bestätigt, dass es proteasomal abgebaut wird und bei Proteasom-Inhibition

stabilisiert wird (Fennell *et al.* 2008). Infolgedessen kann NOXA das anti-apoptotische Protein MCL-1 neutralisieren und Apoptose induzieren (Dutta *et al.* 2010).



**Abbildung 2: Das Interaktions-Netzwerk der BCL-2-Proteine und deren Regulation der äußeren Mitochondrienmembran-Integrität.** Die BH3-only Proteine (PUMA, NOXA, BIM, BAD, BIK, BID) sind durch das alleinige Vorhandensein der BH3-Domäne charakterisiert. Die BH3-only Proteine binden mit ihrer BH3-Domäne in die hydrophobe Furche der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine und neutralisieren deren Wirkung. Die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1, BFL-1/A1) und die pro-apoptotischen Effektorproteine (BAX, BAK, BOK) weisen alle vier BH-Domänen und eine ähnliche globuläre Struktur auf. Die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine antagonisieren die pro-apoptotische Wirkung der BH3-only Proteine und der MDPs BAX, BAK (und BOK), indem sie um die Bindung in der hydrophoben Furche konkurrieren. Freies BAX und BAK (und BOK) können oligomerisieren und bilden Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, was zu deren Permeabilisierung (MOMP), Aktivierung der Caspasen und schlussendlich zur Apoptose führt (mit BioRender.com erstellt).

### 3.4.4.1 Das BH3-only Protein NOXA (*PMAIP1*)

Das BH3-only Protein NOXA wurde ursprünglich als Phorbol-12-Myristat-13-Acetat induzierbares Protein 1 (*PMAIP1*) (Hijikata *et al.* 1990) und später als wichtiges transkriptionelles *Target* von TP53 identifiziert (Oda *et al.* 2000). NOXA ist sowohl über TP53-abhängige als auch TP53-unabhängige Induktion beziehungsweise Stabilisierung in einer Vielzahl von apoptotischen Signalwegen wie bei DNA-Schaden, ER-Stress oder Proteasom-Inhibition involviert (Guikema *et al.* 2017; Ploner *et al.* 2008; Villunger *et al.* 2003). Bei viralen

Infektionen induziert TP53 NOXA, während unter hypoxischen Bedingungen auch eine TP53-unabhängige Induktion von NOXA durch den *hypoxia-inducible factor 1α* (HIF1α) erfolgt (Guikema *et al.* 2017; Kim *et al.* 2004; Ploner *et al.* 2008). Sharma *et al.* verifizierten eine TP53-unabhängige NOXA-Induktion in einem Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (HNSCC - *head and neck squamous cell carcinoma*) mit inaktivem TP53 bei einer Cisplatin-Behandlung. Dabei zeigte sich eine transkriptionelle mRNA-Induktion von *PMAIP1*, dem NOXA-kodierenden Gen, durch die zwei aktivierenden Transkriptionsfaktoren (ATF) *ATF3* und *ATF4*. Die Aktivierung von *ATF3* und *ATF4* im Zuge von zellulärem Stress wie DNA-Schaden durch die Cisplatin-Behandlung führte dazu, dass *ATF3* und *ATF4* an den NOXA-Promotor assoziierten und die Expression von *PMAIP1/NOXA* induzierten (Núñez-Vázquez *et al.* 2021; Sharma *et al.* 2018; Wang *et al.* 2009). Die transkriptionelle Induktion von *PMAIP1* wurde durch Aktinomycin-D (ACM-D) verringert, was auch zur gleichzeitigen Reduktion der NOXA-Expression führte (Arai *et al.* 2020; Núñez-Vázquez *et al.* 2021).

NOXA bindet als BH3-*only* Protein präferentiell an das anti-apoptotische Protein MCL-1, wodurch die anti-apoptotische Wirkung von MCL-1 neutralisiert wird (Chen *et al.* 2005; Huang *et al.* 2019). Verschiedene Publikationen bestätigen, dass an MCL-1 gebundenes NOXA die für den Abbau erforderliche Ubiquitin-Markierung fördert und so den proteasomalen Abbau beider Proteine veranlasst (Djajawi *et al.* 2020; Haschka *et al.* 2020; Pang *et al.* 2014). Die Degradation des NOXA-MCL-1-Komplexes über einen Ubiquitinierungs-abhängigen- oder unabhängigen Weg wird allerdings kontrovers diskutiert. Nakajima *et al.* zeigten, dass bei Expression von NOXA eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz (Perciavalle *et al.* 2012) die Lokalisation ans Mitochondrium und die Transmembrandomäne (TMD) die Verankerung ins Mitochondrium gewährleistet. Über Lysin-Reste wird NOXA ubiquitiniert und rekrutiert MCL-1 ans Mitochondrium. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Interaktion von NOXA mit MCL-1 die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von MCL-1 vermittelt und der am Mitochondrium lokalisierte NOXA-MCL-1-Komplex zum Proteasom transloziert und dort abgebaut wird (Nakajima *et al.* 2014; Pang *et al.* 2014).

Für die Phosphorylierung und Ubiquitinierung des NOXA-MCL-1-Komplexes sind Kinasen und die E3-Ligase MARCH5 verantwortlich (Nakajima *et al.* 2014). Die Forschungsgruppe von Arai *et al.* demonstrierte, dass die E3-Ligase MARCH5 als Ubiquitin-Ligase für das NOXA-bindende MCL-1 agiert und die Degradation des NOXA-MCL-1-Komplexes vermittelt (Arai *et al.* 2020; Djajawi *et al.* 2020; Haschka *et al.* 2020).

Da NOXA proteasomal abgebaut wird, kann eine Proteasom-Inhibition eine NOXA-Stabilisation bewirken (Fennell *et al.* 2008). Des Weiteren werden bei Akkumulation missgefalteter und nicht-funktionaler Proteine zelluläre Stress-Antworten eingeleitet. Eine solche zelluläre Stress-Antwort wurde bei Proteasom-Inhibition mittels Bortezomib (BTZ)

festgestellt. Guikema *et al.* postulierten, dass bei Proteasom-Inhibition mittels BTZ der Hauptweg zur NOXA-Induktion ebenfalls über zellulären Stress, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress, über PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*)/(P)-eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* )/ATF4 abläuft (Chen *et al.* 2011; Guikema *et al.* 2017). Die Akkumulation missgefalteter und nicht-funktionaler Proteine aktiviert bei Proteasom-Inhibition die unterschiedlichen zellulären Stress-Antwort-Signalwege: i) das ER-Lumen veranlasst die Reaktion auf die *unfolded protein response* (UPR) und ii) das Zytosol regt die *heat shock response* an (HSR) während iii) die *integrated stress response* (ISR) auf beide zelluläre Stress-Signalwege reagiert. Die UPR ist eine komplexe Reaktion der Zelle als Antwort auf Stress durch die Ansammlung von fehlerhaften oder nicht funktionalen Proteinen im ER. Dabei werden selektiv Translationsprozesse unterdrückt, falsch gefaltete Proteine abgebaut und Signalwege zur verstärkten Synthese von Chaperonen, die für eine korrekte Proteinfaltung verantwortlich sind, aktiviert. Die HSR wird nicht nur bei Hitzeschock in Zellen aktiviert, sondern tritt auch bei physikalischen oder biochemischen Stressbedingungen wie einer UV-Strahlung oder der Behandlung von Zellen mit Stoffwechsellinhibitoren auf. Hierbei wird die verstärkte Expression von Hitzeschock-Genen ausgelöst, die ebenfalls zur Expression von Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren führen. Die Hitzeschock-Proteine bauen fehlgefaltete Proteine ab, um den zellulären Stress zu eliminieren.

### 3.4.5 Die integrierte Stress-Antwort (ISR)

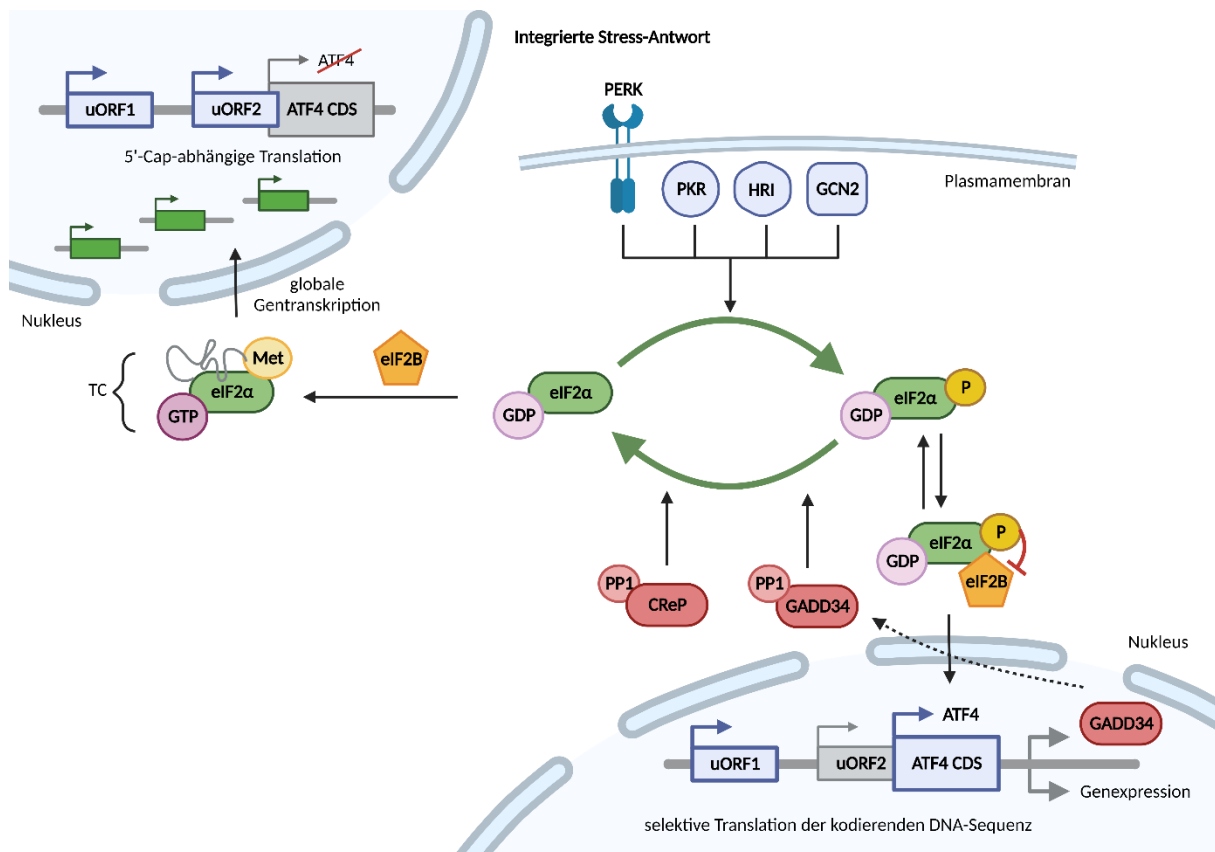
Die ISR bündelt verschiedene zelluläre Ereignisse, zum Beispiel virale Infektionen, Aminosäuren- oder Häm-Mängel oder auch ER-Stress, die in zwei wichtigen Mechanismen resultieren. Zum einen wird i) die globale Proteinsynthese reduziert und zum anderen wird ii) die Übersetzung spezifischer mRNAs oder *open reading frames* (ORFs) von alternativen Startcodons in Gang gesetzt. Eine verstärkte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ist das Indiz für den ersten Mechanismus, wohingegen die Induktion der ATF4-Translation der Nachweis des zweiten Mechanismus ist (Costa-Mattioli und Walter 2020; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016). Unter stressfreien Bedingungen wird ein ternärer Komplex (*ternary complex* - TC) aus eIF2, Guanosintriphosphat (GTP) und Methyl-tRNA (Transfer-Ribonukleinsäure) am 40S-Ribosom gebildet, der die 5'-Cap-abhängige Translation der globalen Proteinsynthese gewährleistet (Abbildung 3 links oben). Nach Beendigung der Translation dissoziiert der TC vom 40S-Ribosom und der Austausch von Guanosidiphosphat (GDP) zu GTP wird durch den eIF2B-Komplex katalysiert. Dadurch kann eine neue Initiation der mRNA-Translation beginnen.

Unter Stress-Bedingungen wird je nach Stress-Stimulus eine der vier eIF2 $\alpha$ -Kinasen Proteinkinase R (PKR), HRI (EIF2AK1 - *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1*), GCN2 (*general control nonderepressible 2*) oder PERK aktiviert. Durch

Konformationsänderungen im Zuge der Phosphorylierung kann (P)-eIF2 $\alpha$  in der katalytischen Domäne des eIF2B-Komplexes binden. (P)-eIF2 $\alpha$  fungiert dabei als nicht-kompetitiver Inhibitor und senkt das Level an TCs. Dies hat zur Folge, dass eine selektive Translation kodierender DNA-Sequenzen stattfindet. Am Beispiel von ATF4 wird dann nicht mehr wie unter Normal-Bedingungen der uORF1- (*upstream* ORF) und uORF2-Leserahmen abgelesen, sondern nur noch der uORF1 und direkt im Anschluss die ATF4 CDS (*coding DNA sequence*) (Abbildung 3 unten rechts). Dadurch kann bei gleichzeitiger Verlangsamung der globalen Proteinsynthese das Level an spezifisch translatierter mRNAs und die Synthese von ATF4 signifikant erhöht werden (Costa-Mattioli und Walter 2020; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016).

Die Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  wird entweder durch die konstitutiv exprimierte CReP-Phosphatase (*constitutive repressor of eIF2 $\alpha$  phosphorylation*) oder durch die *Downstream* von eIF2 $\alpha$  und ATF4 induzierte GADD34-Phosphatase (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*) bewerkstelligt. Unter Stress-Bedingungen wird die mRNA von GADD34 durch ATF4 transkriptionell induziert, die GADD34-Proteinkonzentration in der Zelle damit erhöht und die Dephosphorylierung von (P)-eIF2 $\alpha$  mittels GADD34 vorangetrieben. Diese Rückkopplungsschleife von GADD34 antagonisiert die relative Stärke der ISR-Aktivierung und erlaubt der Zelle die Beseitigung der verlangsamten globalen Proteinsynthese, wodurch die ISR beendet wird (Jousse *et al.* 2003; Novoa *et al.* 2001; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016). Die Effektivität der ISR hängt nicht nur von der Art des Stress-Signals ab, sondern auch von der Dauer und Stärke, aber auch dem Ausmaß der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und der Translation von ATF4 (Dey *et al.* 2010; Guan *et al.* 2014; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016). Wenn der zelluläre Stress nicht durch den Abbau an (P)-eIF2 $\alpha$  mittels GADD34 neutralisiert werden kann, hält die verlangsamte globale Proteinsynthese an und durch die Translation spezifischer mRNAs wie ATF4 vermittelt induziertes ATF4 die Apoptose (Costa-Mattioli und Walter 2020).





**Abbildung 3: Integrierte Stress-Antwort (ISR - *integrated stress response*).** Unter stressfreien Bedingungen wird ein TC (*ternary complex*) aus eIF2, GTP und Methyl-tRNA am 40S-Ribosom gebildet, der die 5'-Cap-abhängige Translation der globalen Proteinsynthese gewährleistet (linke Seite). Nach der Translation dissoziiert der TC vom 40S-Ribosom und der eIF2B-Komplex katalysiert den Austausch von GDP zu GTP. Bei zellulärem Stress phosphorylieren die eIF2α-Kinasen eIF2α (rechte Seite). (P)-eIF2α inhibiert nicht-kompetitiv den eIF2B-Komplex und senkt das Level an TC. Dies hat zur Folge, dass eine selektive Translation alternativer Leserahmen wie im Beispiel von ATF4 stattfindet. Die Dephosphorylierung von eIF2α erfolgt durch die konstitutiv exprimierte CREP-Phosphatase (*constitutive repressor of eIF2α phosphorylation*) oder die *Downstream* von eIF2α und ATF4 induzierte GADD34-Phosphatase (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*) und beendet die ISR (mit BioRender.com erstellt).

Die Aktivierung der Stress-Kinasen kann auch Therapieziel sein, um den Effekt der integrierten Stress-Antwort auszunutzen. Zum Beispiel führt die Behandlung mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Erlotinib in metastatischem Prostata-Krebs zur Aktivierung der integrierten Stress-Antwort. Die aktivierten Kinasen PERK und GCN2 phosphorylieren eIF2α und bewirken so gesteigerte ATF4 Translation (Arai *et al.* 2020). Auch eine Behandlung mit 5-Azacidin in Kombination mit ABT-199 zeigte in chronischer oder akuter myeloider Leukämie die Aktivierung der ISR. Die Induktion von ATF4 mit einhergehendem steigendem Proteinlevel an ATF4 führte zu erhöhtem (P)-eIF2α-Level, was die Aktivierung der ISR bestätigte (Jin *et al.* 2020). Auch das synthetisch hergestellte Fluorizolin induzierte die transkriptionelle NOXA-

Aktivierung über die ISR. Auch hier führte die Induktion von ATF3 und ATF4 und deren Bindung am *PMAIP1*-Promotor zur NOXA-Induktion (Núñez-Vázquez *et al.* 2021).

Der Wirkstoff Eeyarestatin I, ein Inhibitor des ER-assoziierten Proteinabbaus (ERAD), aktiviert wie BTZ die NOXA-Induktion über die integrierte Stress-Antwort am ER in den MCL-Zelllinien HBL-2 und JEKO-1. Wang *et al.* postulierten, dass die NOXA-Induktion über den Signalweg PERK/(P)-eIF2 $\alpha$ /ATF3&ATF4 erfolgt, wobei anschließend durch erhöhte NOXA-Expression eine NOXA-vermittelte Apoptose-Induktion eintrat (Wang *et al.* 2009).

Die ISR kann mit dem spezifischen Inhibitor ISRIB (*integrated stress response inhibitor*) abgeschwächt werden, was sowohl von der Arbeitsgruppe Arai *et al.* als auch von Jin *et al.* bestätigt wurde. Durch Zugabe von ISRIB wird gesteigertes (P)-eIF2 $\alpha$  wieder reduziert, wodurch die Translation von ATF4 eingestellt wird und die NOXA-Induktion sinkt (Arai *et al.* 2020; Jin *et al.* 2020; Palam *et al.* 2015).

### 3.5 Neue Generation der Krebs-Therapie

Der Fokus einer neuen Generation von Anti-Krebs-Medikamenten liegt auf Apoptose induzierenden Therapeutika. Die Aktivierung des BCL-2 Netzwerks löst Apoptose in Krebszellen aus. In Sarkomen ist die Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2 oder MCL-1 beschrieben; das resultierende Ungleichgewicht der Interaktionen zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen verhindert den programmierten Zelltod (Demicco *et al.* 2012; Wuillème-Toumi *et al.* 2005).

Da die Überexpression anti-apoptotischer Proteine oftmals mit Therapie-Versagen assoziiert ist, könnten BCL-2-Inhibitoren/BH3-Mimetika, die spezifisch auf Mechanismen zur Hemmung der Apoptose abzielen, eine neue Behandlungsstrategie darstellen.

Oftmals ermöglicht die Redundanz unterschiedlicher Signalwege durch Regulation kompensatorischer Signalwege in Krebszellen Resistenzentwicklung gegenüber Monotherapien (Dent *et al.* 2009). Die Einzeltherapie stösst somit an ihre Grenzen und Kombinationstherapien gewinnen immer mehr an Bedeutung. Vielversprechend sind Kombinationen, die aus zwei oder sogar mehr Medikamenten bestehen und synergistisch wirken, um beispielsweise Zelltod-Induktion in Krebszellen auszulösen (Muenchow *et al.* 2020). Bei einer synergistischen Wirkung wird die Wirkung der beiden einzelnen Medikamente verstärkt, wobei die Wirkung der kombinierten Medikamente größer ist als die Summe der einzelnen Wirkungen. Ein Vorteil ist, dass die gewünschte Wirkung, wie der induzierte Zelltod, bereits bei niedrigerer Dosis als bei einer Monotherapie erreicht wird. Häufig werden Kombinationstherapien eingesetzt, die den gleichen Signalweg angreifen oder parallele Signalwege beeinträchtigen. Eine solche Kombinationstherapie ist zum Beispiel die hier

beschriebene Nutzung eines BH3-Mimetikums bei gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms. Dadurch wird zum einen die Interaktion der BCL-2-Proteine in der Zelle durch das BH3-Mimetikum ABT-199 beeinflusst, zum anderen wird durch die gleichzeitige Inhibition des Proteasoms mittels BTZ die zelluläre Stresssituation verstärkt (Muenchow *et al.* 2020; Yin *et al.* 2014).

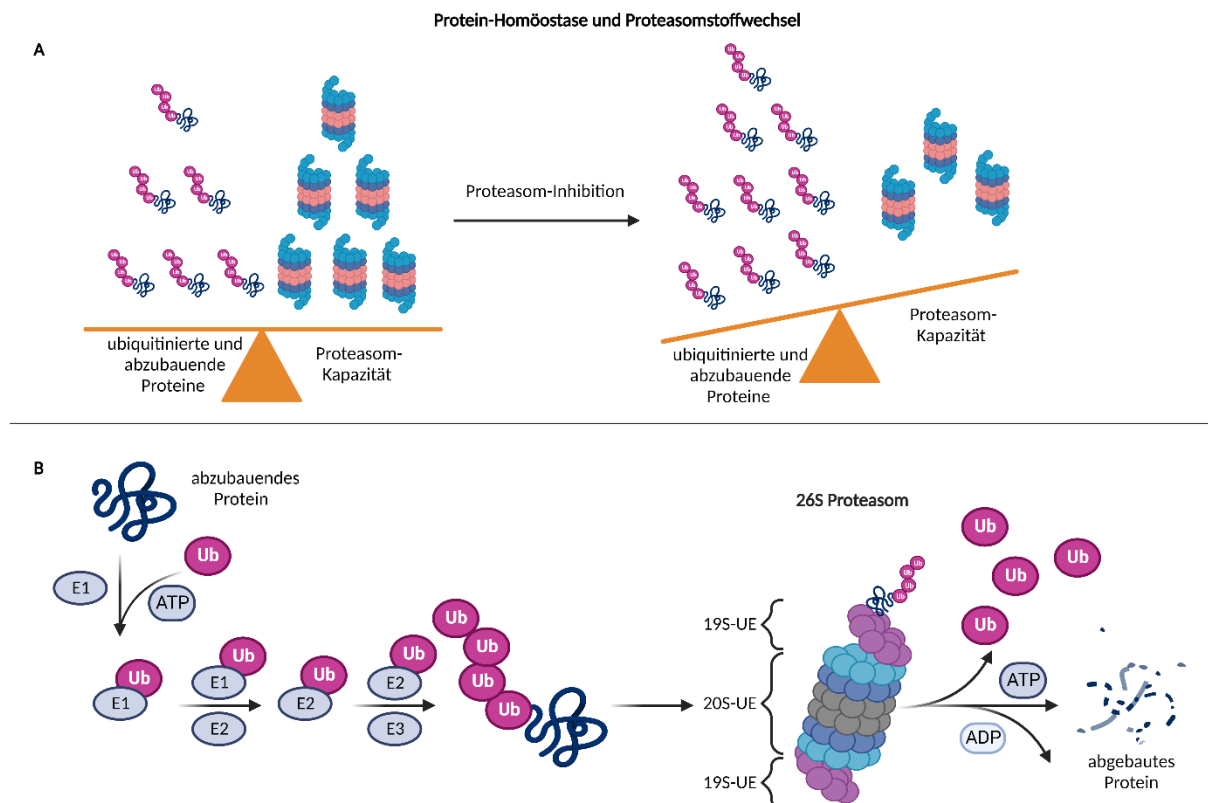
### 3.5.1 BH3-Mimetika in der Krebstherapie

Die sogenannten BCL-2-Inhibitoren/BH3-Mimetika, eine neuartige Klasse niedermolekularer Wirkstoffe, wurden entwickelt, um spezifisch anti-apoptotische Proteine zu blockieren (Roberts und Huang 2017; Taylor *et al.* 2011). BH3-Mimetika wirken wie BH3-*only* Proteine, indem sie die hydrophobe Furche der anti-apoptotischen Proteine besetzen. Dadurch wird die Bindung der pro-apoptotischen BH3-*only*- oder Effektorproteine (BAX, BAK und BOK) verhindert (Nakajima und Tanaka 2016). Das als erstes entwickelte und von der FDA zugelassene BH3-Mimetikum ABT-737 bindet primär an BCL-2 und BCL-xL (Lee *et al.* 2007). In dem Bestreben, die Probleme mit der Bioverfügbarkeit und Löslichkeit von ABT-737 zu überwinden, wurde das oral verabreichte Navitoclax (ABT-263) entwickelt (Tse *et al.* 2008). ABT-263 zeigte jedoch starke Nebenwirkungen wie Thrombocytopenie durch Blockierung von BCL-xL (Vogler *et al.* 2011). Daraufhin wurde ABT-199 entwickelt, das eine 100-fach bessere Affinität zu BCL-2 als zu BCL-xL aufweist (Davids und Letai 2013; Townsend *et al.* 2021). ABT-199 wird in hämatopoetischen Malignomen wie MM, sowie bei AML und CML verwendet, die häufig BCL-2 überexprimieren. ABT-199 hat sich hierbei als wirksam zur erfolgreichen Apoptose-Induktion erwiesen (DiNardo *et al.* 2019; Roberts *et al.* 2016). Des Weiteren zeigte ABT-199 als Einzelwirkstoff in vorklinischen Modellen ermutigende Ergebnisse bei der Behandlung von ALL (Diaz-Flores *et al.* 2019), beim HNSCC (Guy *et al.* 2021) und Neuroblastomen (Bate-Eya *et al.* 2016). Allerdings induzierte eine ABT-199-Monotherapie in nicht-hämatopoetischen Erkrankungen wie den Weichteilsarkomen keine Apoptose (Barrott *et al.* 2017). ABT-199 zeigt zumeist häufig beim MM mit hoher BCL-2-Expression relativ zur BCL-xL- und MCL-1-Expression eine bessere Wirkung. Oftmals entsteht eine MCL-1-Überexpression als erworbene Resistenz gegenüber ABT-199 (Wuillème-Toumi *et al.* 2005). Deshalb wird bei Versagen einer ABT-199-Monotherapie als Alternative auf eine Medikamenten-Kombination von ABT-199 mit einem spezifischen MCL-1-Inhibitor zurückgegriffen (Algarín *et al.* 2020). Inzwischen laufen mehrere Studien für MCL-1-spezifische BH3-Mimetika, unter anderem A-1210477 (Leverson *et al.* 2015), S63845 (Kotschy *et al.* 2016) oder AMG-397 (Caenepeel *et al.* 2020). Für den MCL-1-Inhibitor S63845 wurde erst kürzlich ein Synergismus mit ABT-199 in Synovialsarkomen beschrieben (Fairchild *et al.* 2020). Eine weitere Publikation beschreibt eine BCL-2-unabhängige Wirkung von ABT-199 auf den zellulären Metabolismus (Roca-Portoles *et al.* 2020). Roca-Portoles und seine Arbeitsgruppe postulierten, dass ABT-199 unabhängig von seiner eigentlichen Funktion der BCL-2-Inhibition zu einer Dysbalance im

mitochondrialen Metabolismus führt. Die durch ABT-199 hervorgerufene Reduktion der Komplex I/II-Aktivität der Elektronentransportkette (ETC) stört das Gleichgewicht des mitochondrialen Metabolismus, der Effekt wird *mitochondrial metabolic reprogramming* genannt. Durch die Dysbalance in der ETC wird die ISR aktiviert und durch gesteigerte Expression von *ATF3&ATF4* eine *PMAIP1/NOXA*-abhängige Apoptose-Induktion erreicht (Roca-Portoles *et al.* 2020; Sharon *et al.* 2019). Durch diesen *Off-Target*-Effekt von ABT-199 können auch erworbene Resistenzen gegenüber ABT-199, wie es bei rezidierten MM der Fall sein kann, überwunden werden. Bajpai *et al.* zeigten eine Sensitivierung von resistenten MM für ABT-199 durch Inhibition der ETC Komplexe I oder II, wodurch über ATF4-Induktion die NOXA-vermittelte Apoptose erreicht werden konnte (Bajpai *et al.* 2020).

### 3.5.2 Proteasom-Inhibition in der Krebstherapie

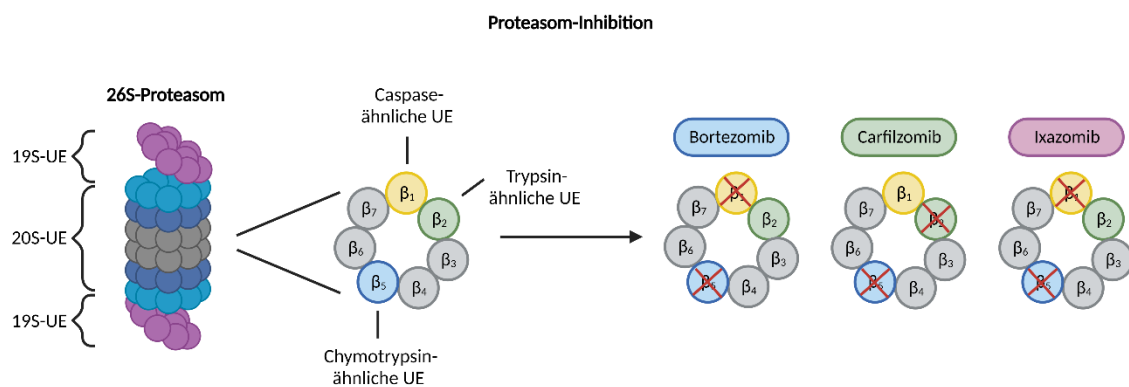
Die Proteasom-Inhibition stellt eine weitere Option in der Krebstherapie dar, indem die Proteindegradierung über das Proteasom blockiert wird. Proteasome sind maßgeblich an der zellulären Homöostase beteiligt; sie bauen die durch Ubiquitinierung für den Abbau markierten Proteine proteolytisch ab. Das Proteasom ist ein ubiquitärer multikatalytischer Protease-Komplex und fungiert als Antagonist der Proteinbiosynthese (Orlowski und Michaud 1989). Durch die Proteasom-Inhibition akkumulieren nicht-gefaltete oder miss-gefaltete Proteine im Cytosol und stören die Protein-Homöostase. Dadurch wird die ISR aktiviert (siehe Kapitel 3.4.5), die schlussendlich zur Apoptose führt (Abbildung 4 A) (Manasanch und Orlowski 2017). Das Proteasom besteht aus einer katalytischen 20S-Kerneinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten (UE) (Abbildung 4 B). Überflüssige oder miss-gefaltete Proteine werden durch Kopplung von Ubiquitin in einem dreistufigen Prozess mit Hilfe von drei verschiedenen Ubiquitin-Protein-Ligasen E1, E2 und E3 für den proteasomalen Abbau markiert. Dabei katalysiert in einem ersten Schritt die E1-Ubiquitin-Protein-Ligase unter ATP-Verbrauch die Bindung eines Ubiquitins an dessen Oberfläche. Im zweiten Schritt wird das Ubiquitin auf die E2-Ubiquitin-Protein-Ligase übertragen, während im letzten Schritt die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase die Übertragung des Ubiquitins auf die Oberfläche des zu markierenden Proteins katalysiert (Abbildung 4 B). Um das Protein zum proteasomalen Abbau zu markieren, muss eine Polyubiquitinierung stattfinden (Lecker *et al.* 2006; Pickart und Eddins 2004). Nach Markierung des Zielproteins wird es von der 19S-UE erkannt und unter Verbrauch von ATP entfaltet. Anschließend erfolgt die Deubiquitinierung und Translokation in den Kern der 20S-UE. Hier wird das Protein proteolytisch abgebaut, indem die  $\beta_1$ -UE mit Caspase-ähnlicher Aktivität, die  $\beta_2$ -UE mit Trypsin-ähnlicher Aktivität oder die  $\beta_5$ -UE mit Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität die Peptidbindungen spezifisch schneidet.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Protein-Homöostase und des Proteasomstoffwechsels.** **A** Unter normalen Bedingungen hält die Zelle ein Gleichgewicht zwischen ubiquitinierten und abzubauenden Proteinen auf der einen Seite und der Proteasom-Kapazität auf der anderen Seite aufrecht. Proteasom-Inhibition beeinträchtigt die Kapazität und stört diese Balance, was zu proteotoxischem Stress und zur Aktivierung von Apoptose-Signalwegen führt (Manasanch und Orłowski 2017). **B** Nicht-funktionale oder miss-gefaltete Proteine werden mit Hilfe der Enzyme E1, E2 und E3 polyubiquitiniert und dadurch für den proteasomalen Abbau markiert. Nach Erkennung des Zielproteins durch die regulatorische 19S-UE wird das Protein unter Energieverbrauch entfaltet. Nach Deubiquitinierung wird das Protein in die katalytische 20S-UE transloziert und proteolytisch abgebaut (Lecker *et al.* 2006; Pickart und Eddins 2004), mit BioRender.com erstellt).

Der Proteasom-Inhibitor (PI) BTZ ist für die Therapie von MM und speziell bei MCL ein wirksames und effizientes Medikament (Manasanch und Orłowski 2017; Richardson *et al.* 2003). Klinisch verwendete PIs wie Carfilzomib (CFZ), Ixazomib (IXZ) oder Marizomib (MAZ) unterscheiden sich in ihrer Pharmakokinetik, der Spezifität und Affinität gegenüber der katalytisch aktiven UE des Proteasoms. Alle genannten PIs blockieren die Aktivität der  $\beta_5$ -UE. Dabei ist die Bindung von BTZ und IXZ reversibel, während im Gegensatz dazu CFZ irreversibel bindet. BTZ und IXZ hemmen zusätzlich die  $\beta_1$ -UE reversibel, während CFZ die  $\beta_2$ -UE irreversibel hemmt (Besse *et al.* 2019) (Abbildung 5). BTZ zeigt eine apoptotische Wirkung bei verschiedenen Tumor-Entitäten wie Lungenkarzinom (Adams *et al.* 1999), Mammakarzinom (Adams *et al.* 1999) und auch Osteosarkomen (Shapovalov *et al.* 2010). In

einer Phase 2 Studie konnte jedoch nur eine geringe Wirkung von BTZ bei fortgeschrittenen Sarkomen (NCT00027719) (Maki *et al.* 2005) festgestellt werden; bei Kombination mit Vorinostat wurde kein Therapie-Ansprechen bei fortgeschrittenen Sarkomen erzielt (NCT00937495) (Attia *et al.* 2011). Allerdings zeigte die Kombination von ABT-199 mit BTZ und Dexamethason eine vielversprechende Effizienz bei Patienten mit refraktärem MM in klinischen Studien der Phase 1b und III (Kumar *et al.* 2020; Moreau *et al.* 2017). Eine synergistische Wirkung von BTZ in Kombination mit ABT-199 in STS-Zelllinien wurde zudem erst kürzlich in Vorarbeiten beschrieben (Muenchow *et al.* 2020). Ebenso wurde die PI-vermittelte Akkumulation des BH3-*only* Proteins NOXA beobachtet, die zuvor bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen bei Proteasom-Inhibition mit BTZ in Melanom- oder Myelom-Zellen, CLL oder in MCL-Zellen beschrieben wurde (Llambi *et al.* 2016; Muenchow *et al.* 2020; Baou *et al.* 2010; Pérez-Galán *et al.* 2006; Qin *et al.* 2006).



**Abbildung 5: Struktur des 26S Proteasoms und Angriffspunkte von Inhibitoren.** Die katalytische 20S-UE kann mittels der sechs (2x3) proteolytisch aktiven UE  $\beta_1$  (Caspase-ähnliche UE),  $\beta_2$  (Trypsin-ähnliche UE) und  $\beta_5$  (Chymotrypsin-ähnliche UE) zum Abbau markierte Proteine spalten. Die PIs inhibieren spezifisch diese proteolytisch aktiven UE. BTZ und IXZ hemmen  $\beta_1$  und  $\beta_5$ , während CFZ  $\beta_2$  und  $\beta_5$  inhibiert ((Besse *et al.* 2019), mit BioRender.com erstellt).

## 4. Zielsetzung

Die meisten Neoplasien, darunter auch Sarkome, werden je nach Schweregrad mit multimodalen Therapiekonzepten behandelt. Trotz der fortlaufenden Entwicklungen in der Krebstherapie bleiben Sarkome aufgrund ihrer genetischen Heterogenität noch immer schwierig zu therapieren (Krebs - Das ZfKD 2023). Fortgeschrittene Sarkome sind nach wie vor mit einer schlechten Prognose assoziiert und die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt noch immer maximal 50% (Weitz *et al.* 2003). Kombinationstherapien haben sich als effektiver als die entsprechende Einzeltherapie gezeigt, wie auch aktuelle Studien (Kapitel 3.2.2) bestätigen (Dent *et al.* 2009). Als vielversprechend haben sich hierbei Apoptose induzierende Therapieansätze erwiesen, die aus zwei oder mehr synergistisch wirkenden Medikamenten bestehen, um beispielsweise Zelltod-Induktion in Krebszellen auszulösen. Erst kürzlich zeigten eigene Vorarbeiten, dass das BH3-Mimetikum ABT-199 in Kombination mit dem PI BTZ in STS-abstammenden Zellen und Zelllinien synergistisch wirkt (Muenchow *et al.* 2020).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, relevante Schüsselmoleküle für die synergistische Apoptose-Induktion durch die Kombination aus ABT-199&BTZ in STS-Zelllinien zu identifizieren. Hierfür wurden mittels CRISPR/Cas9-Technologie *Knock-Out*-Zelllinien der Effektor-Proteine generiert und der Einfluss auf die ABT-199&BTZ-vermittelte Apoptose-Induktion analysiert.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die beobachtete NOXA-Expression bei ABT-199&BTZ-vermittelter Zelltod-Induktion detailliert untersucht. Das BH3-*only* Protein spielt in dem Kontext der ABT-199&BTZ-vermittelten Apoptose-Induktion eine essentielle Rolle und neutralisiert bei mitochondrialer intrinsischer Apoptose-Induktion präferentiell das anti-apoptotische Protein MCL-1 (Chen *et al.* 2005; Huang *et al.* 2019; Muenchow *et al.* 2020). Aufgrund dessen sollte die Frage beantwortet werden, welche Relevanz NOXA bei dem synergistisch induzierten Zelltod spielt und wie die festgestellte verstärkte Expression von NOXA bei ABT-199&BTZ induziertem Zelltod reguliert wird.

MCL-1-Inhibitoren werden bisher nur in klinischen Studien eingesetzt. Daher könnte die Proteasom-Inhibition mit zugelassenen Medikamenten eine interessante Alternative für die klinische Anwendung darstellen. In dieser Arbeit wurde die beschriebene Kombination aus ABT-199 und BTZ auf weitere klinisch relevante PIs ausgeweitet, um die Frage zu beantworten, ob die ABT-199&BTZ-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion spezifisch für BTZ ist oder allgemein durch Proteasom-Inhibition verursacht wird. Hierfür wurden die PIs CFZ und IXZ als eine attraktive Alternative zu BTZ hinzugezogen, da beide Inhibitoren bereits in klinischer Anwendung sind.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Bakterienkultur

#### 5.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der *E. coli*-Bakterien erfolgte als Flüssigkultur in Luria-Bertani-Medium (LB) oder auf LB-Agarplatten. Der Stamm HB101 (Stbl3) wurde bei 37 °C aerob kultiviert (Tabelle 1). Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben unter konstantem Schütteln (170 rpm) bei 37 °C inkubiert. Plasmid-tragende Bakterien wurden in Anwesenheit von 100 µg/mL Ampicillin kultiviert.

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Organismus	Genotyp	Herkunft
HB101 (Stbl3)	<i>Escherichia coli</i>	F <sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) recA13 supE44 ara-14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Str <sup>R</sup> ) xyl-5 λ <sup>-</sup> leu mtl-1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

#### LB-Medium

Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid (NaCl)	10 g
Peptone	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L

#### LB-Platten

Agarose (1.5% w/v)	15 g
Hefeextrakt	5 g
Peptone	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L

Agarose (1.5% w/v)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Peptone	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

#### 5.1.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Vervielfältigung wurden 10 pg – 100 ng der gewünschten Plasmid-DNA (Tabelle 5) in 50 µL chemisch kompetente Stbl3-Bakterien (Tabelle 5) eingebracht. Die Bakterien wurden mit der Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Dann wurden die Proben erneut für 2 min auf Eis gestellt und 250 µL SOC-Medium hinzugegeben. Nach einer Stunde Schütteln bei 225 rpm und 37 °C wurden 10% und



90% der Bakterienlösung auf Selektionsplatten (100 µg/mL Ampicillin) ausplattiert und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

---

SOC Medium

Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

---

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit durchgeführt, um größere Mengen und eine höhere Reinheit der DNA zu erhalten. Es wurden hierfür 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und für 8 h bei 37 °C und 170 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde eine Übernachtskultur mit 100 mL LB-Medium mit 200 µL Starter-Kultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Nach Pelletierung der Bakterienkultur (6000 xg, 5 min, RT) wurde nach dem Protokoll für *High-copy* Plasmid-Isolation verfahren, wobei anstelle der Zentrifugationsschritte nach der Isopropanol-Fällung die Plasmid-DNA mittels des NucleoBond Finalizer´s konzentriert wurde. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert.

---

NucleoBond Xtra Midi Kit  
Nuklease-freies Wasser

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, DE  
QIAGEN GmbH, Hilden, DE

---

### 5.2.2 DNA/RNA Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren wurde ein Spektralphotometer verwendet (NanoDrop 2000c). Die Messung erfolgte im ultravioletten Spektralbereich bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm.

---

NanoDrop 2000c Spectrophotometer

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE

---

### 5.2.3 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide zur Überprüfung der insertierten *single-guide* RNAs (sgRNAs) erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma Microsynth AG (Balgach, CH). Die hierfür benötigten Oligonukleotide wurden durch die Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, DE) synthetisiert (Tabelle 2). Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mittels der *ApE* Software.

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide**

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub>	Verwendung
5	pLenti_seq_rev_EF1a	CAGTACACGACATCACTTTC	56 °C	Sequenzierung
6	pLenti_seq_for_LKO.1	GACTATCATATGCTTACCGT	54 °C	Sequenzierung

*ApE, A plasmid Editor*

M. Wayne Davis, University of Utah, San José, US

## 5.3 Zellkultur

### 5.3.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Zelllinien wurden zur Untersuchung des allgemeinen ABT-199&PI-vermittelten Synergismus als auch zur Klärung des Regulations-Mechanismus der beobachteten NOXA-Induktion herangezogen.

Die bereits etablierten HCT116-*Knock-Out*-Zelllinien wurden mit pLentiCRISPRv2 und entsprechender sgRNA für BAX, BAK oder BOK generiert. HCT116<sup>DKO\_empty</sup> enthält pLentiCRISPRv2 und eine CTRL-sgRNA. HCT116<sup>TKO</sup> enthält den DKO von BAX und BAK und pLentiCRISPRv2 mit sgBOK.

**Tabelle 3: Verwendete und generierte Säugerzelllinien**

Zelllinie	Ursprung	TP53-Status	Medium	Herkunft
A549	Bronchialkarzinom	wt	suppl. RPMI 1640	ATCC CCL-185
H1299/WT	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	deletiert	suppl. RPMI 1640	ATCC CRL-580
H1299/TP53	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	wt	suppl. RPMI 1640	zur Verfügung gestellt von AG Aulitzky
HCT116/WT	Kolorektales Karzinom	wt	suppl. McCoy's 5A	ATCC CCL-247
HCT116 <sup>BAX_KO</sup>	Kolorektales Karzinom	wt	suppl. McCoy's 5A	Bert Vogelstein (Baltimore, MD, USA) (Zhang <i>et al.</i> 2000)
HCT116 <sup>DKO</sup>	Kolorektales Karzinom	wt	suppl. McCoy's 5A	Wang und Youle (2012)
HCT116 <sup>BAK_KO</sup>	Kolorektales Karzinom	wt	suppl. McCoy's 5A	Gillissen <i>et al</i> (2010)

HCT116 <sup>BOK<sup>KO</sup></sup> , HCT116 <sup>DKO<sup>empty</sup></sup> und HCT116 <sup>TKO</sup>	Kolorektales Karzinom	wt	suppl. McCoy's 5A	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Kaufmann (Universität Bern, Institut für Pharmakologie, AT)
HEK293 FT	Humane, embryonale immortalisierte Nierenzellen	wt	suppl. RPMI 1640	R70007 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
MCF-7	Mamma-Karzinom	wt	suppl. RPMI 1640	ATCC HTB-2
MCF-7.3.28	Mamma-Karzinom	wt	suppl. RPMI 1640	(Jänicke <i>et al.</i> 1998)
MCF-10A	Mamma-Karzinom	wt	Suppl. DMEM/F-12	ATCC CRL-10317
MDA-MB-157	Mamma-Karzinom	mutiert <sup>neg</sup>	suppl. RPMI 1640	ATCC HTB-24
NTERA2/D1	Embryonales Hodenkarzinom	wt	suppl. RPMI 1640	LGC Standards
OV3	Ovarialkarzinom	mutiert	suppl. RPMI 1640	ATCC HTB-161
OV4	Ovarialkarzinom	mutiert	suppl. RPMI 1640	ATCC NCI-60
OV8	Ovarialkarzinom	deletiert	suppl. RPMI 1640	ATCC NCI-60
RD	Rhabdomyo- Sarkom (quergestreifter Muskel)	mutiert	suppl. DMEM	ATCC CCL-136
SK-LMS	Leiomyosarkom (Vulva)	mutiert	suppl. DMEM	ATCC HTB-88
SW982/WT	Synovialsarkom (Synovialis)	wt	suppl. DMEM	ATCC HTB-93
KO-Linien BAX <sup>KO</sup> , BAK <sup>KO</sup> und BOK <sup>KO</sup>	Synovialsarkom (Synovialis)	wt	suppl. DMEM	in dieser Arbeit generiert

### 5.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte unter S1/S2-Laborrichtlinien, wobei stets unter der Sterilbank gearbeitet wurde. Die Kultivierung erfolgte je nach Zelllinie in DMEM, DMEM/F-12, RPMI 1640 oder McCoy's 5A Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 29 mL AddR-Lösung (suppl. Medium). Die adhärennten Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Plasma behandelte Oberfläche bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> und feuchter Atmosphäre inkubiert.

Alle 2-3 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen durch Absaugen des Mediums, zweimaligem Waschen in 1x PBS und dem Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat). Nach Zentrifugation (340 xg, 5 min, RT) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

<b>AddR-Lösung</b>	
L- Asparagin	0,13 mM
HEPES-Puffer	0,17 M
L-Glutamin-Lösung	5,8% (% v/v)
Natriumpyruvat-Lösung	5,8% (% v/v)
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	10% (% v/v)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	5,8% (% v/v)
β-Mercaptoethanol-Lösung	5,8% (% v/v)

<b>Supplementiertes Medium (1x)</b>	
AddR-Lösung	17,24% (% v/v)
FCS	1% (% v/v)
in DMEM [+4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES]; DMEM/F12 1:1 Mix [+2,5 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 1,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM Na-Pyruvat]; McCoy's 5A [+25 mM HEPES]; RPMI-1640	

DMEM (1x) [+4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES]	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
DMEM/F-12 1:1 Mix [+2,5 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 1,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM Na-Pyruvat]	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
hEGF	PeproTech GmbH, Hamburg, DE
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
L-Asparagin Monohydrat	Biochrom AG, Berlin, DE
L-Glutamin-Lösung	Biochrom AG, Berlin, DE
McCoy's 5A (1x) [+25 mM HEPES]	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin, DE
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 (1x)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Trypsin-EDTA (0,05%)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

### 5.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,4%) verdünnt und mittels eines automatisierten Zellzählers (EVE *Automatic cell counter*) die Zahl vitaler Zellen bestimmt.

Automatisierter Zellzähler EVE <i>Automatic cell counter</i> NanoEnTek	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
EVE <i>Cell counting slide</i> NanoEnTek	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Trypanblau-Lösung (0,4%)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

### 5.3.4 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 mL Einfriermedium (FCS + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen und in einer Einfrierbox über Nacht bei  $-80$  °C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Kryo-Röhrchen (1,8 mL <i>CryoPure</i> Gefäße)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

### 5.3.5 Auftauen eukaryotischer Zellen

Nach etwa 20 Passagen wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien durch kryokonservierte Zelllinien ersetzt. Zum Auftauen eukaryotischer Zellen wurde ein Kryoröhrchen mit konservierten Zellen im Wasserbad 1 – 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 9 mL supplementiertem Medium aufgenommen und bei 340 xg für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL supplementiertem Medium resuspendiert, mit weiteren 11 mL frischem Medium verdünnt und die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt.

### 5.3.6 Transfektion von Plasmid-DNA

Für die Untersuchung des Einflusses des BH3-Mimetikums ABT-199 auf die transgene NOXA-Expression wurden Zellen mit einem Plasmid zur Expression von NOXA transfiziert.

Für die Transfektion wurden  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen pro 6-Well ausgesät und unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 µg des pHV Ad2 TRE-Puro myc NOXA-Plasmids und 0,5 µg des pTET-OFF-Plasmids mit Hilfe des Polyethylenimin-Transfektionsreagenz (PEI) im Verhältnis 1:6 (DNA-PEI) co-transfiziert (Tabelle 4). Hierfür wurden die 2 µg Plasmid-DNA (pHV Ad2 TRE Puro myc NOXA) und die 0,5 µg Plasmid-DNA (pTET-OFF-Plasmids) zusammen in einem Endvolumen von 100 µL Opti-MEM I und 12 µL PEI-Transfektionsreagenz ebenfalls in einem Endvolumen von 100 µL Opti-MEM I separat vermischt und anschließend die PEI-Lösung zur DNA-Lösung

hinzu pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. 200 mL des Transfektionsgemischs wurden mit 1 mL Serum- und Antibiotika-freiem DMEM auf die Zellen getropft und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde Serum (10% FCS) und AddR-Lösung (Kapitel 5.3.2) hinzugegeben und über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entsprechend mit Zytostatika für 8 h inkubiert und mittels Western Blot die transgene NOXA-Expression analysiert.

**Tabelle 4: Verwendete Plasmide für die Transfektion des NOXA-Expressionskonstruktes**

Nr.	Name	Herkunft
-	pHV Ad2 TRE-Puro myc Noxa	Gillisen et al (2003)
-	pTET-OFF	Gillisen et al (2003)

PEI-Transfektionsreagenz (1 mg/mL)	
1 M HEPES	25 mM
NaCl (0,9% w/v)	0,15 M
PEI	40 µM

<i>bovine serum albumin</i> (Albumin Fraktion V, BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Opti-MEM I (1x) [+HEPES, 2,4 g/L Natriumhydrogenkarbonat, L-Glutamin]	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Polyethylenimin, linear (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, DE

## 5.4 Virologische Methoden

### 5.4.1 Produktion von Lentiviren

Für die Generierung klonaler *Knock-Out*-Zelllinien (KO) wurden bereits klonierte lentivirale Vektoren mit den entsprechenden sgRNAs für die Zielgene BAX, BAK und BOK verwendet (Tabelle 5).

Für die Produktion von Lentiviren wurden  $1 \cdot 10^7$  HEK293FT-Zellen in eine T175-Flasche ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 20 µg der entsprechenden lentiCRISPR-Konstrukte, 10 µg des lentiviralen Verpackungsplasmids psPAX2 und 15 µg des VSV-G lentiviralen Plasmids zur Expression des Hüllproteins, die in einem Endvolumen von 100 µL Opti-MEM I vermischt wurden. Das PEI wurde im Verhältnis 1:2 (DNA:PEI) ebenfalls in einem Endvolumen von 100 µL Opti-MEM I vermischt und anschließend das PEI-Transfektionsreagenz zur Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurde das Transfektionsgemisch mit Serum- und Antibiotika-freiem RPMI 1640 auf die Zellen gegeben und bei 37 °C und

5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde Serum (10% FCS) und AddR-Lösung (Kapitel 5.3.2) hinzugegeben und über Nacht weiter inkubiert.

48 h und 72 h nach Transfektion erfolgte die Ernte viraler Partikel durch Abnehmen des Viruspartikel-enthaltenden Zellkulturüberstands. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Zellschabers abgeschabt und mehrmals auf und ab pipettiert. Die geernteten viralen Überstände und die abgeschabten Zellen wurden zusammengeführt und Zelltrümmer bei 3000 xg für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels eines 0,45 µm PVDF-Filters filtriert und Viruspartikel bei 50000 xg für 90 min und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten viralen Partikeln wurden in 200 µL 1% BSA/PBS über Nacht bei 4 °C gelöst und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 5: Verwendete Plasmide für die Generierung von *Knock-Out*-Zelllinien**

Labor-interne Nr.	Name	sgRNA [5']	Verwendung	Marker	Herkunft
#568	p-lenti2-CRISPR-hBax4 Kl. 4 (Amp)	CAC CGC TGC AGG ATG ATT GCC GCC G	Generierung von SW982/BAX <sup>KO</sup>	Puromycin	zur Verfügung gestellt von AG Essmann (Shalem <i>et al.</i> 2014)
#569	p-lenti2-CRISPR-hBak2 Kl. 2 (Amp)	CAC CGG CTC ACC TGC TAG GTT GCA G	Generierung von SW982/BAK <sup>KO</sup>	Puromycin	zur Verfügung gestellt von AG Essmann (Shalem <i>et al.</i> 2014)
#570	p-lenti2-CRISPR-hBok6 Kl. 6 (Amp)	CAC CGG ACC GAT GCG TTC CTG GCC G	Generierung von SW982/BOK <sup>KO</sup>	Puromycin	zur Verfügung gestellt von AG Essmann (Shalem <i>et al.</i> 2014)
#E063	pLVTHM		Positivkontrolle	GFP	Didier Trono (Addgene plasmid # 12247 ; <a href="http://n2t.net/addgene:12247">http://n2t.net/addgene:12247</a> ; RRID:Addgene_12247)
#E078	psPAX2 lenti (Amp)		Lentivirales Verpackungsplasmid für Lentivirusproduktion		Didier Trono (Addgene plasmid # 12260 ; <a href="http://n2t.net/addgene:12260">http://n2t.net/addgene:12260</a> ; RRID:Addgene_12260)

#E079	pMD2.G lenti (Amp)		VSV-G hüllen- exprimierendes Plasmid für Lentivirus- produktion		Didier Trono (Addgene plasmid # 12259 ; <a href="http://n2t.net/addgene:12259">http://n2t.net/addgene:12259</a> ; RRID:Addgene_12259)
-------	--------------------------	--	---	--	---

<i>bovine serum albumin</i> (Albumin Fraktion V, BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fisherbran Steriler PVDF-Spritzenvorsatzfilter; 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Opti-MEM I (1x) [+HEPES, 2,4 g/L Natriumhydrogenkarbonat, L-Glutamin]	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Polyethylenimin, linear (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, DE
Ultrazentrifugen-Röhrchen (25x89 mm)	Beckman Coulter GmbH, Brea, US

#### 5.4.2 Bestimmung des Virus-Titers

Der Titer der viralen Partikel wurde mittels des Lenti-X GoStix Plus bestimmt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zur Berechnung des infektiösen Titers wird ein bekannter Virus-Titer als Referenz benötigt. Hierfür diente der pLVTHM-Vektor, der unter der Kontrolle des EF-1 $\alpha$ -Promotors EGFP exprimiert. EGFP kann dadurch als Fluoreszenzmarker für positiv transduzierte Zellen dienen. Zur Bestimmung des Titers der pLVTHM-Probe wurden  $2,5 \cdot 10^4$  HEK293 FT-Zellen (Tabelle 3) pro 96-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Verdünnungsreihe der lentiviralen Partikel von  $10^{-1}$  –  $10^{-8}$  durch Zugabe von 10 µL pLVTHM-Virus suspension (Tabelle 6) in Triplikaten durchgeführt und wieder über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Verdünnungsstufe gewählt, bei der 10 – 30% grün fluoreszierende Zellen/Well zählbar waren. Anschließend wurde der Titer mittels folgender Formel bestimmt:

Viraler Titer (TU/mL) = Anzahl der fluoreszierenden positiven Zellen x 10 x Verdünnung

(Formel 1)

Der ermittelte infektiöse Titer (IFU/mL) der Viren diente als Richtwert für die weitere Transduktion der Zielzellen.

**Tabelle 6: Verwendetes Plasmid als Referenz zur Bestimmung des Virustiters**

Nr.	Name	Verwendung	Marker	Herkunft
#E063	pLVTHM	Positivkontrolle	GFP	Didier Trono (Addgene plasmid # 12247 ; <a href="http://n2t.net/addgene:12247">http://n2t.net/addgene:12247</a> ; RRID:Addgene_12247)



Lenti-X GoStix Plus

Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, FRA

### 5.4.3 Transduktion der Zielzellen zur Generierung klonaler Knock-Out-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-Technologie

Für die Transduktion der SW982/WT-Zellen (Tabelle 3) wurden  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen pro 6-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 µL der Virussuspension ( $\sim 5 \cdot 10^6$  -  $1 \cdot 10^7$  [IFU/mL]) zu den Zellen gegeben und erneut bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit suppl. DMEM und 1 µg/mL Puromycin selektioniert. Zwei Tage nach Puromycin-Zugabe wurden die Zellen trypsiniert und auf drei Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm aufgeteilt und weiterhin auf Puromycin-haltigem Medium kultiviert. Am dritten Tag wurden mit Hilfe von Klon-Zylindern, deren unterer Rand in Vaseline gedrückt wurde, Einzelklone selektioniert. Die Einzelklone wurden expandiert und anschließend charakterisiert.

Klon-Zylinder (∅ 4,7 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Puromycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Vaseline	DM Drogerie Markt GmbH, Stuttgart, DE

## 5.5 Reagenzien

Alle Inhibitoren und BH3-Mimetika (Tabelle 7) wurden in DMSO gelöst und als Aliquots bei -20 °C gelagert. Die ROS-Fänger (reaktive Sauerstoffspezies) Glutathion (GSH) und N-Acetylcystein (NAC) wurden in Wasser gelöst und ebenfalls aliquotiert bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren und BH3-Mimetika**

Inhibitor/Zytostatika	Zielmolekül	Hersteller
A-1155463 (BCL-xL-Inhibitor)	BCL-xL	Selleckchem, München, DE
A-1210477 (MCL-1-Inhibitor)	MCL-1	Selleckchem, München, DE
ABT-199 (Venetoclax)	BCL-2	Selleckchem, München, DE
<i>Actinomycin-D</i> (ACM-D)	Inhibition der RNA/DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bortezomib (BTZ)	Proteasom-Inhibition der $\beta_1$ und $\beta_5$ -UE	Absource Diagnostics GmbH, München, DE
Carfilzomib (CFZ)	Proteasom-Inhibition der $\beta_2$ und $\beta_5$ -UE	Selleckchem, München, DE
Cycloheximid (CHX)	Hemmung der Peptidyltransferase an der 60S-UE des Ribosoms	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glutathion (GSH)	Antioxidans	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

N-Acetylcysteinamid (NAC)	Antioxidans	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
<i>Integrated Stress Response Inhibitor</i> (ISRIB)	Umkehrung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und Wiederherstellung der Zelltranslationskapazität unter Stressbedingungen	Selleckchem, München, DE
Ixazomib (IXZ)	Proteasom-Inhibition der $\beta_1$ und $\beta_5$ -UE	Selleckchem, München, DE
Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketon (Q-VD-OPh)	Pancaspase-Inhibitor	Selleckchem, München, DE

DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE

### 5.5.1 A-1155463/BCL-xL-Inhibitor

A-1155463 ist ein spezifischer BCL-xL-Inhibitor, der an die BH3-Bindungsfurche des anti-apoptotischen Proteins BCL-xL bindet. A-1155463 wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 15  $\mu$ M verwendet (Tao *et al.* 2014).

### 5.5.2 A-1210477/MCL-1-Inihibitor

A-1210477 ist ein spezifischer MCL-1-Inhibitor, der an die BH3-Bindungsfurche des anti-apoptotischen Proteins MCL-1 bindet. A-1210477 wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 15  $\mu$ M verwendet (Leverson *et al.* 2015).

### 5.5.3 ABT-199/Venetoclax

ABT-199 ist ein selektiver Inhibitor des BCL-2-Proteins, der direkt an dessen BH3-Bindungsfurche bindet und pro-apoptotische BH3-*only* Proteine wie BIM verdrängt. ABT-199 wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 15  $\mu$ M verwendet (Davids und Letai 2013).

### 5.5.4 Actinomycin-D

ACM-D ist ein zytostatisch wirksames Antibiotikum, das mit seinem Phenoxazon-Ring in die DNA interkaliert. Die RNA- und DNA-Polymerasen können den DNA-Strang nicht mehr ablesen, wobei die mRNA-Bildung und die damit einhergehende Proteinbiosynthese ausbleibt. In dieser Arbeit wird ACM-D als Inhibitor der Transkription bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt.

### **5.5.5 Bortezomib/Velcade**

BTZ ist eine Dipeptidylboronsäure, die reversibel an die  $\beta_2$  und  $\beta_5$  UE des Proteasoms bindet. Durch Bindung an die katalytischen UE des Proteasoms werden diese inaktiviert. Die für den Abbau markierten Proteine, unter anderem Proteine, die in der Regulation der Apoptose involviert sind, können nicht mehr proteasomal abgebaut werden. BTZ wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 5 nM verwendet (Besse *et al.* 2019).

### **5.5.6 Carfilzomib**

CFZ ist ein PI der zweiten Generation und gehört zur Familie der Epoxyketone. CFZ inhibiert irreversibel die  $\beta_1$  und  $\beta_5$  UE des Proteasoms und unterscheidet sich somit in seiner Wirksamkeit von reversiblen Inhibitoren. CFZ wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 5 nM verwendet (Besse *et al.* 2019).

### **5.5.7 Cycloheximid**

CHX ist ein fungizides Antibiotikum und kann bei Eukaryoten als Translationshemmer fungieren. CHX hemmt die Aktivität der Peptidyltransferase an der 60S-UE des Ribosoms, wodurch die Translation und somit die Proteinbiosynthese verhindert wird. CHX wird in dieser Arbeit als Inhibitor der Proteinbiosynthese bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt.

### **5.5.8 ISRIB (Integrated Stress Response Inhibitor)**

ISRIB ist ein selektiver Inhibitor der integrierten Stress-Antwort und reguliert die Proteinsynthese unter Stressbedingungen. ISRIB bindet an eIF2B-Untereinheiten und unterstützt den Zusammenbau in aktive eIF2B-Komplexe. Dadurch kann die Wirkung der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  unter Stressbedingungen wirksam umgekehrt und die zelluläre Translationskapazität wiederhergestellt werden. ISRIB wird in dieser Arbeit als Inhibitor der integrierten Stress-Antwort bei einer Konzentration von 200 nM eingesetzt (Arai *et al.* 2020; Jin *et al.* 2020; Palam *et al.* 2015).

### **5.5.9 Ixazomib**

IXZ gehört ebenso zur zweiten Generation der PIs. Er ist wie BTZ ein Boronatpeptid und bindet gleichermaßen die  $\beta_2$  und  $\beta_5$  UE des Proteasoms. Im Gegensatz zu BTZ ist IXZ jedoch oral verfügbar. Durch seine sechsmal schnellere Dissoziationshalbwertszeit kann das veränderte Wirksamkeitsprofil von IXZ im Vergleich zu BTZ erklärt werden. IXZ wird in dieser Arbeit als Stressor zur Induktion von Apoptose bei einer Konzentration von 5 nM verwendet (Besse *et al.* 2019).

### 5.5.10 Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketon

Q-VD-OPh ist ein irreversibler Pancaspase-Inhibitor mit anti-apoptotischen Eigenschaften, indem er vor Zelltod schützt. Q-VD-OPh inhibiert unter anderem die bei Zelltod induzierte Caspase-Aktivität durch Bindung an das katalytische Zentrum der Caspasen. Q-VD-OPh wird in dieser Arbeit als Inhibitor der Caspasen bei Induktion von Apoptose in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### 5.5.11 Glutathion (GSH)

GSH ist ein Antioxidans, das Zellen durch Abfangen freier Sauerstoffradikale vor oxidativem Stress schützt. Zur Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen wird GSH oxidiert und geht von seiner monomeren Form GSH in die Dimer-Form GSSG über. GSH wird in dieser Arbeit zur Untersuchung ROS-abhängiger Prozesse bei einer Konzentration von 2 mM und einer Vorinkubationszeit von 2 h verwendet.

### 5.5.12 N-Acetylcysteinamid

NAC ist ein synthetisch hergestelltes Antioxidationsmittel, das den Vorrat an intrazellulärem Glutathion auffüllt und somit die Zellen indirekt vor oxidativem Stress schützt. NAC wird in dieser Arbeit zur Untersuchung ROS-abhängiger Prozesse in einer Konzentration von 2 mM und einer Vorinkubationszeit von 2 h eingesetzt.

## 5.6 Durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis von Zelltod

Die Durchflusszytometrie (FACS - *fluorescence activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern die zellulären Charakteristika zu analysieren.

Die in dieser Arbeit verwendete Annexin V-APC/TMRM-Färbung dient der Untersuchung der Apoptose-Induktion. Im frühen Stadium der Apoptose kommt es zu Veränderungen der Zellmembran. Phosphatidylserin (PS) transloziert von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite der Plasmamembran. An PS bindet das mit dem Fluorophor Allophycocyanin (APC) konjugierte Annexin V mit hoher Affinität, sodass bei durchflusszytometrischer Analyse die PS-Exposition apoptotischer Zellen als Fluoreszenzsignal detektierbar ist. Da im Verlauf der Apoptose die Zellintegrität verloren geht und auch nekrotische Zellen Annexin V positiv erscheinen, wurde eine Doppelfärbung mit dem Farbstoff Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) durchgeführt. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert TMRM in den negativ geladenen intakten Mitochondrien. Im Zuge der frühen Apoptose erfolgt die Depolarisation der Mitochondrien, woraufhin im Mitochondrium gespeicherte Anionen freigesetzt werden und die TMRM-Akkumulation vermindert wird. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials mit

einhergehendem Verlust der TMRM-Konzentration ist ein Indiz für die intrinsisch vermittelte Apoptose.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden  $0,7 - 1,0 \cdot 10^5$  Zellen pro 12-Well ausgesät und über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und gegen frisches Medium mit  $15\text{ }\mu\text{M}$  ABT-199  $\pm 5\text{ nM}$  PI ausgetauscht. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Überstand in FACS-Röhrchen überführt, die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit dem Überstand vereinigt. Die Zellen wurden bei  $560\text{ xg}$  für 5 min bei RT pelletiert und in  $500\text{ }\mu\text{L}$   $1\text{ x}$  PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in  $200\text{ }\mu\text{L}$   $1\text{ x}$  PBS +  $2\% \text{ FCS}$  +  $50\text{ nM}$  TMRM resuspendiert und für 30 min bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  inkubiert. Nach Zentrifugation ( $560\text{ xg}$ , 5 min, RT) wurde das Pellet in  $1\text{ x}$  Annexin-V Bindepuffer (ABP) +  $1:200$  Annexin V-APC resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte im BD FACSLyric und die Auswertung der Messergebnisse mit der BD *FACSuite Research* Software.

<b>Annexin-Bindepuffer (10x)</b>	
CaCl <sub>2</sub>	0,025 M
1 M HEPES-Puffer	0,1 M
NaCl	1,4 M
in ddH <sub>2</sub> O	

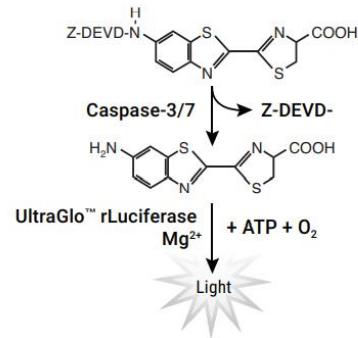
  

Annexin V-Allophycocyanin (APC)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, DE
BD CS&T <i>Beads</i>	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACSTFlow	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD <i>FACSuite Research</i> Software	BD Biosciences, California, USA
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Durchflusszytometer BD FACSLyric	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

## 5.7 Lumineszenz-Assays

### 5.7.1 Nachweis der Caspase-Aktivität mittels Caspase-Glo 3/7 Assay

Der Caspase-Glo 3/7-Assay ist ein Lumineszenz-basierter Substrat-Assay, der durch Substratspaltung die Aktivität der Caspasen 3 und 7 nachweist. Durch die Zell-Lyse kann das Substrat von aktiven Caspasen in Z-DEVD- und Aminoluciferin umgewandelt werden. Durch Anwesenheit der *UltraGlo Recombinant Luciferase* und ATP entsteht ein Lumineszenz-Signal, das proportional zum freigesetzten Substrat und damit der Caspasen-Aktivität ist (Reaktionsschema siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Umwandlung des Caspase-Glo 3/7-Substrates in Z-DEVD- und Aminoluciferin.** Anschließende Lumineszenz-Reaktion mittels der *UltraGlo rLuciferase* und ATP (Skizze aus dem Protokoll, Promega, Madison, Wisconsin, US).

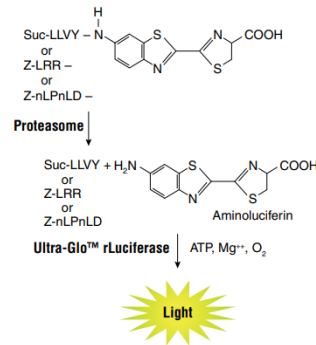
Für die Messung der Caspase 3/7-Aktivität wurden  $5 \cdot 10^3$  Zellen pro 96-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>  $\ddot{U}$ N kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 15  $\mu$ M ABT-199 allein oder in Kombination mit 5 nM BTZ für 4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Proben, die in Gegenwart der gleichen Menge an DMSO kultiviert wurden. Nach 4 h wurde der Caspase-Glo-Puffer und das Caspase-Glo-Substrat gemischt und 45  $\mu$ L des Caspase-Glo-Reagenzes in die Wells pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte für 30 s bei 700 rpm geschüttelt und für 10 s bei 340 xg zentrifugiert. Die Lumineszenz wurde bei 562 nm alle 5 min für eine Stunde im *Multimode* Plattenlesegeräts gemessen. Die relative Caspase-Aktivität wurde mit der GraphPad Prism 9.3.0 Software ausgewertet.

Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Madison, Wisconsin, US
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
EnSpire <i>Multimode</i> Plattenlesegerät	PerkinElmer, Inc, Waltham, US
EnSpire 2300	
EnSpire Software 4.1	PerkinElmer, Inc, Waltham, US
GraphPad Prism 9.3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, US

### 5.7.2 Aktivitätsbestimmung proteasomaler Untereinheiten mittels Proteasome-Glo-Assays

Zur Aktivitätsbestimmung der UE des Proteasoms wurde der Proteasome-Glo-Assay verwendet. Die verwendeten PIs wirken spezifisch auf Untereinheiten des Proteasoms. Die spezifische Inhibition wird durch die Aktivitätsbestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen ( $\beta_5$ -UE), Trypsin-ähnlichen ( $\beta_2$ -UE) und Caspase-ähnlichen ( $\beta_1$ -UE) UE ermittelt. Der Assay basiert auf dem für jede UE spezifischen Substrat in einem Zell-permeabilisierenden Puffer. Das Substrat Suc-LLVY-aminoluciferin (Succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine-aminoluciferin) für die  $\beta_5$ -UE, Z-LRR-aminoluciferin (Z-leucine-argininearginine-aminoluciferin) für die  $\beta_2$ -UE und Z-nLPnLD-aminoluciferin (Z-norleucine-proline-norleucine-aspartate-

aminoluciferin) für die  $\beta_1$ -UE wird durch die UE des Proteasoms spezifisch gespalten und das entstandene Aminoluciferin wird von der Luciferase unter Verbrauch von ATP umgesetzt, wobei Photonen frei werden. Das Lumineszenz-Signal ist proportional zur Aktivität der proteasomalen UE (Reaktionsschema siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Umwandlung des Proteasom-Glo-Zell-basierten Reagenzes in Suc-LLVY, Z-LRR oder Z-nLPnLD und Aminoluciferin.** Anschließend Lumineszenz-Reaktion mittels der *UltraGlo rLuciferase* und ATP (Skizze aus dem Protokoll, Promega, Madison, Wisconsin, US).

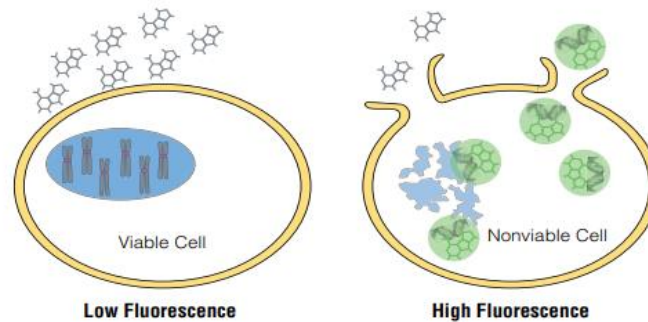
Es wurden  $5 \cdot 10^3$  Zellen pro 96-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 5 nM oder 100 nM PI für 4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativ-Kontrollen dienten Proben mit gleichen Mengen an DMSO. Nach 4 h wurde der Proteasom-Glo Puffer und das entsprechende Proteasom-Glo-Substrat gemischt und 50  $\mu$ L des Proteasom-Glo-Reagenzes in die Wells gegeben. Die 96-Well-Platte wurde für 2 min bei 700 rpm geschüttelt und für 10 s bei 340 xg zentrifugiert. Für ein verbessertes Lumineszenz-Signal wurde nach Zentrifugation ein weißes Papier unter die 96-Well-Platte gelegt und die Lumineszenz bei 562 nm alle 5 min eine Stunde lang im *Multimode* Plattenlesegeräts detektiert. Die proteasomale Aktivität der UE wurde mittels der GraphPad Prism 9.3.0 Software ausgewertet.

Proteasome-Glo Assay	Promega, Madison, Wisconsin, US
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
EnSpire <i>Multimode</i> Plattenlesegerät	PerkinElmer, Inc, Waltham, US
EnSpire 2300	
EnSpire Software 4.1	PerkinElmer, Waltham, US
GraphPad Prism 9.3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, US

## 5.8 Zelltod-Analyse im *Cytation 1 Imaging Reader*

Um den Verlauf des Zelltods darstellen zu können, wurde eine Zeitkinetik mit Hilfe des *Cytation 1 Cell Imaging Multi-Mode Readers* erstellt. Mit dem CellTOX *Green Cytotoxicity* Assays kann Zelltod durch Nachweis von Fluoreszenz detektiert werden. Der Assay basiert auf dem Verlust der Zellmembran-Integrität im Zuge der Apoptose, wodurch der Cyanin-

Farbstoff in apoptotische Zellen eindringen und in die DNA interkalieren kann. Dadurch werden die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs verstärkt, wohingegen in lebensfähigen Zellen kein nennenswerter Anstieg der Fluoreszenz detektiert wird. Die Fluoreszenz wird bei 485-500 nm<sub>Ex</sub>/520-530 nm<sub>Em</sub> detektiert. Das Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur Anzahl toter Zellen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Messung des Fluoreszenzsignals anhand des CellTOX Green Cytotoxicity Assay Cyanin-Farbstoffs** (Skizze aus dem Protokoll, Promega, Madison, Wisconsin, US).

Für die Detektion des Zelltods wurden  $7,5 \cdot 10^3$  Zellen pro 96-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 15 µM ABT-199 alleine oder in Kombination mit 5 nM PI versetzt. Als Negativ-Kontrollen dienten Proben mit gleichen Mengen an DMSO.

In *Knock-Down* Experimenten wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro 12-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit siRNA transfiziert und am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 15 µM ABT-199 alleine oder in Kombination mit 5 nM BTZ inkubiert.

Direkt nach Zugabe von ABT-199 ± BTZ wurde der 1000x konzentrierte Farbstoff 1:1000 als 1x CellTOX Green Farbstoff in das Well gegeben und die Platte direkt in das *Cytation 1* Plattenlesegerät gestellt. Bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden alle 60 min sowohl Hellfeld- als auch Fluoreszenz-Bilder bei einer 4x-Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe der *Gen5 3.08 Imager* Software wurden grün fluoreszierende Zellen anhand der aufgenommenen Fluoreszenz-Bilder zu den entsprechenden Zeitpunkten gezählt. Die CellTOX<sup>+</sup> Zellen wurden mittels der GraphPad Prism 9.3.0 Software ausgewertet.



CellTOX Green Farbstoff	Promega, Madison, Wisconsin, US
<i>Cytation 1 Cell Imaging Multi-Mode Reader</i>	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, DE
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>Gen5 3.08 Imager Software</i>	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, DE
GraphPad Prism 9.3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, US

## 5.9 Proteinanalytik

### 5.9.1 Herstellung von Proteinlysaten

**Zellernte:** Für die Proteinextraktion wurden  $3 - 3,5 \cdot 10^4$  Zellen pro 6-Well oder  $1 - 2 \cdot 10^6$  Zellen pro Petrischalen (d=10 cm) ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit ABT-199 ± PI für 8 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, mittels Zellschaber von der Oberfläche gelöst und die Zellsuspension in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Abspülen der Wells oder Petrischalen mit 1 mL bzw. 5 mL eiskaltem 1x PBS wurde die Zellsuspension zentrifugiert (560 xg, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde mit 1 mL 1x PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (560 xg, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand quantitativ entfernt, das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Zellyse:** Für die Zellyse wurde das Zellpellet in 30 – 50 µL Lysepuffer/6-Well oder 150 – 200 µL Lysepuffer/Petrischale mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren im Ultraschallbad für 6 Zyklen á 20 s. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15700 xg für 15 min (4 °C) sedimentiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

**BCA-Assay:** Die relative Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt. Es wurden jeweils 200 µL des BCA-Reagenzes (Lösung A:B 1:50) pro 96-Well mit 1 µL des Zellysats vermischt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Triplikaten. Nach der Inkubationszeit von 30 min (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde die Absorption bei 562 nm im *Multimode* Plattenlesegerät ermittelt und die Proteinkonzentration relativ zur BSA-Standardkurve errechnet. Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Für die weitere Verwendung wurden die Proteinlysate mit ddH<sub>2</sub>O Wasser und 5x Lämmli-Probenpuffer auf gleiche Konzentration (idealerweise 2 mg/mL) verdünnt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

<b>Lysepuffer</b>	
EDTA	5 mM
NaCl	250 mM
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
Triton X-100	0,1% (% v/v)
in ddH <sub>2</sub> O	

<b>Lämmli-Puffer (5x)</b>	
Bromphenolblau	3 mM
Glycerin	50% (% v/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,3 M
1 M Tris-Hydrochlorid (HCl) (pH 6,8)	0,2 M
β-Mercaptoethanol-Lösung	25% (% v/v)

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
EnSpire <i>Multimode</i> Plattenlesegerät	PerkinElmer, Inc, Waltham, USA
EnSpire 2300	
EnSpire Software 4.1	PerkinElmer, Inc, Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
1% Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ultraschallgerät Bioruptor UCD-200-TM-EX	Diagenode Inc. USA, Denville, NJ, USA

### 5.9.2 SDS-PAGE

Für den spezifischen Nachweis von Zielproteinen im Western Blot werden die Proteine in einer SDS-PAGE anhand ihres scheinbaren Molekulargewichtes getrennt. Die Trennmethode basiert auf einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel, in dem die Proteine aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld anhand ihrer „Größe“ getrennt werden. Das im Probenpuffer befindliche anionische Tensid SDS lagert sich an die Proteine an und β-Mercaptoethanol reduziert intramolekulare Disulfidbrücken, wodurch es zusammen mit der Hitze-induzierten Denaturierung zur Entfaltung und Linearisierung der Proteine kommt. Für die Auftrennung der zu analysierenden BCL-2-Proteine wurde ein Gradientengel aus gleichen Volumina einer 12%igen- und einer 20%igen Polyacrylamid-Lösung verwendet (Tabelle 8). Zur Analyse des MCL-1-Bandenmusters (MCL-1<sub>L</sub> und MCL-1<sub>S</sub>; siehe Kapitel 6.11) wurden 12%ige Polyacrylamid-Gele verwendet.

**Tabelle 8: Zusammensetzung eines Gradientengels**

Komponenten	Gradientengel	Sammelgel
12%iges Trenngel	2,5 mL	-
20%iges Trenngel	2,5 mL	-
Sammelgel-Stocklösung	-	2 mL
APS (10%)	50 $\mu$ L	20 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	2 $\mu$ L

Es wurden je 20  $\mu$ L der Zelllysate gelelektrophoretisch getrennt. Zur Bestimmung des relativen/scheinbaren Molekulargewichts wurden 3  $\mu$ L des Molekulargewichtsstandards mitgeführt. Die Elektrophorese der Lysate erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels für etwa 20 min bei 80 V und anschließend für etwa 45 min bei 200 V.

---

**Acrylamid [29:1] Stocklösung (12%)**


---

40% Acrylamid [29:1]	12% (% v/v)
SDS	0,1% (% v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	0,4 M
in ddH <sub>2</sub> O	

---



---

**Acrylamid [29:1] Stocklösung (20%)**


---

40% Acrylamid [29:1]	20% (% v/v)
Glycerin	10% (% v/v)
SDS	0,1% (% v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	0,4 M
in ddH <sub>2</sub> O	

---



---

**Elektrophorese-Puffer (10x)**


---

Glycin	1,92 M
SDS	1% (% v/v)
Tris	0,25 M
in ddH <sub>2</sub> O	

---



---

**Sammelgel-Stocklösung**


---

30% Acrylamid [37.5:1]	3,4% (% v/v)
SDS	0,08% (% v/v)
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,1 M
in ddH <sub>2</sub> O	

---

Acrylamid/Bis Solution (30%) Mix 37.5:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Acrylamide/Bis Solution (40%) Mix 29:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Proteinmarker <i>Color Protein Standard Broad Range</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., DE
Roti-Stock 20% SDS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE

### 5.9.3 Western Blot

Im Western Blot werden mittels Elektrophorese getrennte Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran übertragen und Zielproteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Im elektrischen Feld wandern die Proteine durch das angelagerte SDS in Richtung Anode und werden durch Adhäsion von der Trägermembran (Nitrocellulosemembran) zurückgehalten. Der Nachweis von Zielproteinen erfolgt semiquantitativ durch Bindung eines Protein-spezifischen Primär-Antikörpers, der wiederum durch Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Spezies-spezifischen Sekundär-Antikörpers nachgewiesen wird.

Proteine wurden im *Semi-Dry*-Verfahren in *Semi-Dry*-Transfer-Puffer (90 min bei 40 mA bzw. 1,5 mA/cm<sup>2</sup>) auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Ponceau-S gefärbt. Die Ponceau-S gefärbte Membran wurde in mehrere Abschnitte geteilt, um Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts parallel nachzuweisen. Zur Entfärbung wurde die Membran dreimal in 1x TBS-T gewaschen. Zur Sättigung freier Bindestellen wurde die Membran 1 h bei RT in 5% Magermilch in 1x TBS-T auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Membran wurde in 1x TBS-T gewaschen und in der Lösung (5% BSA in 1x TBS-T) mit Primär-Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttelrollmischer inkubiert. Nach drei zehnmütigen Waschschrinen in 1x TBS-T wurde die Membran mit dem Spezies-spezifischen Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper in 5% Magermilch in 1x TBS-T 1 h bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut 3x 10 min in 1x TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran 5 min in Substrat-Lösung (*Extended Duration Substrate* (EDS), *Super Signal West Dura*) inkubiert und die Lumineszenz-Signale spezifischer Banden mit Hilfe einer CCD-Kamera im Geldokumentationsgerät detektiert. Auf jeder analysierten Membran wurden gebundene Antikörper durch Inkubation mit *Restore PLUS Western Blot Stripping*-Puffer für 10 min abgelöst, freie Bindungsstellen erneut mit 5% Magermilch in 1x TBS-T gesättigt und ein *Housekeeping* Protein ( $\beta$ -AKTIN oder GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-

Dehydrogenase)) mittels erneuter Antikörper-Inkubation über Nacht bei 4 °C nachgewiesen. Die densitometrische Messung der Banden-Intensitäten erfolgte mit *ImageJ*.

**Tabelle 9: Verwendete Primär-Antikörper.** WB = Western Blot

Primäre Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-ATF3 (C-19)	Kaninchen, polyklonal	1:500	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	sc-188
Anti-ATF4 (D4D8)	Kaninchen, monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	11815
Anti-BAK	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	3814
Anti-BAX	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2772
Anti-BCL-2 (124)	Maus, monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	15071
Anti-BCL-xL	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2762
Anti-BOK	Kaninchen, monoklonal	1:500	Abcam, Berlin DE	ab186745
Anti-Cas9 s.p. (7A9-3A3)	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	14697
Anti-COX1/MT-CO1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	62101
Anti-eIF2 $\alpha$	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	9722
Anti-GADD34 (B-10)	Maus, monoklonal	1:500	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	sc-373615
Anti-GAPDH	Kaninchen, monoklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2118
Anti-MCL-1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	5453
Anti-MnSOD (Clone 19/MnSOD)	Maus, monoklonal	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg, DE	611580

Anti-NOXA	Maus, monoklonal	1:500	Calbiochem, Merck, Darmstadt, DE	OP-180
Anti-(P)-eIF2 $\alpha$ (S51)	Kaninchen, monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	9721
Anti-SDHA	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	5839
Anti-TOM20	Maus, monoklonal	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg, DE	612278
Anti-TOM70 (A-8)	Maus, monoklonal	1:1000	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	sc-390545
Anti-TP53 (DO-1)	Maus, monoklonal	1:1000	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	sc-126 HRP
Anti- $\beta$ -AKTIN (AC-74)	Maus, monoklonal	1:5000	Merck KGaA, Darmstadt, DE	A5316

**Tabelle 10: Verwendete Sekundär-Antikörper.** WB = Western Blot, HRP = Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)

Sekundäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Pferd	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	7074

#### BSA-Lösung (5%)

BSA  
in 1x TBS-T

5% (% w/v)

#### Magermilch-Lösung (5%)

Magermilchpulver  
in 1x TBS-T

5% (% w/v)

#### TBS (10x)

Kaliumchlorid (KCl)                   0,027 M  
NaCl                                        1,369 M  
Tris   0,028 M  
Tris-HCl                                 0,25 M  
in ddH<sub>2</sub>O

<b>TBS-T (1x)</b>	
TBS (10x)	0,025 M
Tween20 in ddH <sub>2</sub> O	0,1% (% v/v)
<b>Transferpuffer (semi-dry)</b>	
Ethanol (EtOH)	20% (% v/v)
Glycin	0,039 M
SDS	0,037% (% v/v)
Tris in ddH <sub>2</sub> O	0,048 M
<i>Amersham Protran Nitrocellulose Blotting Membrane (0,1 µm NC)</i>	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, DE
Biometra Fastblot B44	Analytik Jena GmbH, Jena, DE
<i>bovine serum albumin</i> (Albumin Fraktion V, BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Geldokumentation X Stella raytest LAS 1000	Medical Systems, Stamford, Connecticut, US
Stella chemiluminescent CCD camera	US
99,8% EtOH	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>ImageJ-Fiji64</i> Software	National Institutes of Health, Bethesda, MD, US
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ponceau-S	Sigma Life Science, Steinheim, DE
Reinstwasser (ddH <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
Roti-Stock 20% SDS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat</i> (EDS)	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, DE
X Stella Software Version 2.1.3.271, Dec. 6 2012	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, DE

## 5.10 RNA-Interferenz

Um den Einfluss einzelner Proteine zu analysieren, wurden *Knock-Down*-Experimente mit siRNA durchgeführt. Die Expression des zu untersuchenden Zielgens wurde spezifisch mittels *siGENOME SMARTpool* siRNA herunterreguliert, indem die Zellen liposomal transfiziert wurden. Die hierfür eingesetzten siRNAs sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Für den *Knock-Down* von Zielgenen wurden  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Well- oder 12-Well-Platten ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Die siRNA wurde mit einer

Anfangskonzentration von 50  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM I auf eine Endkonzentration von 50 nM verdünnt. In einem separaten Ansatz wurden je nach Plattenformat 1  $\mu\text{L}$  (12-Well-Platte) oder 2  $\mu\text{L}$  (6-Well-Platte) DharmaFECT#1 Transfektionsreagenz ebenfalls in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM I verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei RT wurde das Transfektionsreagenz zur siRNA pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurden je nach Plattenformat 100  $\mu\text{L}$  (12-Well-Platte) oder 200  $\mu\text{L}$  (6-Well-Platte) Transfektionsgemisch auf Zellen mit 1 mL Serum- und Antibiotika-freiem Medium gegeben. 6 – 8 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch suppl. Medium ersetzt. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag für die entsprechenden Experimente eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente die Transfektion mit *CTRL*-siRNA. Der *Knock-Down* wurde mit Hilfe einer qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) sowie mittels Western Blot verifiziert.

**Tabelle 11: Verwendete siGENOME SMARTpool siRNAs**

Zielgen	siRNA-Sequenzen (5'-...-3')	Artikelnummer	Hersteller
<i>ATF3</i>	5' -GGUUUGCCAUCCAGAACAA-3' 5' -CACUGGUGUUUGAGGAUUU-3' 5' -GCGACGAGAAAGAAAUAAG-3' 5' -AGACGGAGUGCCUGCAGAA-3'	M-008663-01-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>ATF4</i>	5' -GAUCAUCCUUUAGUUUAG-3' 5' -CAUGAUCCCUCAGUGCAUA-3' 5' -GUUUAGAGCUGGGCAGUGA-3' 5' -CUAGGUACCGCCAGAAGAA-3'	M-005125-02-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>BAK</i>	5' -CAGAGAAUGCCUAUGAGUA-3' 5' -CAACCGACGCUAUGACUCA-3' 5' -CGACAUCAACCGACGCUAU-3' 5' -GCUUCGUGGUCGACUUCAU-3'	M-003305-02-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>BAX</i>	5' -GAACUGAUCAGAACCAUCA-3' 5' -CUGAGCAGAUCAUGAAGAC-3' 5' -ACAUGUUUUCUGACGGCAA-3' 5' -CAUUGGACUUCUCCGGGA-3'	M-003308-03-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>BOK</i>	5' -GGCCCAGCGUCUACCGCAA-3' 5' -AGAUCAUGGACGCCUUUGA-3' 5' -GAUGGACUGAUGUCCUCA-3' 5' -GGAGCGCGCCGAGCGUGC-3'	M-004394-00-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>CTRL</i>	5' -UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'	D-001210-02-20	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>PMAIP1</i>	5' -AAACUGAACUUCGCGCAGA-3' 5' -AAUCUGAUAUCCAAACUCU-3' 5' -CUGGAAGUCGAGUGGCUA-3' 5' -GCAAGAACGCUCAACCGAG-3'	M-005275-03-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK
<i>TP53</i>	5' -GAGGUUGGCUCUGACUGUA-3' 5' -GCACAGAGGAAGAGAAUCU-3' 5' -GAAGAAACCACUGGAUGGA-3' 5' -GCUUCGAGAUGUUCGAGA-3'	M-003329-03-0005	Horizon Discovery, Cambridge, UK



DharmaFECT Reagenz	Horizon Discovery, Cambridge, UK
Opti-MEM I (1x) [+HEPES, 2,4 g/L Natriumhydrogenkarbonat, L-Glutamin]	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE

## 5.11 RNA-Analysen

### 5.11.1 RNA-Isolation

Zur Gewinnung zellulärer RNA wurde bei der Ernte für Western Blot Proben (Kapitel 5.9.1) 1/6 der Zellsuspension für die RNA separat pelletiert (560 xg, 5 min, 4 °C) und anschließend die RNA mittels RNeasy Mini Kit nach Protokollvorgabe isoliert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption der isolierten RNA-Proben, wie in Kapitel 5.2.2 (DNA/RNA Konzentrationsbestimmung) beschrieben, gemessen.

RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
-----------------	-------------------------

### 5.11.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese erfolgte eine reverse Transkription der isolierten RNA in DNA. Hierfür wurden 33 ng/μL RNA ( $\cong$  500 ng) mit 13 ng/μL Oligo-dT Primern ( $\cong$  200 ng) und Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 15 μL verdünnt. Die Probe wurde für 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. 10 μL des cDNA-Synthese-Reaktionsmixes (Tabelle 12) wurden zur Probe pipettiert und im PCR Thermocycler zuerst für 60 min bei 42 °C und anschließend für weitere 10 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde auf Eis gestellt und 1:4 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und entweder direkt für die Genexpressions-Analyse verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 12: cDNA-Synthese-Reaktionsmix**

Komponenten	Volumen pro Probe [μL]
M-MLV <i>Reaction</i> Puffer (5x)	5 μL
dNTP-Mix (10 mM)	1,25 μL
RNasin <i>Ribonuclease</i> Inhibitor	0,5 μL
M-MLV RT (5 U)	0,5 μL
Nuklease-freies Wasser	2,75 μL

dNTPs	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., DE
M-MLV RT (200 U)	Promega, Madison, Wisconsin, US
M-MLV <i>Reaction Puffer</i> (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, US
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Oligo-dT Primer	Promega, Madison, Wisconsin, US
RNasin <i>Ribonuclease Inhibitor</i>	Promega, Madison, Wisconsin, US

### 5.11.3 Analyse der Genexpression mittels TaqMan-basiertem Assay

Die Analyse der Genexpression erfolgte mit Hilfe des TaqMan-basierten qPCR-Assays. Die mRNA-Expressionen der Zielgene wurden mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) detektiert und auf die drei gemittelten *Housekeeping*-Gene GAPDH, TUBULIN  $\alpha$  1A und  $\beta$ -AKTIN normiert.

Für die Messung wurde der entsprechende TaqMan Gen-Expressions Assay (20x) (Tabelle 14) für das zu analysierende Zielgen ausgewählt und mit dem TaqMan Universal Master Mix (2x), RNase-freiem Wasser und der cDNA-Probe versetzt (Tabelle 13). Es wurden für jede Probe jeweils Triplikate angefertigt.

**Tabelle 13: TagMan Gen-Expressions-Reaktionsmix**

Komponenten	Volumen pro Probe [ $\mu$ L]	
	im 384-Well-Format	im 96-Well-Format
TaqMan Gen-Expressions Assay (20x)	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
TaqMan Universal Master Mix (2x)	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
RNase-freies Wasser	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L

**Tabelle 14: Verwendete TaqMan Gen-Expressions Assays**

Zielgen	Farbstoff	TagMan-Assay	Herkunft
<i>ATF3</i>	FAM-MGB	Hs00231069_m1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>ATF4</i>	FAM-MGB	Hs00909569_g1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>ACTB</i>	VIC-MGB_PL	Hs03023943_g1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>GAPDH</i>	VIC-MGB_PL	Hs02758991_g1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>PMAIP1</i>	FAM-MGB	Hs00560402_m1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>TP53</i>	FAM-MGB	Hs01034249_m1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
<i>TUBA1A</i>	VIC-MGB_PL	Hs00362387_m1	Thermo Scientific, Rockford, IL, US

Anschließend wurde die Multiwellplatte mit Folie verschlossen und für 10 s bei 340 xg zentrifugiert.

Für die Amplifikationsreaktion wurde das in Tabelle 15 aufgelistete PCR-Programm verwendet und die Genexpression der spezifischen Zielgene mit Hilfe der *Real Time* PCR-Systeme detektiert.

**Tabelle 15: PCR-Programm für die Amplifikationsreaktion mittels TaqMan-basiertem Assay**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Aktivierung der Uracil-DNA-Glycosylase	50°C	2 min	
Denaturierung	95 °C	10 min	
Annealing	95°C	15 s	40x
Elongation	60°C	1 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Die Auswertung erfolgte mittels der SDS *Automation Controller* 2.4 TaqMan Software und die relative Quantifizierung (RQ; relativ zum *Housekeeper*-Gen), d.h. die Änderungen der Genexpression in einer bestimmten Probe relativ zu der Referenzprobe, anschließend dargestellt.

*Real Time* PCR-Systeme:

7500 Real Time PCR System SDS 7500	Applied Biosystems, Singapore
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Singapore
MicroAmp Optical 94-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems, China
MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems, China
RNase-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
SDS <i>Automation Controller</i> 2.4 TaqMan Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
TaqMan Gen-Expressions Assay (20x)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
TaqMan Universal Master Mix (2x)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE

## 5.12 Metabolomics / Massenspektrometrische Analyse

Wie in der Literatur beschrieben, führt ABT-199 neben der Inhibierung des anti-apoptischen BCL-2-Proteins auch zur Dysregulation des Mitochondriums. ABT-199 kann dabei zu mitochondrialem metabolischem *Reprogramming* führen, was sich in einer erhöhten reduktiven Carboxylierung widerspiegelt. Ein ansteigendes Verhältnis von  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) zu Citrat definiert hierbei die reduktive Carboxylierung, die das Umdrehen des Citrat-Zyklus darstellt.

### 5.12.1 Extraktion intrazellulärer Metabolite

Zur Untersuchung des in der Literatur beschriebenen Effekts des BH3-Mimetikums ABT-199 auf den zellulären Metabolismus wurden intrazelluläre Metabolite extrahiert und massenspektrometrisch analysiert.

Für die Extraktion intrazellulärer Metabolite wurden  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen pro 6-Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 15 µM ABT-199 allein oder in Kombination mit 5 nM BTZ inkubiert. Als Negativ-Kontrollen dienten Proben mit gleichen Mengen an DMSO. Nach 8 h wurde das Medium entfernt und ein Aliquot á 100 µL (=Überstand) abgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgten ausnahmslos auf Eis. Die Zellen wurden in 1 mL eiskaltem 1x PBS mit einem Zellschaber abgelöst und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µL der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4%) versetzt und die Zellen gezählt (Kapitel 5.3.3). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (16000 xg, 5 min, 4 °C,) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 600 µL -80 °C kaltem 80%igem Methanol (MeOH) resuspendiert und für 15 min auf Trockeneis inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 xg, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand (=Zellextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Überstand, Zellpellet und Zellextrakt wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
MeOH	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Trockeneis	Promega, Madison, Wisconsin, US

### 5.12.2 Analyse der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen

Die Konzentration der intrazellulären Metabolite wurde in Kooperation mit der analytischen Abteilung des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für klinische Pharmakologie analysiert. Aus dem hierfür hergestellten Zellextrakt (Kapitel 5.12.1) wurden die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite α-KG und Citrat bestimmt. Ein ansteigender α-KG/Citrat-Quotient zeigt hierbei die reduktive Carboxylierung, die im Zuge des mitochondrialen metabolischen *Reprogrammings* beschrieben ist. Die Messung der α-KG- und Citrat-Konzentrationen erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), wie in (Maier *et al.* 2008).

## 5.13 Anreicherung von Mitochondrien

Um den Einfluss von ABT-199 auf den mitochondrialen Import zu untersuchen, wurden Mitochondrien angereicherte Fraktionen generiert. Mittels Western Blot wurde die relative

Menge ausgewählter Proteine jeweils im Gesamtlysate, in der mitochondrialen und in der cytosolischen Fraktion analysiert. Die nukleär kodierten, mit einer N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz ausgestatteten Proteine MnSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase) und die UE der SDHA (Succinat-Dehydrogenase) des Komplexes II wurden als Marker für in das Mitochondrium importierte Proteine herangezogen. Die Proteine TOM20 und TOM70 des in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten TOM-Komplexes dienten als mitochondriale Marker. Als weiterer Marker diente das cytosolische Protein GAPDH.

Für die Anreicherung von Mitochondrien wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen pro T175-Flasche ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 15 µM ABT-199 bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 h und 8 h inkubiert. Die Zellen wurden mit 4 mL Trypsin/EDTA abgelöst, die Zellsuspension zentrifugiert (340 xg, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet in 1 mL eiskaltem 1x PBS resuspendiert. 100 µL der Zellsuspension wurden abgenommen und zur Herstellung des Gesamtlysats verwendet. Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (340 xg, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet gewogen. Das Pellet wurde in eiskaltem hypotonem Puffer resuspendiert (5 mL Puffer / 1 g Zellpellet). Nach zehnmütiger Inkubationszeit auf Eis wurde die Lösung mittels eines *Dounce Homogenisators* mit 10 – 20-Hüben homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nicht-lysierte Zellen und Zellkerne wurden durch Zentrifugation (1000 xg, 10 min, 4 °C) abgetrennt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (14000 xg, 15 min, 4 °C). Der resultierende Überstand (=cytosolische Fraktion) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet (=mitochondriale Fraktion) wurde in 50 µL – 100 µL MiPO<sub>5</sub>-Puffer (*Mitochondria storage and respiration buffer*) resuspendiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt und Arbeitslösungen der Proteinlysate in 5x Lämmli-Puffer, wie in Kapitel 5.9.1 beschrieben, angefertigt. Danach wurden die Proben mittels Western Blot analysiert und die MCL-1<sub>L</sub> und MCL-1<sub>S</sub>-Banden densitometrisch mit Hilfe der *ImageJ*-Software ausgewertet.

<b>Hypotoner Puffer</b>	
BSA	0,1% (% v/v)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	1x
EDTA	0,2 mM
HEPES-Puffer	10 mM
Mannitol	0,3 M
in ddH <sub>2</sub> O	

<b>MiPO<sub>5</sub>-Puffer</b>	
BSA	0,1% (% v/v)
EGTA	0,5 mM
HEPES-Puffer	20 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
K-Lactobionat	60 mM
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	3 mM
Sucrose	110 mM
Taurine	20 mM
in ddH <sub>2</sub> O	

<i>bovine serum albumin</i> (Albumin Fraktion V, BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Homogenisator <i>Dounce Homogenizer Wheaton Tight (1,0 mL)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
<i>ImageJ-Fiji64</i> Software	National Institutes of Health, Bethesda, MD, US
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, DE
K-Lactobionat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Mannitol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Taurin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin-EDTA (0,05%)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE

## 5.14 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 9.3.0. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen ungepaarten oder gepaarten Students t-Tests berechnet. Unterschiede mit p-Werten  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant festgelegt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ). p-Werte  $\geq 0,05$  wurden als nicht signifikant (ns) definiert.

GraphPad Prism 9.3.0 Software

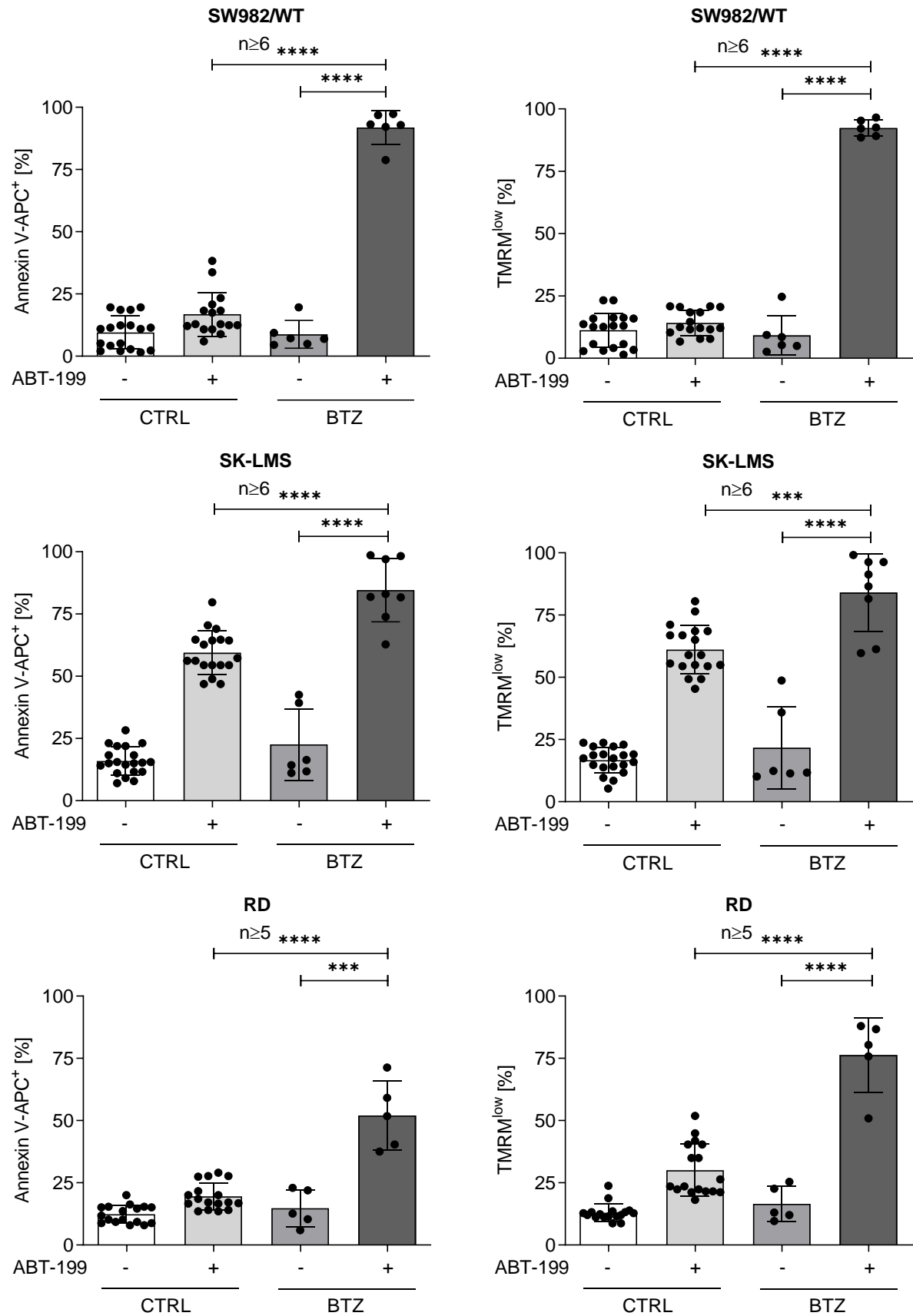
GraphPad Prism, San Diego, CA, US

## 6. Ergebnisse

### 6.1 ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion in Sarkoma-Zelllinien

Eigene Vorarbeiten zeigen, dass BTZ in Kombination mit dem spezifischen BCL-2-Inhibitor ABT-199 in Weichteilsarkomen synergistisch Apoptose induziert (Muenchow *et al.* 2020). Für die ABT-199&BTZ-vermittelte synergistische Apoptose sind das pro-apoptotische Effektorprotein BAX und der MCL-1 Antagonist NOXA von essentieller Bedeutung. Da Weichteilsarkome eine hohe Heterogenität aufweisen, wurde der ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod in drei verschiedenen Sarkom-Zelllinien untersucht, um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären. Hierfür wurden die Zelllinien SW982/WT, SK-LMS und RD in Gegenwart von 15  $\mu\text{M}$  ABT-199 und/oder 5 nM BTZ inkubiert und der Zelltod nach 24 h mittels Annexin V-APC und TMRM durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Anwesenheit von ABT-199 oder BTZ allein zeigte sowohl in den SW982/WT als auch in den RD <20% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> gefärbte Zellen, was vergleichbar mit den Messwerten der Kontrollansätze war (Abbildung 9). Die SK-LMS hingegen zeigten bereits bei alleiniger Inkubation mit ABT-199 einen stark erhöhten Zelltod mit >50% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in mehr als 50% der Zellen (~61% TMRM<sup>low</sup>). Die Kombination ABT-199&BTZ wies in allen drei Zelllinien signifikant erhöhte Anteile an Annexin V-APC<sup>+</sup> (~92% SW982/WT, ~85% SK-LMS und ~52% RD) und TMRM<sup>low</sup> gefärbten Zellen (~92% SW982/WT, ~85% SK-LMS und ~76% RD) auf. Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte den publizierten Synergismus von ABT-199&BTZ in den betrachteten Zelllinien (Muenchow *et al.* 2020). Da der Synergismus in den SW982/WT-Zellen besonders deutlich war, wurde diese Zelllinie für weitere Experimente ausgewählt.



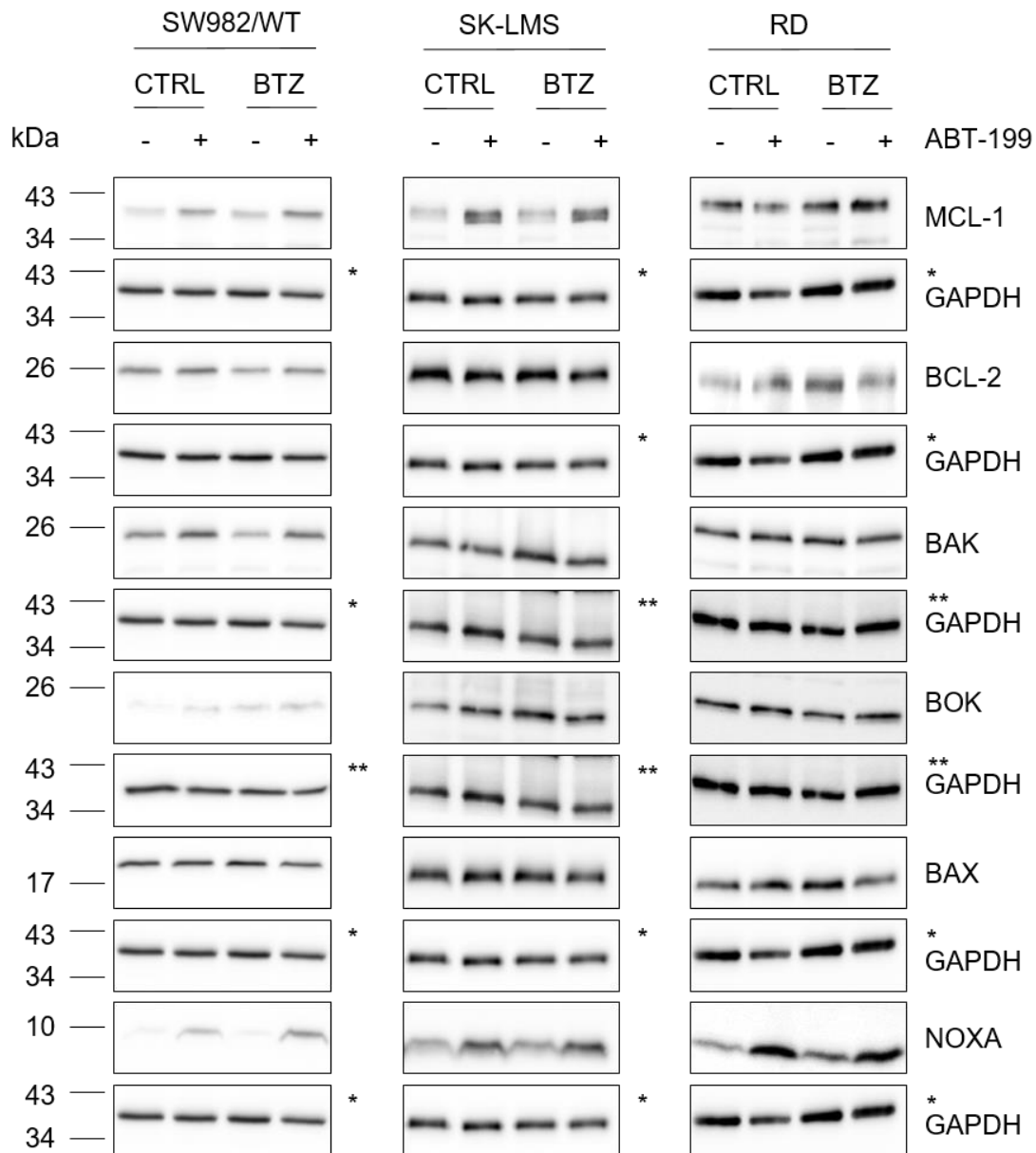
**Abbildung 9: ABT-199&BTZ induzieren in SW982/WT, SK-LMS und RD synergistisch Apoptose.** SW982/WT, SK-LMS und RD wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ allein



oder in Kombination für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen bestimmt. Die Kombination ABT-199&BTZ führte in allen drei Zelllinien zu synergistisch induzierter Apoptose (~52 - 92% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>). Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung (SD); n≥5.

Um die Ergebnisse der durchflusszytometrisch ermittelten ABT-199&BTZ-vermittelten Apoptose-Induktion zu verstehen, wurden des Weiteren die Protein-Expressionen verschiedener BCL-2-Proteine untersucht. Mittels Western Blot wurde die Expression der Proteine BCL-2, MCL-1, BAX, BAK, BOK und NOXA nach 8 h Inkubation mit 15 µM ABT-199 und/oder 5 nM BTZ analysiert. Keine der drei Zelllinien (SW982/WT, SK-LMS und RD) zeigte nach Inkubation mit ABT-199 und/oder BTZ eine veränderte Expression von BCL-2 (Abbildung 9). Zwar zeigten SW982/WT-Zellen nach simultaner Inkubation mit ABT-199 und BTZ eine leicht erhöhte relative Bandenintensität von BAK und BOK, es ließ sich aber weder für BAX, noch für BAK oder BOK ein einheitlicher Unterschied der Proteinexpression in Gegenwart von ABT-199 und/oder BTZ feststellen.

Da MCL-1 proteasomal abgebaut wird, resultiert die Proteasom-Inhibition in erhöhter Expression von MCL-1 (Pandey *et al.* 2013; Wu *et al.* 2020). Eine geringfügig verstärkte Expression von MCL-1 in Gegenwart von BTZ konnte auch in SW982/WT nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigte sich eine verstärkte Expression von MCL-1 in Anwesenheit von ABT-199, die sich in Kombination mit BTZ noch steigerte. Es stellte sich die Frage, ob der beobachtete Effekt der verstärkten MCL-1-Expression spezifisch für MCL-1 ist. Deshalb wurde für eine detaillierte Analyse die Expression des MCL-1 Antagonisten NOXA betrachtet. Laut Literatur vermittelt die Interaktion von NOXA mit MCL-1 die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von MCL-1, wodurch der am Mitochondrium lokalisierte NOXA-MCL-1-Komplex zum Proteasom transloziert und proteasomal abgebaut wird (Nakajima *et al.* 2014; Pang *et al.* 2014). In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen der Expressionsanalyse von MCL-1 wurde die NOXA-Expression in Anwesenheit von ABT-199 allein und verstärkt in Kombination mit BTZ induziert (Abbildung 10).

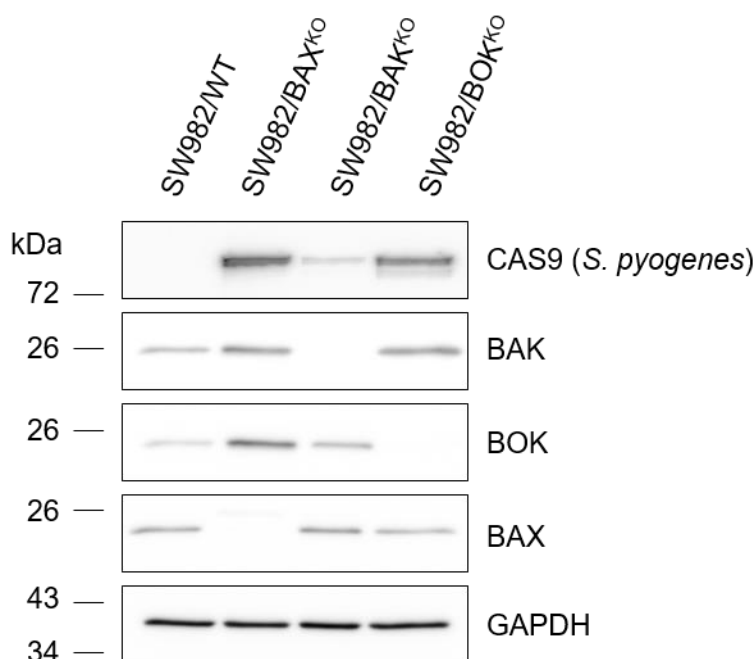


**Abbildung 10: Expression verschiedener BCL-2-Proteine.** Die Zelllinien SW982/WT, SK-LMS und RD wurden 8 h mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM BTZ inkubiert und die Expression der Proteine mittels Western Blot analysiert (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh). Ein verstärktes Protein-Level ließ sich bei ABT-199 allein und in Kombination mit BTZ nur für MCL-1 und dessen Antagonist NOXA feststellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden oder erneuter Antikörper-Detektion nach Strippen der Membranen entstanden sind.

## 6.2 Das Effektorprotein BAX als Vermittler der ABT-199&BTZ-induzierten synergistischen Apoptose

Die Kombination aus Proteasom-Inhibition und spezifischer BCL-2-Inhibition führt zur Aktivierung und mitochondrialen Oligomerisierung von BAX (Muenchow *et al.* 2020). Das pro-

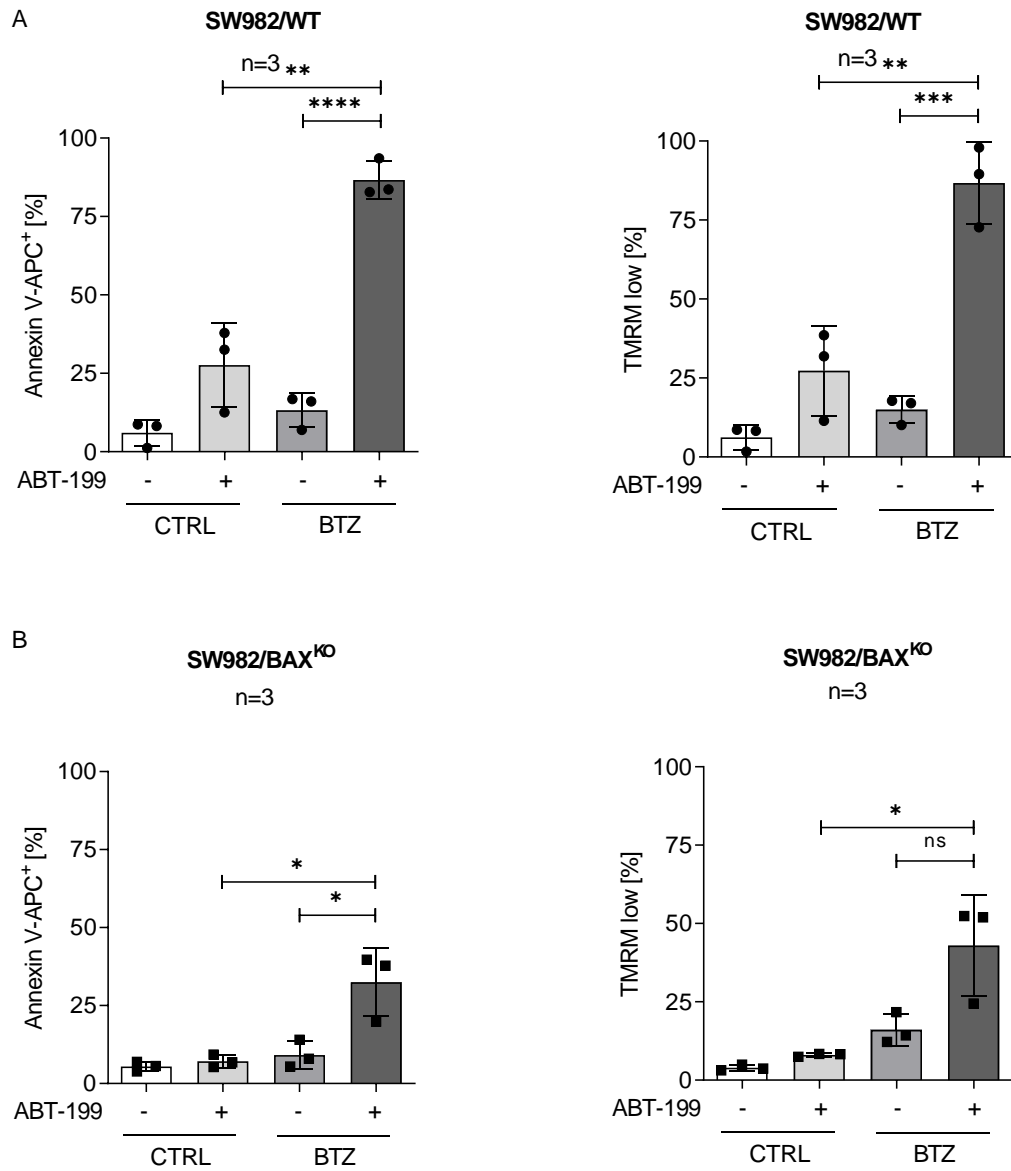
apoptotische Effektorprotein BAX ist ebenso wie BAK und BOK für die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium verantwortlich. Dies lässt vermuten, dass die Effektorproteine BAX, BAK und BOK synergistisch induzierte Apoptose beeinflussen. Um den Einfluss der Effektorproteine zu untersuchen, wurden mittels der CRISPR/CAS9-Methode *Knock-Out*-Zelllinien aus SW982/WT generiert. Im Western Blot wurde der KO analysiert und KO-Zelllinien ausgewählt (Abbildung 11). Ein weiteres Auswahlkriterium war die unveränderte Expression der jeweils anderen Effektoren sowie der übrigen BCL-2 Familienproteine (nicht dargestellt). Des Weiteren zeigten alle stabilen KO-Zelllinien die Expression der CAS9 *Streptococcus pyogenes* (CRISPR-associated Protein) als Indikator eines stabil ins Wirtsgenom integrierten und funktionierenden CRISPR/CAS9-Systems.

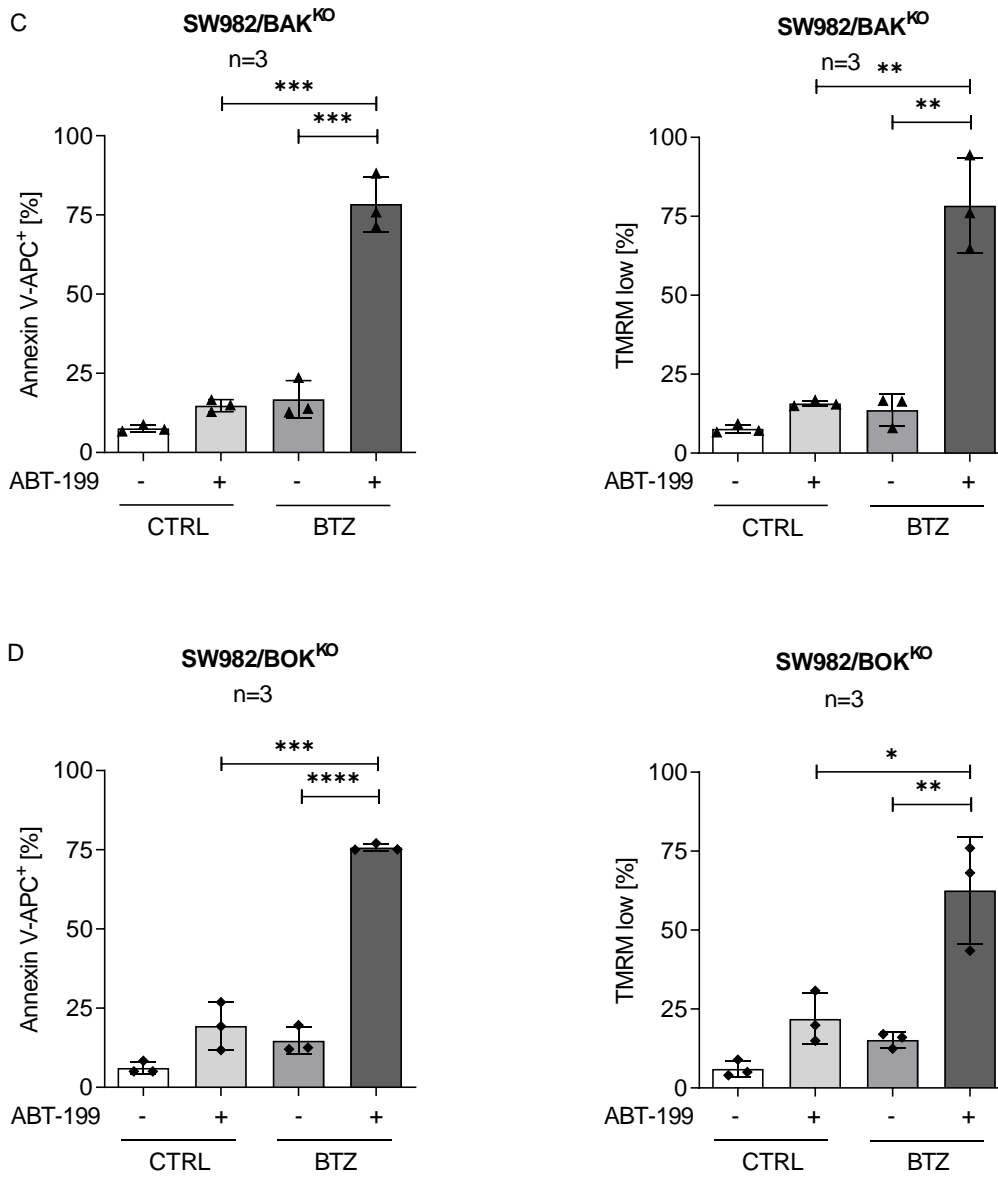


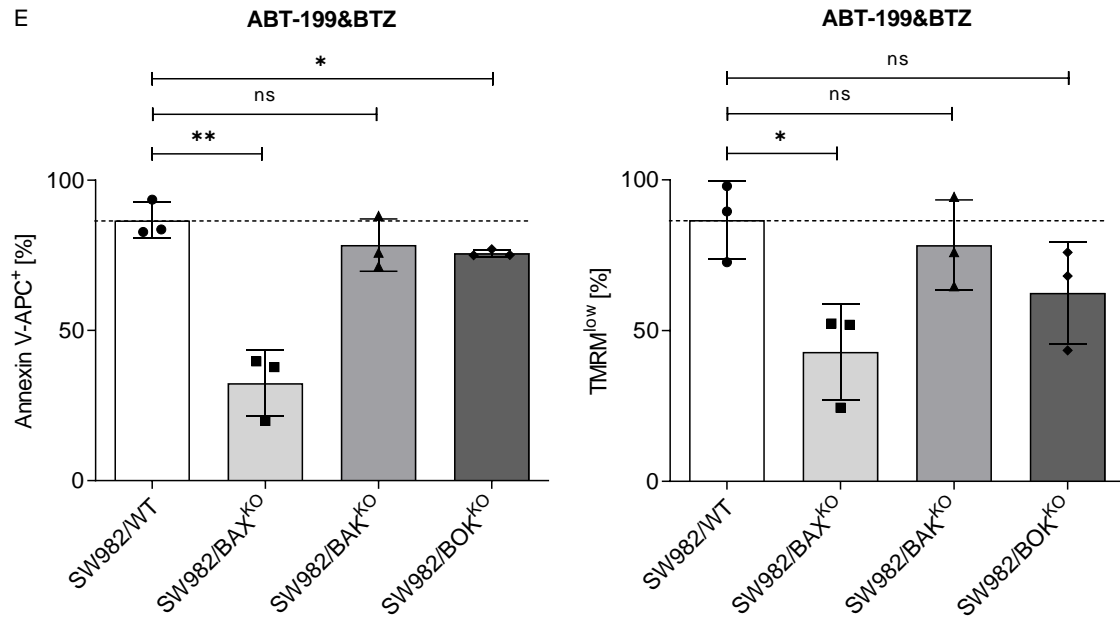
**Abbildung 11: Erfolgreicher *Knock-Out* der Effektorproteine.** Mit Hilfe der CRISPR/CAS9-Methode wurden aus den SW982/WT die KO-Zelllinien SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> generiert. 30-40 µg Protein wurden zur Überprüfung hinsichtlich eines erfolgreichen KO und der stabil ins Wirtsgenom integrierten CRISPR/CAS9 (*S. pyogenes*) Maschinerie untersucht. Alle drei generierten KO-Zelllinien zeigten den entsprechenden KO für die Effektorproteine BAX, BAK oder BOK und exprimierten die CAS9 (*S. p.*). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die ausgewählten KO-Zelllinien wurden in Anwesenheit von 15 µM ABT-199 und/oder 5 nM BTZ inkubiert und der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin V-APC/TMRM-Färbung nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Entsprechend den Erwartungen zeigten die drei KO-Zelllinien bei alleiniger Inkubation mit ABT-199 oder BTZ keine verstärkte Zelltod-Induktion (<20% Annexin V-APC<sup>+</sup> oder TMRM<sup>low</sup> gefärbter Zellen), verglichen zur parentalen

SW982/WT (Abbildung 12 A-D). Die Kombination ABT-199&BTZ resultierte in den SW982/BAK<sup>KO</sup> in ~78% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> gefärbter Zellen. Vergleichbar hierzu verhielt sich SW982/BOK<sup>KO</sup> mit ~76% Annexin V-APC<sup>+</sup> und ~63% TMRM<sup>low</sup> gefärbter Zellen. Der SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> induzierte in ähnlichem Umfang wie die SW982/WT-Zellen (~92% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>) Zelltod. Daraus lässt sich schließen, dass die Effektorproteine BAK und BOK nicht wesentlich für den ABT-199&BTZ-vermittelten Synergismus verantwortlich sind. Wie erwartet, zeigte der KO von BAX in SW982/BAX<sup>KO</sup> signifikant reduzierten Zelltod (~32% Annexin V-APC<sup>+</sup>) und Anteil an TMRM<sup>low</sup> gefärbter Zellen (~43%) bei Verwendung des BCL-2-Inhibitors ABT-199 in Kombination mit BTZ. Die Gegenüberstellung der drei KO-Zelllinien und der parentalen SW982/WT-Zellen zeigt deutlich, dass in SW982/BAX<sup>KO</sup> der geringste Anteil apoptotischer Zellen nach ABT-199&BTZ-Inkubation detektiert wurde. BAX wurde als der Vermittler der ABT-199&BTZ-induzierten synergistischen Apoptose identifiziert (Abbildung 12 E).

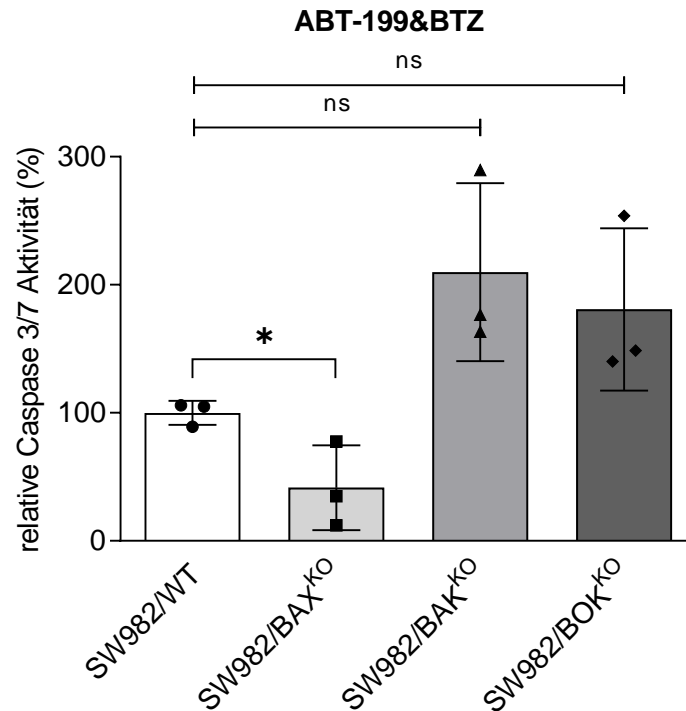






**Abbildung 12: Einfluss der Effektorproteine BAX, BAK und BOK auf die ABT-199&BTZ-vermittelte Apoptose-Induktion.** A-D) SW982/WT und die korrespondierenden KO-Zelllinien (SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup>) wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ allein oder in Kombination für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen bestimmt. E) Der BAX-KO resultierte in dem geringsten Anteil apoptotischer Zellen mit einer signifikanten Reduktion des Zelltods von >50% im Vergleich zu SW982/WT und dem BAK- und BOK-KO. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Zur Überprüfung der verminderten ABT-199&BTZ-vermittelten Apoptose-Induktion nach KO von BAX wurde zusätzlich die Aktivität der *Downstream* Effektor-Caspasen 3 und 7 mittels eines Caspase-Substrat-Assays bestimmt. Nach 24-stündiger Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ wurde die Caspase 3/7-Aktivität in SW982/WT und den KO-Zelllinien bestimmt. Nur in SW982/BAX<sup>KO</sup> zeigte sich eine Reduktion auf 42% relativer Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zur parentalen SW982/WT-Zelllinie. Die Caspase 3/7-Aktivität in den SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> war höher als in den SW982/WT (Abbildung 13). Dies könnte durch erhöhte Expression der Caspasen hervorgerufen worden sein.



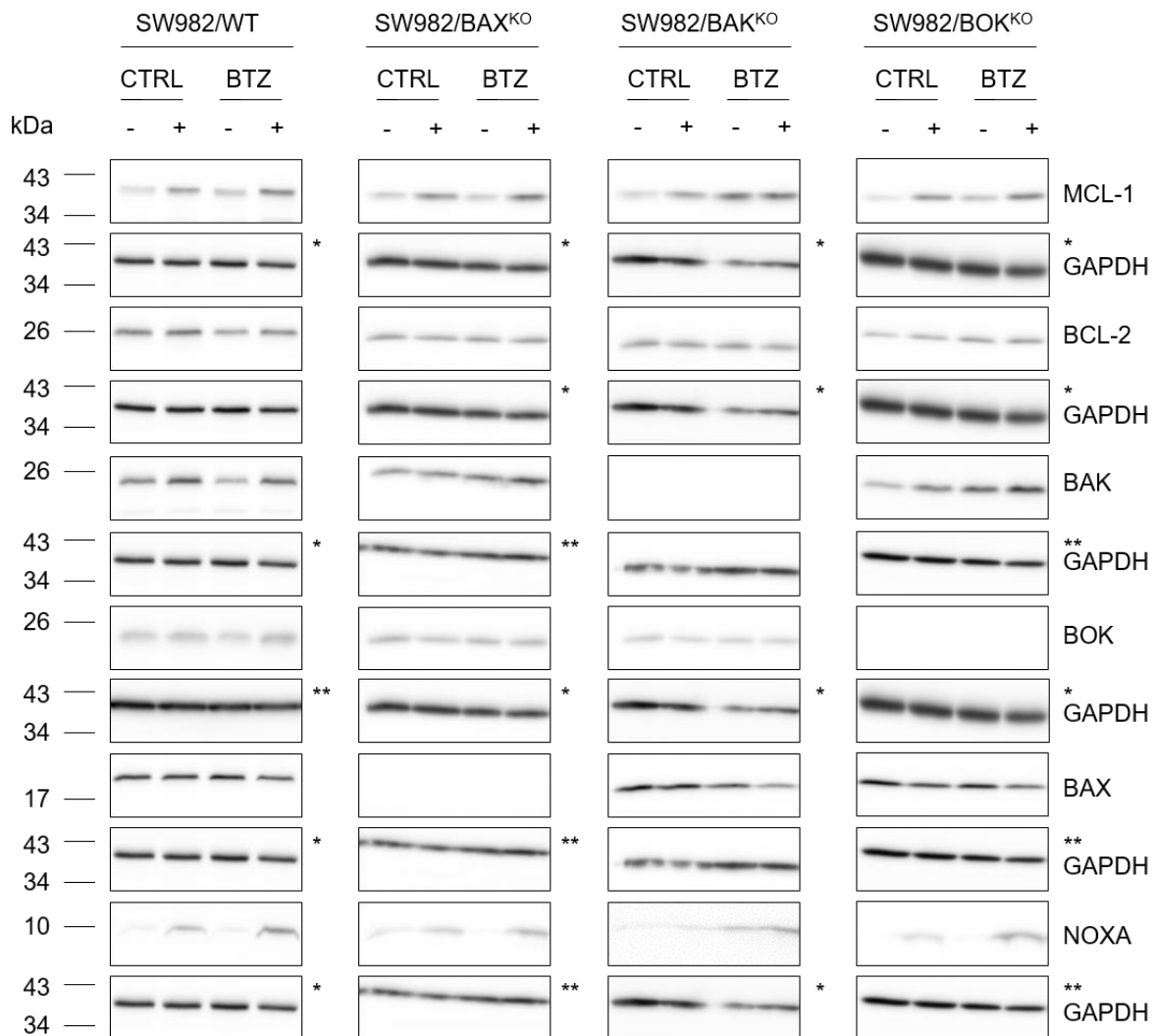
**Abbildung 13: Der SW982/BAX<sup>KO</sup> resultierte in signifikant reduzierter relativer Caspase 3/7-Aktivität nach Inkubation mit ABT-199&BTZ.** SW982/WT und die KO-Zelllinien (SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup>) wurden für 24 h in Anwesenheit von 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ inkubiert und anschließend die Caspase 3/7-Aktivität mit Hilfe des Caspase-Substrat-Assays bestimmt. In SW982/BAX<sup>KO</sup> zeigte sich eine Reduktion von 57% relativer Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu SW982/WT. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Um den Einfluss der Effektorproteine BAX, BAK und BOK auf die ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion zu betrachten, wurde die Expression verschiedener BCL-2-Proteine analysiert. Hierfür wurden die Protein-Expressionen der anti-apoptotischen Proteine MCL-1 und BCL-2 sowie der pro-apoptotischen Effektorproteine BAX, BAK und BOK und des BH3-*only* Proteins der parentalen SW982/WT-Zelllinie und der KO-Linien 8 h nach Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199 allein oder in Kombination mit 5 nM BTZ im Western Blot analysiert. Abbildung 14 zeigt, dass die alleinige Inkubation von ABT-199 und/oder BTZ weder die Expression des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins noch die der Effektorproteine BAX, BAK und BOK wesentlich veränderten. Die Differenz der durchflusszytometrisch ermittelten Zelltod-Antworten auf ABT-199&BTZ der KO-Zelllinien kann ebenfalls nicht auf die veränderte Expression des BH3-*only* Proteins NOXA zurückgeführt werden. Die Bandenintensität von NOXA und der dabei synchron verstärkten MCL-1-Expression der KO-Linien nach alleiniger Inkubation von ABT-199 oder in Kombination mit BTZ war vergleichbar zur parentalen SW982/WT-Zelllinie. Aufgrund der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M Q-VD-OPh kann geschlossen werden, dass NOXA *Upstream* der Caspasen bei der ABT-199&BTZ-



vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion liegt und die Induktion der NOXA-Expression nicht als sekundärer Effekt auftritt.

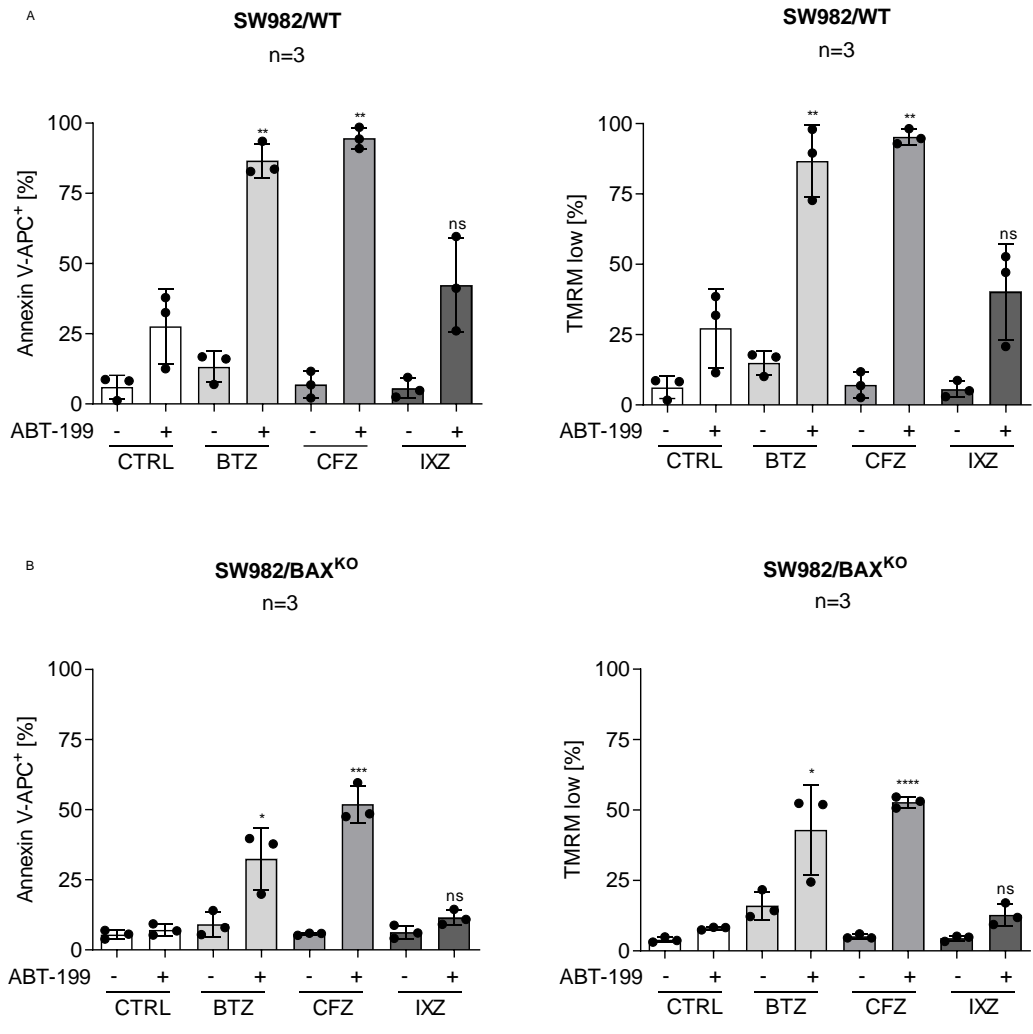
Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zelltodanalysen und der Induktion der NOXA-Expression von SW982/WT und den korrespondierenden KO-Linien (SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup>) werfen die Frage auf, ob der resultierende Synergismus spezifisch für BTZ ist oder allgemein durch Proteasom-Inhibition vermittelt wird.

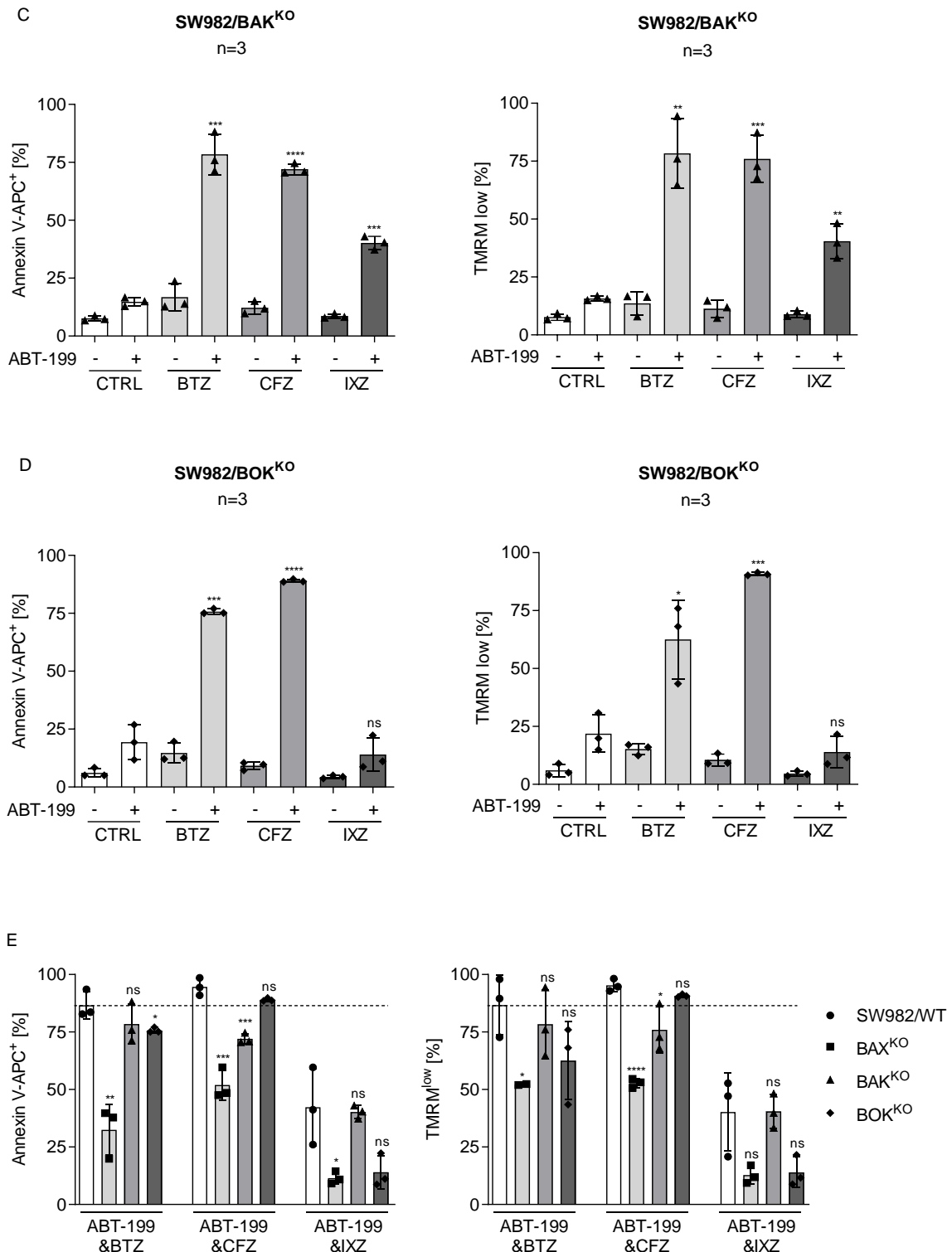


**Abbildung 14: Verstärkte Proteinexpression von NOXA bei der Inkubation mit ABT-199&BTZ.** SW982/WT, SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> wurden für 8 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM BTZ inkubiert und die Proteinexpression verschiedener Proteine mittels Western Blot analysiert (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh). Die KO-Zelllinien zeigten nach Inkubation mit ABT-199 und/oder BTZ keine veränderte Expression der BCL-2-Proteine im Vergleich zu SW982/WT. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden oder erneuter Antikörper-Detektion nach Strippen der Membranen entstanden sind.

### 6.3 ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion in SW982/WT

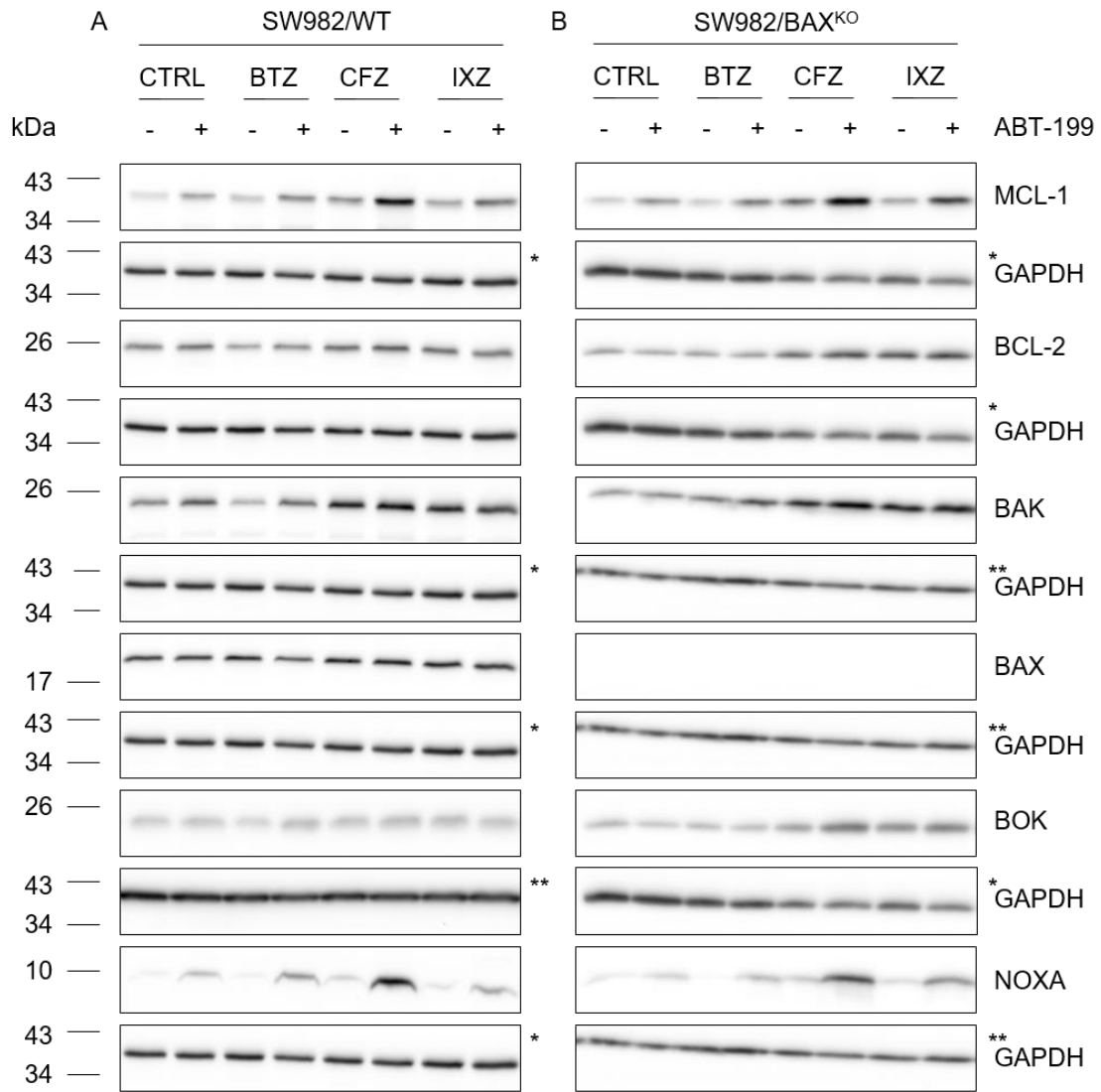
Um zu untersuchen, ob die durch ABT-199&BTZ-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion spezifisch für BTZ ist oder auf eine allgemeine Klassenspezifität zurückzuführen ist, wurden die PIs CFZ und IXZ hinzugezogen (Besse *et al.* 2019). Die Weichteilsarkom-Zelllinien SW982/WT, SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW992/BOK<sup>KO</sup> wurden mit 5 nM PI allein und in Kombination mit 15 µM ABT-199 für 24 h inkubiert und mittels Durchflusszytometrie der Zelltod analysiert. Die alleinige Inkubation mit den PIs CFZ und IXZ wies in allen Zelllinien eine mit der BTZ-Inkubation vergleichbare Zelltod-Induktion auf (Abbildung 15; <20% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>). Die Inkubation von ABT-199 mit CFZ resultierte in den SW982/WT-Zellen in >90% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> gefärbter Zellen. Die Kombination ABT-199&CFZ führte zu vergleichbarer Zelltod-Induktion wie ABT-199&BTZ in SW982/WT (Abbildung 15 A). ABT-199&IXZ induzierten in SW982/WT auch synergistisch Apoptose, allerdings in geringerem Maße (~43% Annexin V-APC<sup>+</sup>; ~40% TMRM<sup>low</sup>). Des Weiteren ließ sich erkennen, dass CFZ in Kombination mit ABT-199 in den SW982/BAK<sup>KO</sup> (Abbildung 15 C) und SW982/BOK<sup>KO</sup> (Abbildung 15 D) gleichermaßen wie ABT-199 mit BTZ den Zelltod induzierte (Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>: >70% für ABT-199&BTZ und ABT-199&CFZ). Der BAK-KO zeigte keine Auswirkung auf den Zelltod bei Inkubation von ABT-199&IXZ (Abbildung 15 C). Die Exposition von Phosphatidyl-Serin und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in ~40% der Zellen bei der Kombination ABT-199&IXZ in SW982/BAK<sup>KO</sup> war vergleichbar mit dem Verhalten von SW982/WT (Abbildung 15 A). Lediglich der BOK-KO reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen für ABT-199&IXZ auf Kontrollniveau (~40% auf ~14%). Im Gegensatz hierzu führte der KO von BAX zu signifikant geringerer Zelltod-Induktion (>90% auf ~50% (ABT-199&CFZ) und ~40% auf ~10% (ABT-199&IXZ)), was in Übereinstimmung mit der Reduktion des Zelltods nach KO von BAX bei ABT-199&BTZ (>80% auf ~40%) ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BTZ, CFZ und weniger effizient IXZ, mit ABT-199 synergistisch wirken und der Synergismus dabei auf der allgemeinen Proteasom-Inhibition beruht (Abbildung 15 E). Die zu SW982/WT vergleichbare ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion der beiden Zelllinien SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> lässt den Rückschluss zu, dass weder BAK noch BOK für die synergistische Zelltod-Induktion verantwortlich sind. Für die PIs CFZ und IXZ in Kombination mit ABT-199 lässt sich, wie bereits für ABT-199&BTZ identifiziert, BAX als Hauptakteur der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Apoptose-Induktion ausmachen.

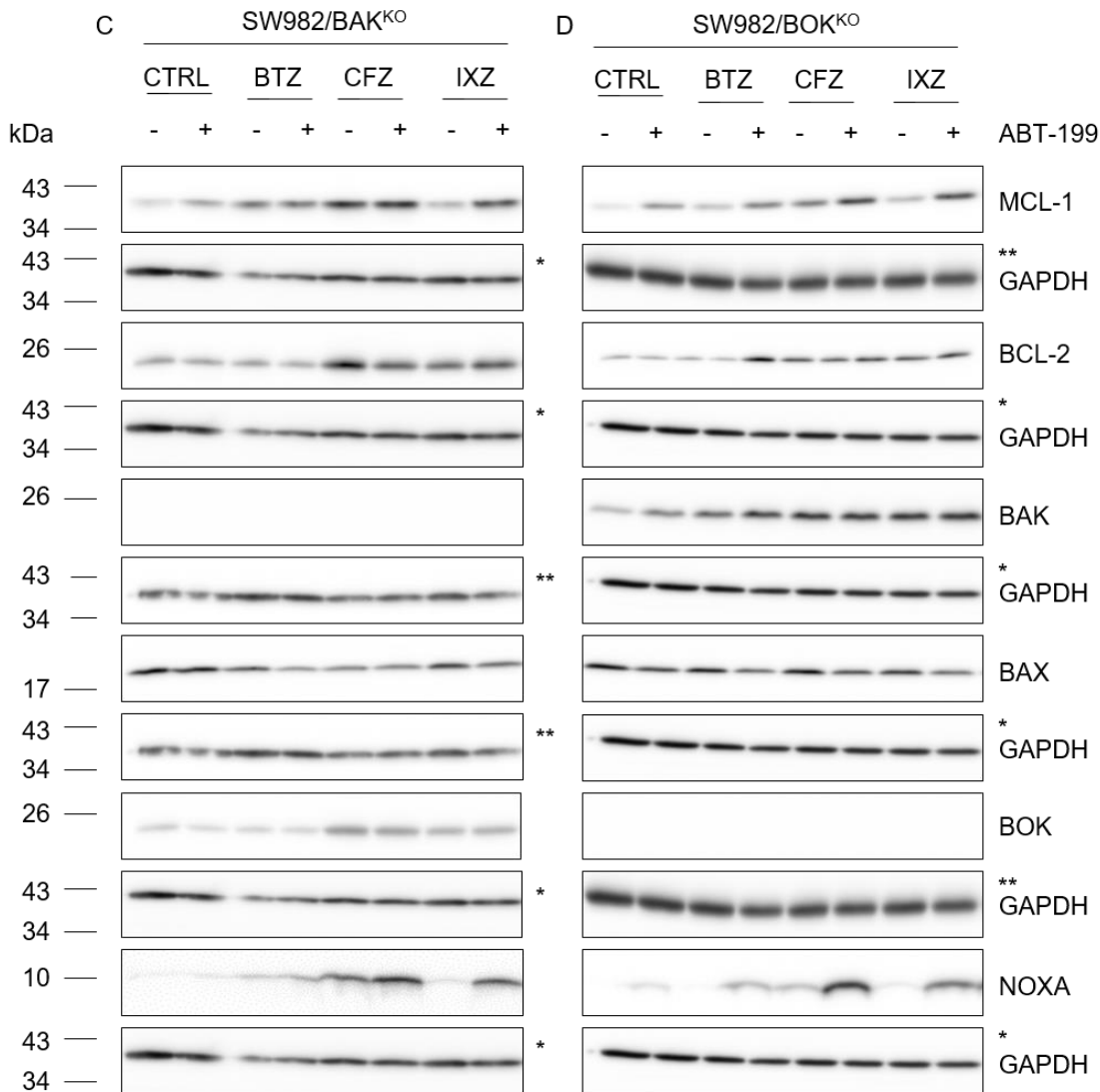




**Abbildung 15: ABT-199&PIs induzieren synergistisch Zelltod.** A-D) Nach Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199 allein oder in Gegenwart von 5 nM BTZ, CFZ oder IXZ für 8 h wurde der Zelltod der SW982/WT und der generierten KO-Zelllinien (SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup>) durchflusszytometrisch mittels Annexin V-APC-Färbung (Exposition von Phosphatidyl-Serin) und TMRM-Färbung (Verlust des  $\Delta\Psi_m$ ) evaluiert. E) Alle PIs (BTZ, CFZ und IXZ) wirkten in den KO-Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß in Kombination mit ABT-199 synergistisch. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Um den unterschiedlich induzierten ABT-199&PI-vermittelten Zelltod und dessen molekulare Grundlage zu erschließen, wurde die Expression relevanter BCL-2-Proteine mittels Western Blot analysiert. Nach achtstündiger Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM PI wurde die Expression der jeweiligen Proteine der SW982/WT-Zellen und der KO-Linien begutachtet. Es konnte in keiner der getesteten Zelllinien deutliche Medikamenten-induzierte Veränderungen der Proteinexpressionen von BCL-2 und BAX detektiert werden (Abbildung 16). Eine leicht verstärkte Bandenintensität von BAK und BOK nach Inkubation mit CFZ oder IXZ allein und in Kombination mit ABT-199 ließ sich in allen Zelllinien feststellen (Abbildung 16 A-D). Die Effektorproteine BAK und BOK führen zu keiner deutlichen Zelltod-Reduktion bei ABT-199&PIs, jedoch konnte für alle PIs allein und in Kombination mit ABT-199 die verstärkte NOXA- und MCL-1-Expression bestätigt werden. Unabhängig von BAX, BAK oder BOK ließ sich nach alleiniger Inkubation mit den PIs eine schwache NOXA-Induktion feststellen, die in Kombination mit ABT-199 noch stärker ausgeprägt war. Die NOXA-Expression nahm dabei in allen untersuchten Zelllinien (SW982/WT, SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup>, SW982/BOK<sup>KO</sup>) folgendermaßen zu: IXZ<BTZ<CFZ<ABT-199 (Abbildung 16). Da die NOXA-Expression mit der Apoptose-Induktion (Abbildung 16) in der Reihenfolge ABT-199<ABT-199&IXZ<ABT-199&BTZ<ABT-199&CFZ korreliert, wurde der Fokus weiterführender Untersuchungen auf das BH3-*only* Protein NOXA gelegt und die Rolle von NOXA in der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion analysiert.





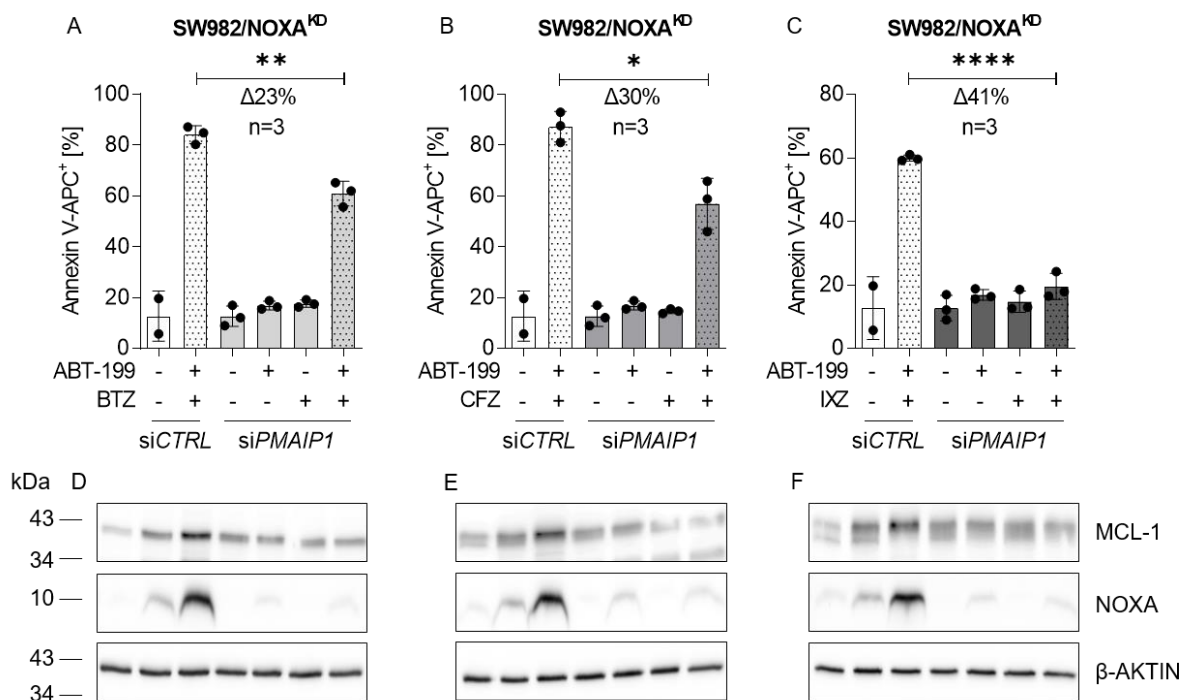
**Abbildung 16: Die Induktion der NOXA-Expression korreliert mit der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion.** SW982/WT, SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup> wurden für 8 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 allein und/oder in Kombination mit 5 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ) inkubiert und die Protein-Expression mittels Western Blot untersucht (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh). A-D) Die NOXA-Expression ist unabhängig von BAX, BAK oder BOK und nimmt in der Reihenfolge IXZ<BTZ<CFZ<ABT-199 zu. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden oder erneuter Antikörper-Detektion nach Strippen der Membranen entstanden sind.

#### 6.4 Der NOXA-Knock-Down reduziert die ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion

Im Folgenden soll die Rolle von NOXA in der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Apoptose-Induktion untersucht werden. Dazu wurde NOXA mittels siRNA in den SW982/WT und den verschiedenen KO-Zelllinien herunter reguliert und der ABT-199&PI-vermittelte Zelltod durchflusszytometrisch analysiert. Die SW982-Zellen wurden 24 h nach Transfektion

mit *siPMAIP1* für weitere 24 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM PI inkubiert. Die Zelltodanalyse erfolgte dann nach Färbung mit Annexin V-APC. Der *Knock-Down* von NOXA wurde im Western Blot analysiert und die fehlende NOXA-Proteinexpression bestätigte den erfolgreichen *Knock-Down* (Abbildung 17 D-F). Abbildung 17 A-C zeigt, dass der *Knock-Down* von *PMAIP1* den ABT-199&PI-vermittelten Zelltod signifikant reduziert. Die Wirkung der *PMAIP1*/NOXA Herunterregulation variiert je nach Kombination der PIs mit ABT-199. Während der *Knock-Down* bei ABT-199&BTZ zu 23% weniger Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und bei ABT-199&CFZ zu 30% weniger Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen führte (Abbildung 17 A und B), blockierte der *Knock-Down* von *PMAIP1*/NOXA bei ABT-199&IXZ die Zelltod-Induktion komplett (Abbildung 17 C). Zudem wurde die Möglichkeit, dass die gesteigerte MCL-1-Expression nach ABT-199&PI-Inkubation zur Induktion von NOXA führt, ausgeschlossen. Die basale MCL-1-Expression war nach *Knock-Down* von *PMAIP1*/NOXA unverändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl BAX als auch NOXA Schlüsselmoleküle in der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion zu sein scheinen.



**Abbildung 17: Reduktion der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion bei *PMAIP1*/NOXA-Knock-Down.** A-F) SW982/WT-Zellen und die etablierten KO-Linien (SW982/BAX<sup>KO</sup>, SW982/BAK<sup>KO</sup> und SW982/BOK<sup>KO</sup>) wurden mittels *siPMAIP1* transfiziert und am nächsten Tag mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ) für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Der *Knock-Down* von *PMAIP1*/NOXA wurde mittels Western Blot (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) analysiert. A-C) Die signifikante Zelltod-Induktion nach *Knock-Down* von *PMAIP1*/NOXA ließ darauf schließen, dass NOXA den ABT-199&PI-vermittelten synergistisch induzierten Zelltod beeinträchtigt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3. D-F) Die Abwesenheit der NOXA-Expression nach *siPMAIP1*-Transfektion bestätigte einen erfolgreichen *PMAIP1*/NOXA-



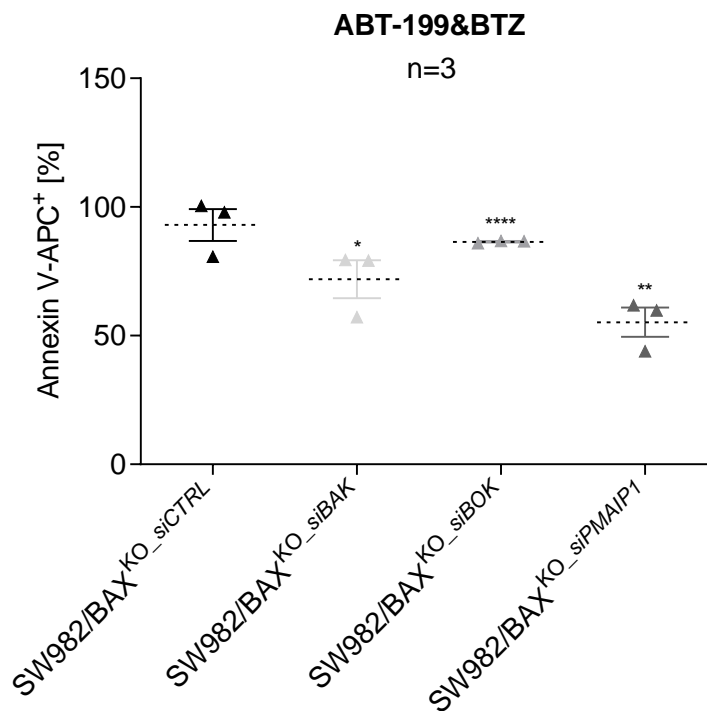
*Knock-Down*. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

## **6.5 BAX und NOXA sind wichtige Schlüsselmoleküle in der ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion**

Da sowohl der *Knock-Out* von BAX als auch der *Knock-Down* von NOXA gleichermaßen eine Reduktion der Zelltod-Induktion nach ABT-199&PI-Inkubation zur Folge hatten, wurde die Wirkung von NOXA in BAX-defizienten Zellen untersucht. Um außerdem die Frage zu klären, inwieweit NOXA auch in BAK- oder BOK-defizienten Zellen eine Rolle spielt, wurden BAX, BAK, BOK oder NOXA in den entsprechenden KO-Linien mittels siRNA Interferenz herunter reguliert und die durch ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion analysiert.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte weder der SW982/BAK<sup>KO</sup> mit herunter reguliertem BOK noch der SW982/BOK<sup>KO</sup> mit herunter reguliertem BAK eine wesentliche Reduktion des Zelltods nach 24-stündiger ABT-199&BTZ-Inkubation (Anhang Abbildung 42).

Im Gegensatz dazu konnte in den SW982/BAX<sup>KO</sup>-Zellen nach Inkubation von ABT-199&BTZ für 24 h eine geringe Reduktion des Zelltods sowohl bei dem *Knock-Down* von BAK um ~21% als auch bei dem *Knock-Down* von BOK um ~13% mittels durchflusszytometrischer Messung von Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden. Es scheint, dass BAK die Funktion von BAX bei dessen Abwesenheit einnimmt (Abbildung 18). Den größten Einfluss zeigte der *Knock-Down* von PMAIP1 in SW982/BAX<sup>KO</sup>-Zellen mit knapp ~40% reduzierter Zelltod-Induktion. Dies bestätigt die Schlussfolgerung, dass BAX und NOXA wichtige Schlüsselmoleküle in der ABT-199&BTZ-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion sind. BAK und BOK scheinen einen geringen Effekt in der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion zu besitzen.

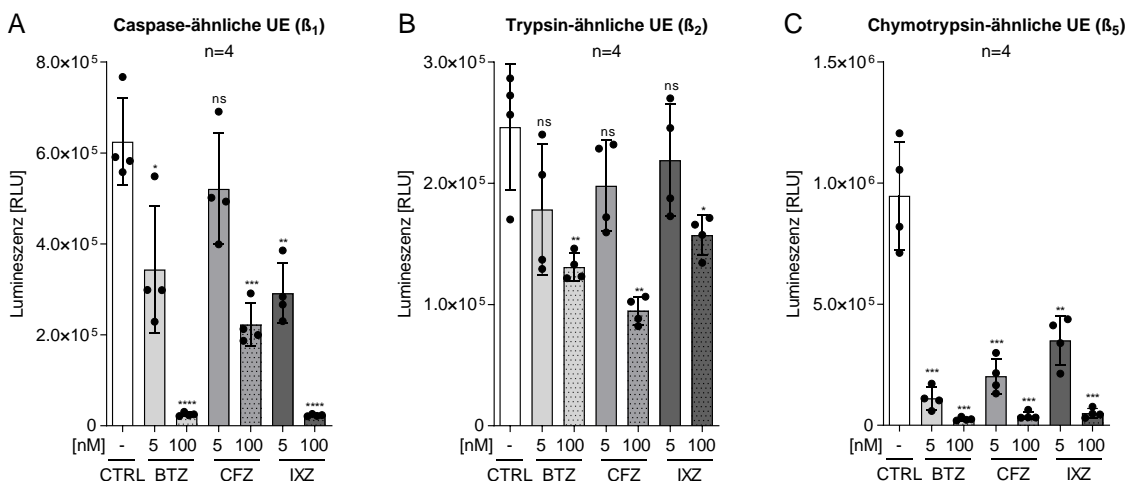


**Abbildung 18: Reduzierte Zelltod-Induktion bei *Knock-Down* von *BAK*, *BOK* und *PMAIP1* in *SW982/BAX<sup>KO</sup>*.** Nach Transfektion von *siBAK*, *siBOK* und *siPMAIP1* wurden die *SW982/BAX<sup>KO</sup>* am nächsten Tag mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ allein oder in Kombination für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Die höchste Zelltod-Reduktion wurde für den *Knock-Down* von *PMAIP1* mit ~40% Reduktion der Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen erzielt, während *siBAK* zu ~21% und *siBOK* zu ~13% Zelltod-Reduktion führte. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

## 6.6 Unterschiedliche Spezifitäten der PIs beeinflussen die ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion

Die bisherigen Ergebnisse zeigen Komponenten-spezifische Unterschiede zwischen den PIs, bei gleicher Konzentration von 5 nM. Die unterschiedliche Effizienz der PIs ist möglicherweise auf die spezifische Inhibition der proteolytisch aktiven UE des Proteasoms zurückzuführen. BTZ und IXZ blockieren die  $\beta_1$ - und  $\beta_5$ -UE des 26S Proteasoms, während CFZ die  $\beta_2$ - und  $\beta_5$ -UE blockiert (Besse *et al.* 2019). Um zu analysieren, ob die Protease-Spezifität der PIs der Grund für die Unterschiede in der Zelltod-Induktion ist, wurden die mit dem Proteasomkomplex verbundenen Proteaseaktivitäten der  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_5$ -UE mittels des Proteasome-Glo Substrat-Assays bestimmt. *SW982/WT*-Zellen wurden für 4 h mit 5 nM oder 100 nM der jeweiligen PIs inkubiert, anschließend mit den entsprechenden Substraten für die proteasomalen UE versetzt und nach 5 min die Lumineszenz ermittelt. 100 nM BTZ oder IXZ zeigten eine komplette Reduktion des Lumineszenzsignals der  $\beta_1$ -UE, während das Lumineszenzsignal der  $\beta_1$ -UE bei 100 nM CFZ um ~57% gesenkt wurde (Abbildung 19 A). Auch 5 nM BTZ oder IXZ reduzierten

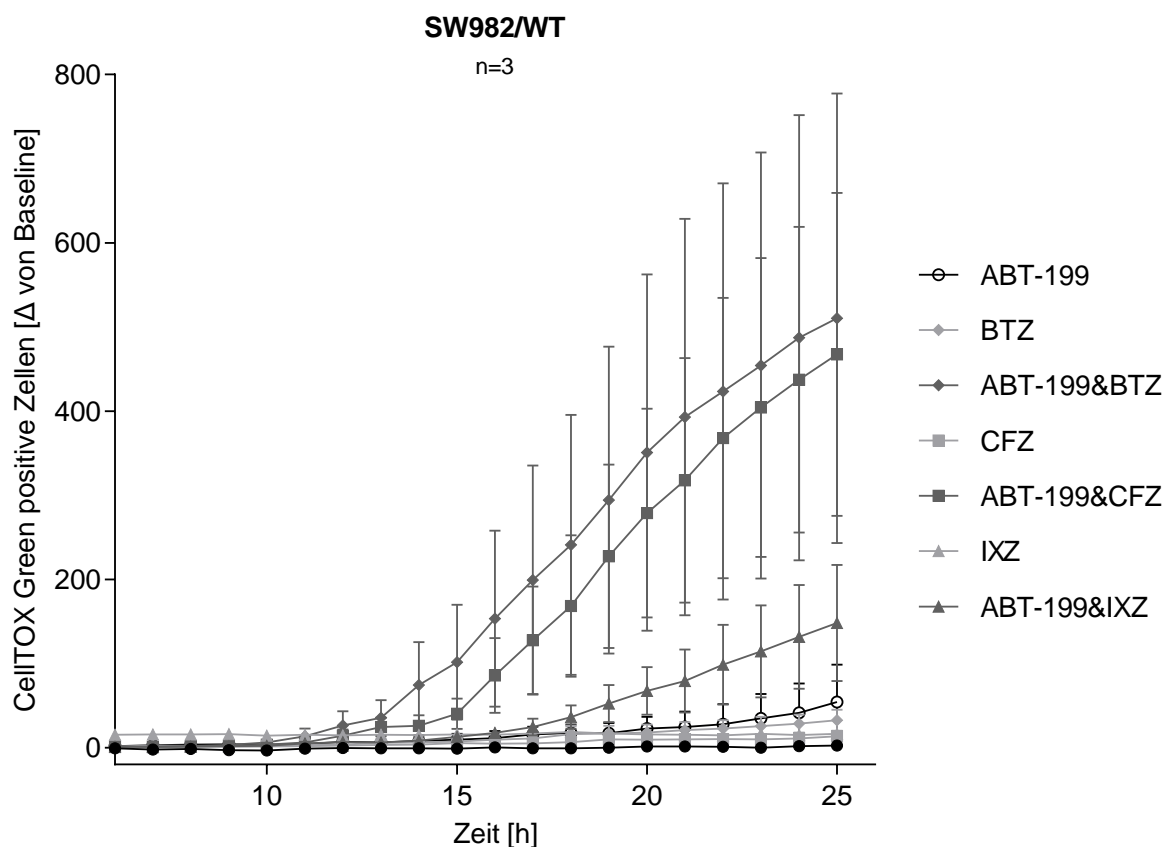
im Vergleich zu 5 nM CFZ erneut das Lumineszenzsignal der  $\beta_1$ -UE signifikant. GleichermäÙen zeigten 100 nM CFZ die stärkste Reduktion des Lumineszenzsignals der  $\beta_2$ -UE, während 100 nM BTZ oder IXZ das Lumineszenzsignal der  $\beta_2$ -UE nur geringfügig senkten. Die Lumineszenzsignale der  $\beta_2$ -UE bei 5 nM PI waren untereinander vergleichbar und zeigten auch keine signifikante Reduktion des Lumineszenzsignals im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19 B). IXZ zeigte bei 5 nM die schwächste Abnahme des Lumineszenzsignals der  $\beta_5$ -UE, während bei 100 nM PI keine signifikante Differenz der PIs untereinander festgestellt wurde (Abbildung 19 C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bei der ABT-199&PI-vermittelten Zelltod-Induktion beobachteten Unterschiede teilweise auf die unterschiedliche Spezifität der PIs gegenüber der proteolytisch aktiven UE des Proteasoms zurückzuführen sind. Da die Aktivität der  $\beta_1$ -und  $\beta_2$ -UE für 5 nM PIs nur geringe Reduktionen widerspiegelte, scheint die stärkste Verringerung der Aktivität der  $\beta_5$ -UE für 5 nM PIs die wesentliche Rolle zu spielen.



**Abbildung 19: Unterschiedlich hervorgerufene Reduktion des Lumineszenzsignals der proteolytisch aktiven UE des Proteasoms durch die PIs.** SW982/WT-Zellen wurden zunächst für 4 h mit 5 nM oder 100 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ) inkubiert, anschließend das Proteasome-Glo Substrat hinzugefügt und das Lumineszenz-Signal nach 5 min ermittelt. Die stärkste Reduktion des Lumineszenzsignals bei 5 nM PI wurde für die  $\beta_5$ -UE festgestellt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=4.

Aufgrund der unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten der PIs wurde analysiert, inwieweit die Inhibition spezifischer UE des Proteasoms für eine mögliche synergistische Wirkung in Kombination mit ABT-199 eine Rolle spielen. Zusätzlich zur proteasomalen Aktivitätsbestimmung wurde deshalb die Zelltod-Induktion der PIs über eine Zeitkinetik bestimmt, um mögliche zeitversetzte Wirkungen der PIs hinsichtlich der erzielten Unterschiede in der Zelltod-Induktion nach 24 h für die PIs allein oder in Kombination mit ABT-199 zu analysieren. Hierfür wurde ABT  $\pm$  BTZ, CFZ oder IXZ auf die SW982/WT gegeben und in

Gegenwart von CellTOX Green über 25 h im *Cytation 1 Image Reader* aufgenommen. Dargestellt wurde die Differenz der CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen nach Abzug von der gemittelten Baseline von 0 h bis 5 h (Abbildung 20). In Übereinstimmung mit den bisher erzielten Ergebnissen zeigte die Kombination ABT-199&IXZ die geringste Zelltod-Induktion mit insgesamt ~148 CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen nach 24 h und einer von IXZ allein induzierten Apoptose unterscheidbare Zelltod-Induktion erst nach 19 h. ABT-199&CFZ induzierte schon nach 16 h einen von CFZ allein induzierten Apoptose unterscheidbaren Zelltod, der nach 25 h in ~467 CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen resultierte. Für ABT-199&BTZ konnte bereits nach 14 h eine von BTZ allein hervorgerufene Zelltod-Induktion unterschieden werden, die nach 25 h in ~510 CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen endete. Die Kombinationen ABT-199&BTZ und ABT-199&CFZ zeigten einen geringen Unterschied hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Zelltod-Induktion, was den nichtexistierenden Unterschied bei den durchflusszytometrischen Zelltod-Messungen bestätigte (Abbildung 20).

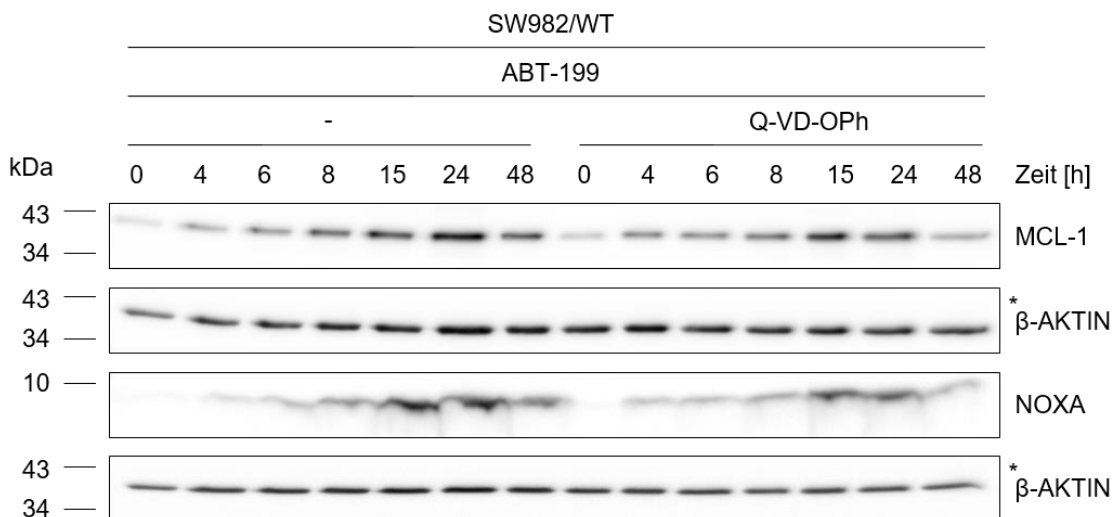


**Abbildung 20: Die PIs (BTZ, CFZ und IXZ) zeigen zeitversetzte Wirkungen und unterschiedlich stark hervorgerufene Zelltod-Induktionen in Kombination mit ABT-199.** Für die dargestellte Zeitkinetik über 25 h wurden SW982/WT-Zellen mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ) inkubiert und in Anwesenheit von CellTOX Green Fluoreszenz-Aufnahmen im *Cytation 1 Image Reader* durchgeführt. Die Kombination ABT-199&IXZ resultierte nach 25 h in nur ~148 CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen, während ABT-199&CFZ zu ~467 CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen und ABT-199&BTZ zu ~510 CellTOX Green<sup>+</sup>

Zellen führten. Dargestellt ist die Differenz der CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt mit Abzug der gemittelten Baseline (0)  $\pm$  SD; n=3.

## 6.7 Partielle TP53-abhängige Induktion von NOXA

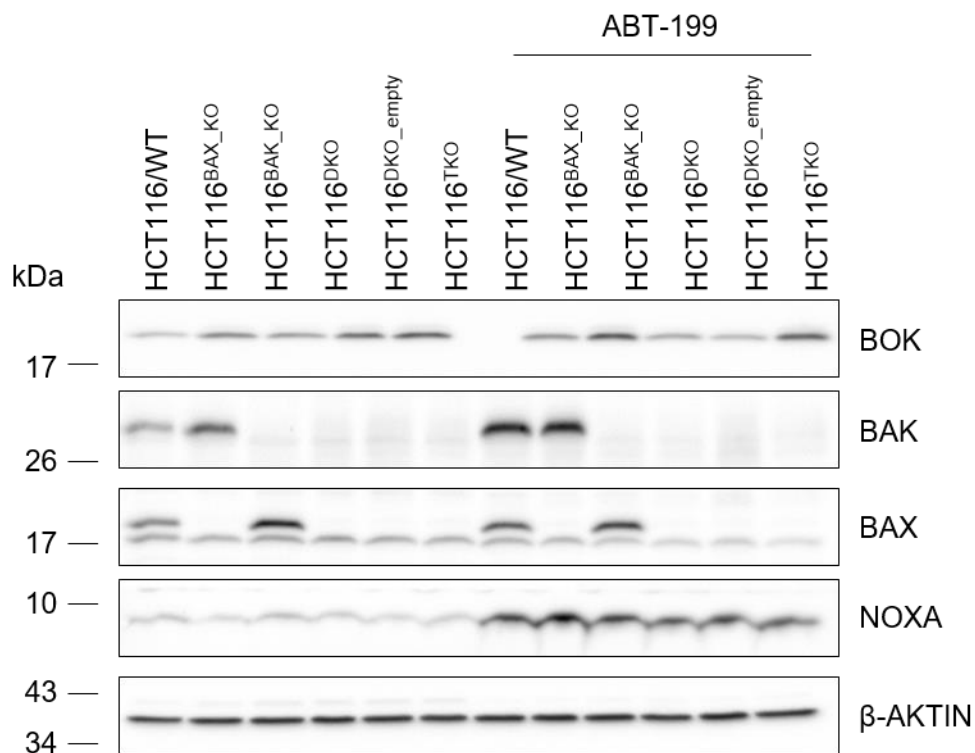
Die verstärkte Expression von NOXA nach Proteasom-Inhibition allein oder in Anwesenheit von ABT-199 und die Zelltod-Reduktion nach *Knock-Down* von *PMAIP1*/NOXA belegt eine essenzielle Rolle von NOXA. Die Expression von TP53 wird, ebenso wie NOXA, posttranskriptionell über proteasomale Degradation reguliert und *PMAIP1* ist ein TP53-induzierbares Gen (Ashcroft und Vousden 1999; Djajawi *et al.* 2020; Marine und Lozano 2010). Aufgrund dessen sollte im Folgenden geklärt werden, ob die Stabilisierung und erhöhte Expression von TP53 der Grund für die Induktion von NOXA ist. Mit Hilfe einer Western Blot Analyse wurde die NOXA-Expression in Gegenwart von ABT-199 in An- und Abwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh untersucht, um zu überprüfen, ob NOXA *Upstream* der Caspasen liegt. Dazu wurden SW982/WT-Zellen mit/ohne 10  $\mu$ M Q-VD-OPh inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. NOXA wurde zeitabhängig durch ABT-199 induziert, wobei nach 15 h die höchste NOXA-Expression sichtbar war (Abbildung 21). Anschließend wurde NOXA in Übereinstimmung mit der Literatur synchron zu MCL-1 (Nakajima *et al.* 2014; Pang *et al.* 2014) abgebaut. Des Weiteren konnte kein Unterschied der NOXA-Expression in An- oder Abwesenheit von Q-VD-OPh festgestellt werden. Die NOXA-Induktion ist also unabhängig und erfolgt oberhalb der Caspasen-Aktivierung.



**Abbildung 21: Das BH3-only Protein NOXA liegt *Upstream* der Caspasen.** SW982/WT-Zellen wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  10  $\mu$ M Q-VD-OPh für die entsprechenden Zeiten inkubiert und anschließend die Lysatproben nach Ernte der Zellen hinsichtlich der NOXA-Expression mittels Western Blot Analyse untersucht. Die NOXA-Expression zeigte keine Veränderung in Bezug auf die An- oder Abwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh und liegt somit *Upstream* der Caspasen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. Die

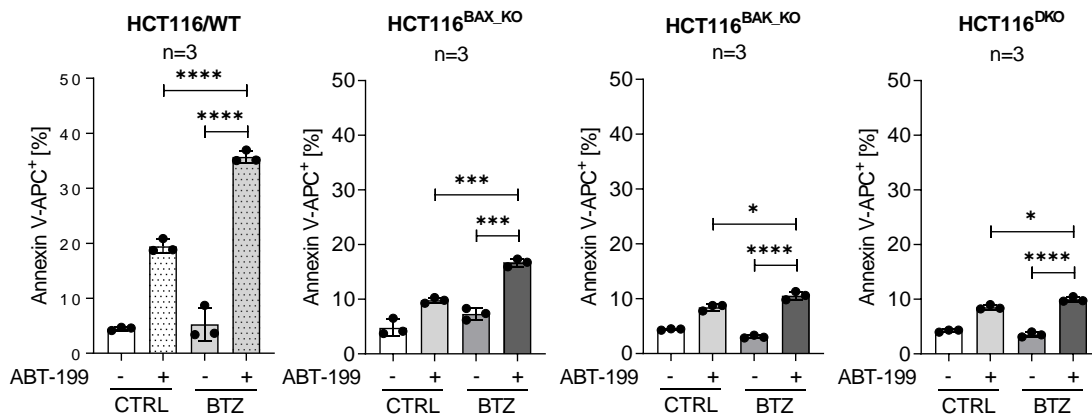
Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden der Membran entstanden sind.

Um zu analysieren, ob die Induktion von NOXA eine Konsequenz der BAX/BAK-induzierten MOMP und Apoptose ist, wurden HCT116-Zellen mit den *Knock-Outs* der zwei Effektorproteine für 8 h mit ABT-199 inkubiert und die Protein-Expressionen mittels Western Blot analysiert. Die NOXA-Expression war ausnahmslos in Gegenwart von ABT-199 erhöht. In allen KO-Linien war die erhöhte NOXA-Expression gleich, unabhängig vom KO der Effektorproteine BAX, BAK und/oder BOK (Abbildung 22). Außerdem zeigte die durchflusszytometrische Messung der HCT116-Zellen nach 24 h Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM BTZ eine Reduktion des Zelltods für den BAX- bzw. BAK-KO (Abbildung 23). Bei Abwesenheit von BAX wurde eine Reduktion des ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltods von 36% auf 19% festgestellt, bei *Knock-Out* von BAK eine Reduktion von 36% auf 11% und bei Defizit beider Effektor-Proteine BAX und BAK kam es zu einer Verringerung der Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen von 36% auf 10%. Somit kann gesagt werden, dass die Induktion von NOXA durch ABT-199 der MOMP und Apoptose vorgelagert ist.



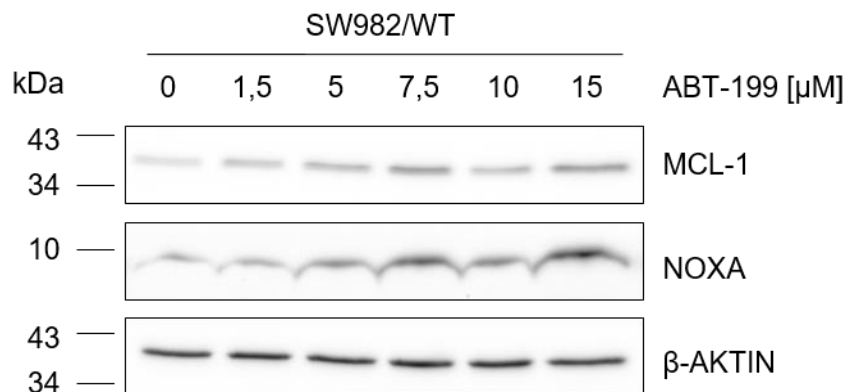
**Abbildung 22: ABT-199 erhöht die NOXA-Expression unabhängig vom KO der Effektorproteine BAX, BAK und/oder BOK.** HCT116/WT und die korrespondierenden KO-Linien (HCT116<sup>BAX\_KO</sup>, HCT116<sup>BAK\_KO</sup>, HCT116<sup>DKO</sup>, HCT116<sup>DKO\_empty</sup> und HCT116<sup>TKO</sup>) wurden mit und ohne 15  $\mu$ M ABT-199 für 8 h inkubiert und das Protein-Level von NOXA mittels Western Blot analysiert (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh). Die erhöhte Induktion von NOXA durch ABT-199 war unabhängig von den Effektorproteinen BAX, BAK und/oder BOK und ist somit der MOMP und Apoptose vorgelagert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei

unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle. Die Membran wurde in zwei Teile geschnitten und BAX, BAK und BOK nacheinander auf derselben Membran detektiert.



**Abbildung 23: Reduktion des ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltods in Abwesenheit von BAX und/oder BAK.** HCT116/WT und die etablierten KO-Zelllinien HCT116<sup>BAX\_KO</sup>, HCT116<sup>BAK\_KO</sup> und HCT116<sup>DKO</sup> wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ allein oder in Kombination für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Die *Knock-Outs* von BAX, BAK und BAX/BAK führten bei ABT-199&BTZ-Inkubation zu signifikanten Zelltod-Reduktionen im Vergleich zu HCT116/WT. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Da interessanterweise die alleinige Inkubation von ABT-199 eine stärkere NOXA-Expression als die alleinige Applikation von PIs hervorrief, wurden SW982/WT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an ABT-199 für 8 h inkubiert und erneut die NOXA-Expression mittels Western Blot analysiert. Das Ergebnis zeigt die Konzentrations-abhängige NOXA-Induktion mit stärkster Expression bei 15  $\mu$ M ABT-199 (Abbildung 24). Höhere Konzentrationen an ABT-199 wurden nicht analysiert.



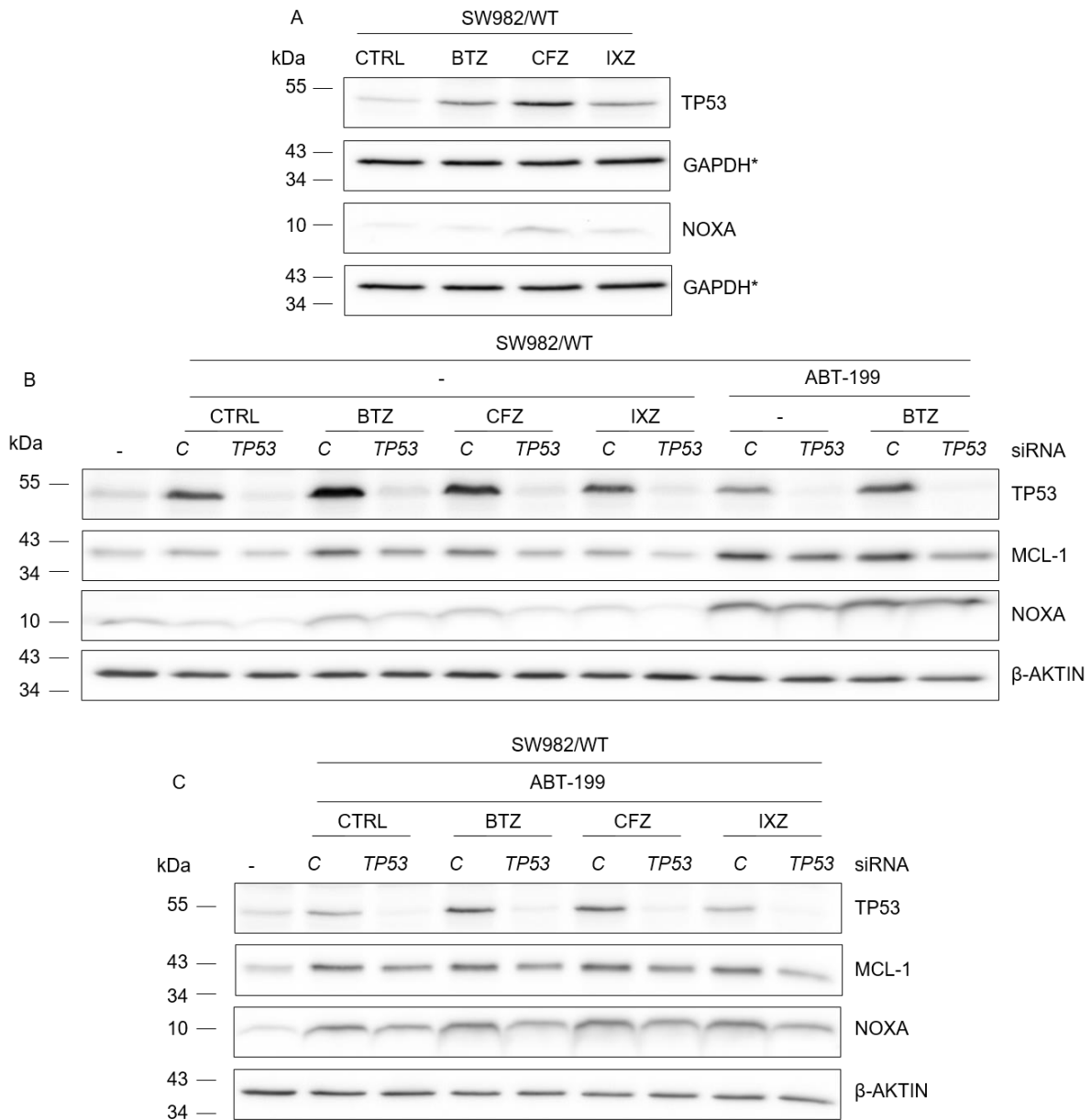
**Abbildung 24: Konzentrations-abhängige NOXA-Induktion.** SW982/WT wurden mit steigenden Konzentrationen an ABT-199 für 8 h inkubiert und anschließend mittels Protein-Detektion die NOXA-Induktion analysiert (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh). Es konnte eine Konzentrations-

abhängige NOXA-Induktion bei steigenden ABT-199-Konzentrationen festgestellt werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

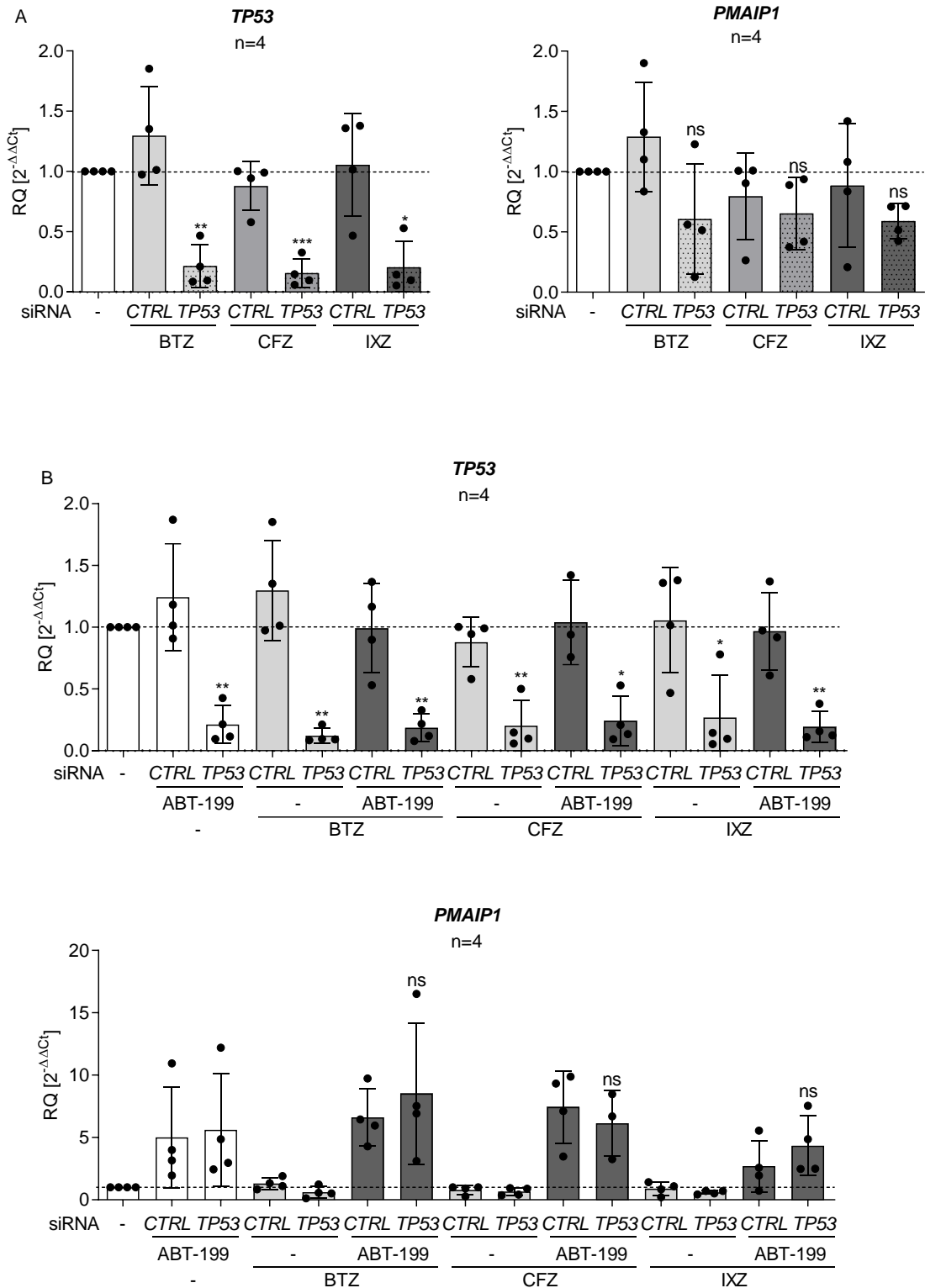
Auch die in der Literatur beschriebene NOXA-Stabilisierung durch Proteasom-Inhibition wurde bestätigt (Djajawi *et al.* 2020), wenngleich die PIs die NOXA-Expression nur vergleichsweise schwach verstärkten. In Abbildung 25 A wird ersichtlich, dass IXZ die Bandenintensität der NOXA-Expression am geringsten erhöhte, während BTZ eine stärkere NOXA-Akkumulation verursachte. Die stärkste Bandenintensität wurde durch Inkubation mit CFZ erzielt.

Um zu überprüfen, ob PI-stabilisiertes TP53 der Grund für die NOXA-Induktion ist, wurde bei *Knock-Down* von TP53 die NOXA-Expression nach Inkubation mit PIs  $\pm$  ABT-199 untersucht. Hierfür wurde SW982/WT mit siTP53 transfiziert und nach 24 h mit PI und/oder ABT-199 für 8 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert und das Transkript-Level an PMAIP1 über eine qRT-PCR ermittelt. Nach alleiniger Inkubation mit den PIs und TP53-Knock-Down sank zwar die NOXA-Expression, in Anwesenheit von ABT-199 hatte die PI-vermittelte Stabilisierung von TP53 jedoch nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die NOXA-Expression (Abbildung 25 B und C). In Übereinstimmung mit den Western Blot Ergebnissen zeigte auch das PMAIP1-Transkript-Level nach *Knock-Down* von TP53 keine signifikante Reduktion der PMAIP1-mRNA (Abbildung 26 A). Erstaunlicherweise wurde für ABT-199 (allein und verstärkt in Kombination mit PIs) eine stärkere PMAIP1-Induktion (Abbildung 26 B) und NOXA-Expression (Abbildung 25 C) festgestellt. Die durch ABT-199 (allein und verstärkt in Kombination mit PIs) induzierte PMAIP1/NOXA-Expression lässt sich nicht auf den verminderten Abbau von NOXA zurückführen. Die durchflusszytometrisch ermittelte Zelltod-Induktion (Annexin V-APC und TMRM-Färbung) nach TP53-Knock-Down weist des Weiteren auf einen geringen Einfluss von TP53 in der ABT-199&BTZ-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion hin. Nach *Knock-Down* von TP53 wurden weiterhin  $>90\%$  Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> gefärbte Zellen gemessen (Abbildung 26).



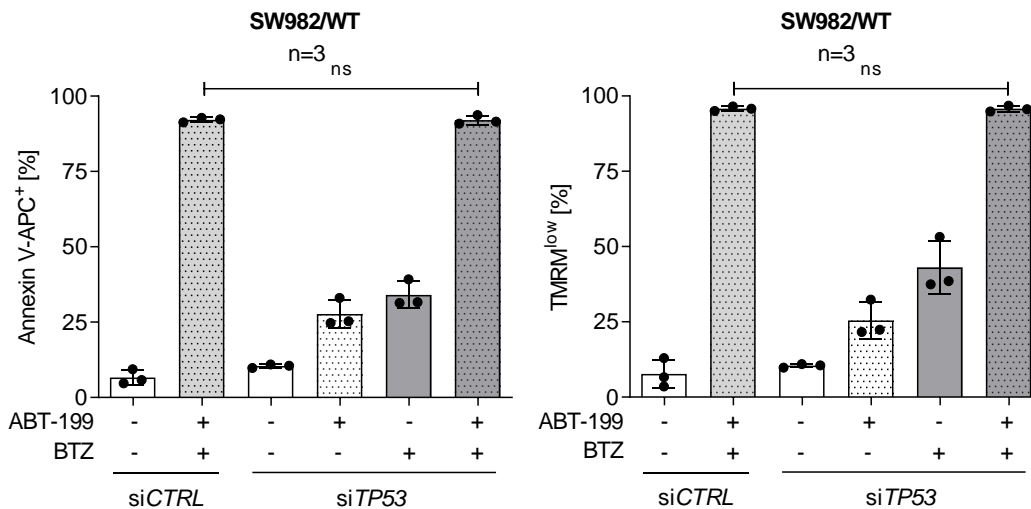


**Abbildung 25: Teilweise TP53-abhängige Induktion von NOXA.** SW982/WT-Zellen wurden mit 5 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ; +10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und anschließend die Expression von TP53 und NOXA analysiert. A) Die Inkubation mit den PIs stabilisierte TP53 und NOXA. B und C) Nach Transfektion der SW982/WT-Zellen mit 50 nM siTP53 wurden die Zellen nach 24 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM PI (BTZ, CFZ oder IXZ; +10  $\mu$ M QV-D-OPh) für 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Proteinlysate mittels Western Blot untersucht. Die durch ABT-199 allein und in Kombination mit PIs induzierte NOXA-Expression wurde durch *Knock-Down* von TP53 nur geringfügig reduziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH (A) oder  $\beta$ -AKTIN (B und C) dienten als Ladekontrollen. A) Die Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden der Membran entstanden sind.



**Abbildung 26: Partuell abhängige TP53-regulierte PMAIP1-Induktion.** A und B) SW92/WT-Zellen wurden nach Transfektion mit 50 nM siTP53 am darauffolgenden Tag mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM PI (BTZ, CFZ, IXZ; +10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und mittels qRT-PCR das mRNA-Level an PMAIP1 und TP53 bestimmt. Die Proben sind aus den gleichen Ansätzen wie die Western Blot Proben aus Abbildung 25 C generiert worden. Es ließ

sich keine signifikante Reduktion der *PMAIP1*-Expression nach *TP53*-*Knock-Down* feststellen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD;  $n=4$ .

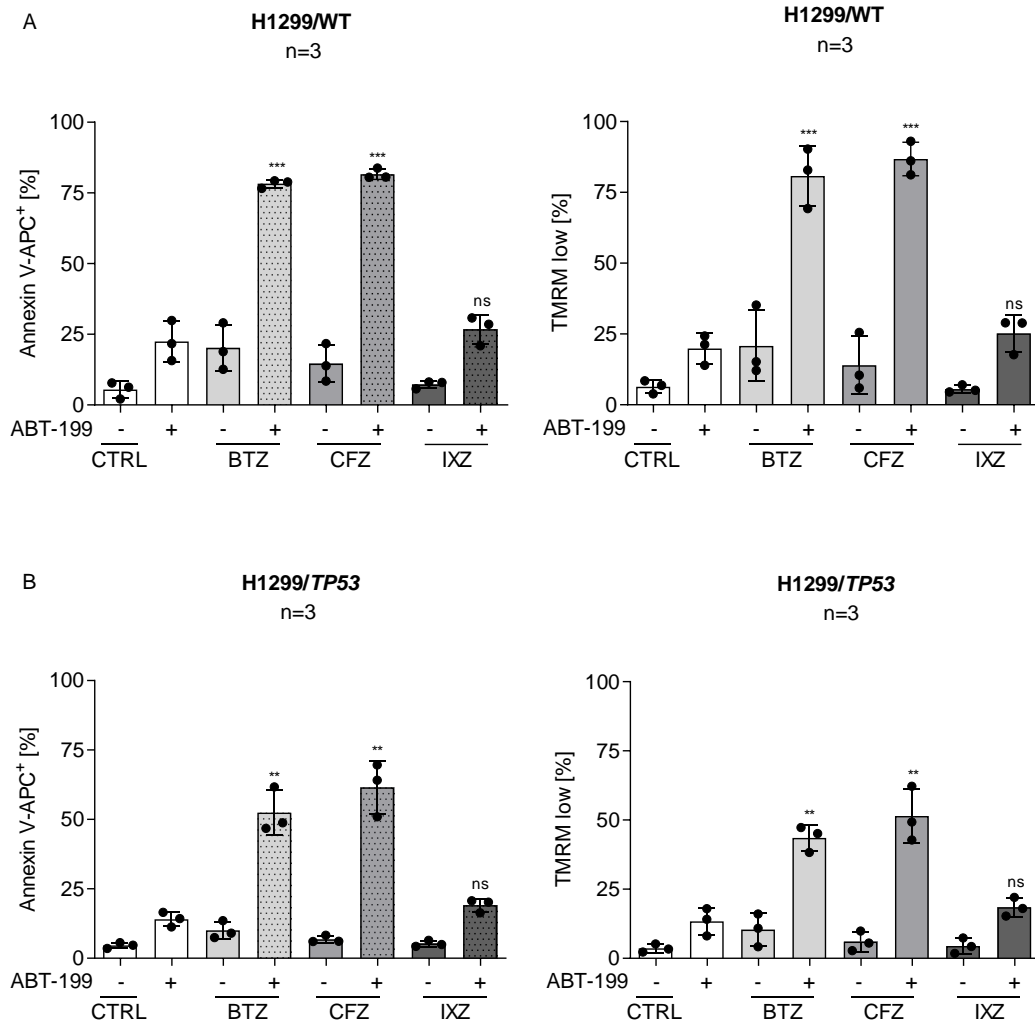


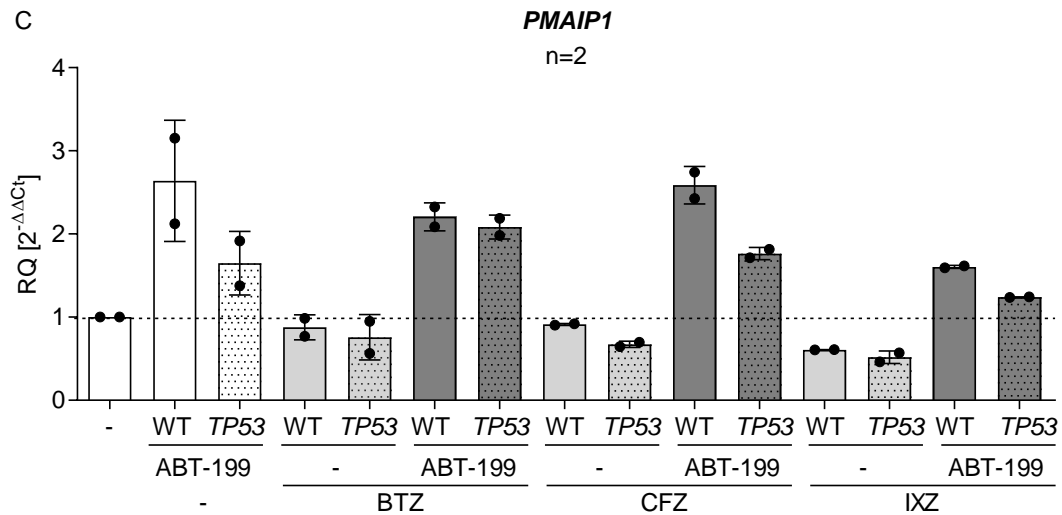
**Abbildung 27: Anhaltende Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ trotz *Knock-Downs* von *TP53*.** SW982/WT wurden nach *Knock-Down* mittels 50 nM siRNA gegen *TP53* mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM BTZ inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen bestimmt. Nach *TP53*-*Knock-Down* war der synergistisch induzierte Zelltod durch ABT-199&BTZ unverändert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD;  $n=3$ .

Zusammenfassend hat *TP53* einen vernachlässigbaren Einfluss auf die ABT-199&PI-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion im verwendeten Modell und weist auf eine *TP53*-unabhängige Induktion von NOXA hin. Die vorgeschlagene *TP53*-unabhängige NOXA-Induktion wird von Experimenten in der nichtkleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 untermauert. Sowohl in der *TP53* deletierten parentalen Linie (H1299/WT) als auch in einer H1299-Zelllinie mit rekonstituierter *TP53*-Expression (H1299/*TP53*) induzierte ABT-199&PI synergistisch Apoptose (Abbildung 28 A und B). Während sich die H1299/WT-Zelllinie in Bezug auf synergistisch induzierte Apoptoser mit den SW982/WT-Zellen in allen Kombinationen vergleichen ließ, zeigte die H1299/*TP53*-Zelllinie mit gleicher Tendenz der Zelltod-Induktion durch ABT-199&PIs insgesamt zwischen 10 – 30% höhere Zellviabilität. Zudem war die NOXA-Induktion auf mRNA- (Abbildung 28 C) und Protein-Ebene (Abbildung 29 A und B) ebenfalls wie bei den SW982/WT bei alleiniger Inkubation von ABT-199 und in Kombination mit den PIs stärker. Die Ergebnisse bestätigen, dass ABT-199 die Induktion von NOXA unabhängig von der betrachteten Zelllinie und dem jeweiligen *TP53*-Status hervorruft und die ABT-199&PI-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion begründet.

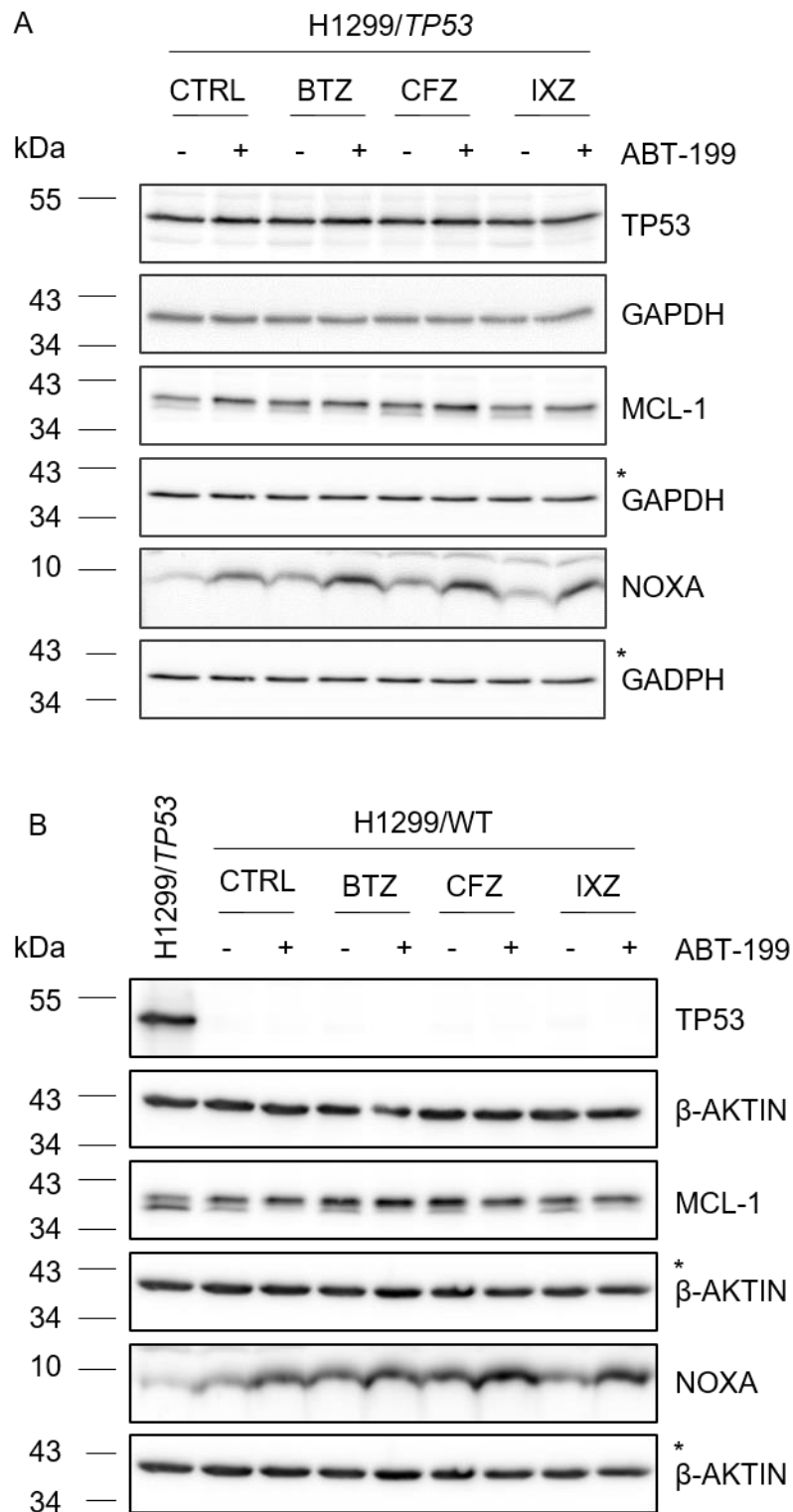
Des Weiteren wurde bei der Analyse der NOXA-Expression in den H1299/WT und H1299/*TP53* bei Betrachtung von MCL-1, dem Antagonisten von NOXA, eine MCL-1-

Doppelbande nachgewiesen (Abbildung 29). Die reproduzierbar nachgewiesene MCL-1-Doppelbande veränderte sich in Anwesenheit von ABT-199 - die untere MCL-1-Bande (=MCL-1<sub>s</sub>) ist nicht mehr nachweisbar. Im Kontroll-Ansatz und bei alleiniger Inkubation mit den PIs war sowohl die höhere MCL-1-Bande (=MCL-1<sub>l</sub>) als auch die MCL-1<sub>s</sub>-Form erkennbar. Dieser interessante Befund wurde in geringem Umfang weiter analysiert (Kapitel 6.11).





**Abbildung 28: Zelllinien- und TP53-Status-unabhängige Zelltod-Induktion.** H1299/WT und H1299/TP53 wurden in Anwesenheit von 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM PI (BTZ, CFZ, IXZ; 10  $\mu$ M Q-VD-OPh) inkubiert. Nach 8 h wurde das *PMAIP1*-Transkript-Level mittels qRT-PCR bestimmt und nach 24 h durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen bestimmt. A und B) H1299/WT und H1299/TP53 verhielten sich hinsichtlich der Zelltod-Induktion durch ABT-199&PIs vergleichbar zu den SW982/WT. C) H1299/WT- und H1299/TP53-Zellen lieferten vergleichbare *PMAIP1*-Transkript-Level, was auf eine TP53-unabhängige NOXA-Induktion schließen lässt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3 (A und B); n=2 (C).

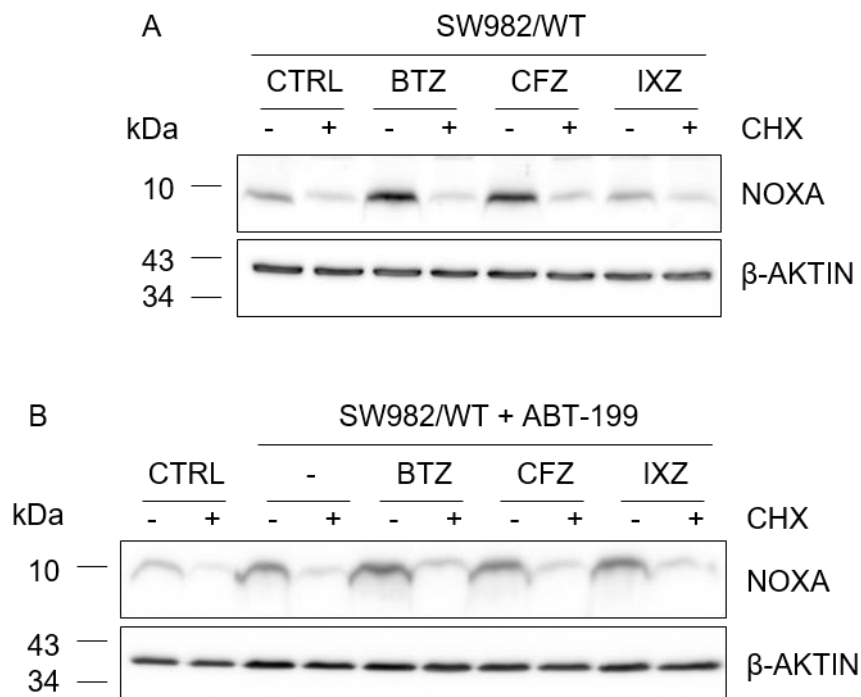


**Abbildung 29: Teilweise *TP53*-vermittelte NOXA-Expression.** H1299/WT und H1299/*TP53* wurden mit 15  $\mu$ M ABT-100  $\pm$  5 nM PI (BTZ, CFZ, IXZ; 10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und die Proteinexpressionen mittels Western Blot analysiert. A und B) Beide H1299-Zelllinien (mit defizientem *TP53* oder mit rekonstituiertem *TP53*) zeigten vergleichbare NOXA-Expressionen, unabhängig von der *TP53*-Expression. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, GAPDH (A) oder  $\beta$ -AKTIN (B) diente als Ladekontrolle. Die Sternchen definieren identische Western Blot Membranen, die durch Schneiden und Strippen mit erneuter Antikörper-Inkubation der Membranen entstanden sind.

## 6.8 Größtenteils TP53-unabhängige Induktion von NOXA

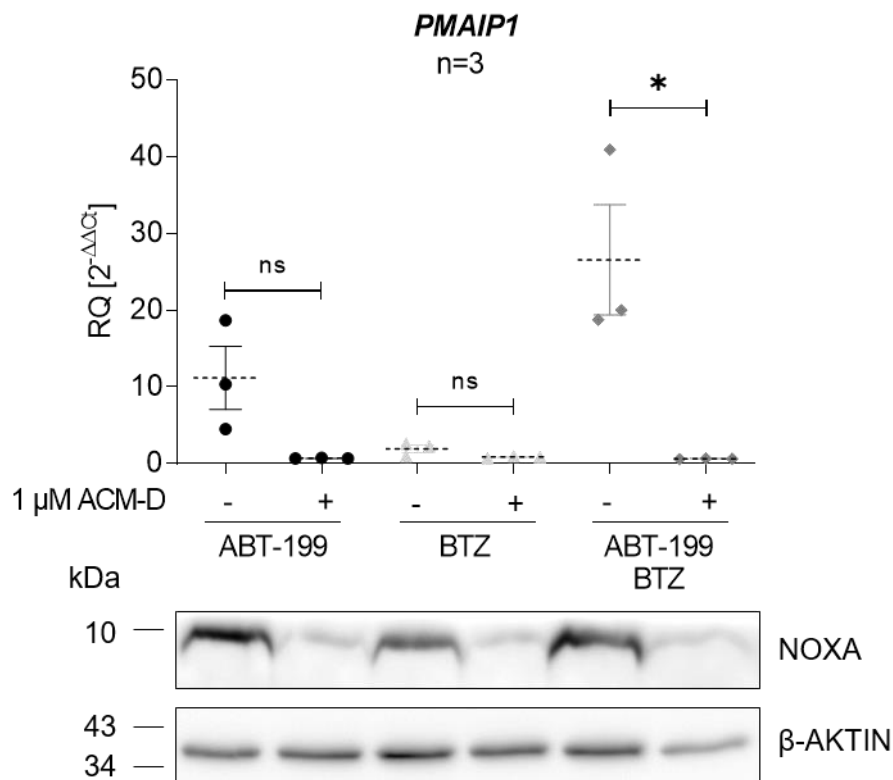
Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen größtenteils TP53-unabhängigen Mechanismus der NOXA-Induktion hin, da weder der *TP53 Knock-Down* in SW982/WT noch der vollständige Verlust von *TP53* in H1299/WT zu signifikanter Veränderung der NOXA-Induktion führte (Kapitel 6.7). Die NOXA-Induktion wird vorrangig von ABT-199 hervorgerufen und kommt nicht ausschließlich durch Proteasom-Inhibition zustande. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Induktion von NOXA auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene reguliert wird. Hierzu wurde einerseits die Protein-Neusynthese durch CHX und andererseits die Transkription/mRNA-Expression durch ACM-D blockiert. SW982/WT wurden mit 15  $\mu\text{M}$  ABT-199  $\pm$  5 nM PI in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  CHX für 8 h inkubiert und anschließend die Expression von NOXA mittels Western Blot analysiert.

Abbildung 30 A illustriert, dass CHX die durch PIs induzierte NOXA-Expression blockierte. Die verstärkte NOXA-Expression basierte in diesem Setup auf der Protein-Neusynthese. Zusätzlich wurde die verstärkte NOXA-Expression nach ABT-199 Inkubation (mit und ohne PI) durch CHX verhindert (Abbildung 30 B) und bestätigte somit ebenso die auf Protein-Neusynthese basierte NOXA-Induktion.



**Abbildung 30: CHX blockiert effizient die NOXA-Expression.** SW982/WT-Zellen wurden mit 5 nM PI (BTZ, CFZ, IXZ; 10  $\mu\text{M}$  Q-VD-Oph)  $\pm$  15  $\mu\text{M}$  ABT-199 und  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  CHX für 8 h inkubiert und die Proben mittels Western Blot analysiert. A und B) Die durch ABT-199&PI-induzierte NOXA-Expression wurde durch CHX-Zugabe effizient blockiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

Weiterhin wurde die NOXA-Induktion durch ABT-199 auf transkriptioneller Ebene untersucht. SW982/WT-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von ACM-D mit ABT-199 allein und/oder in Kombination mit BTZ inkubiert und anschließend die Protein-Expression mit Hilfe von Western Blot als auch die mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Überraschenderweise induzierte ABT-199 die mRNA-Expression von *PMAIP1* um das 10-fache, die wiederum bei Kombination mit BTZ erneut verstärkt wurde (25-fach) (Abbildung 31). Interessanterweise wurde die festgestellte Induktion von *PMAIP1*/NOXA durch ABT-199 ± BTZ in Anwesenheit von ACM-D komplett blockiert. Es kann geschlossen werden, dass ABT-199 die Transkription von *PMAIP1* vermittelt.

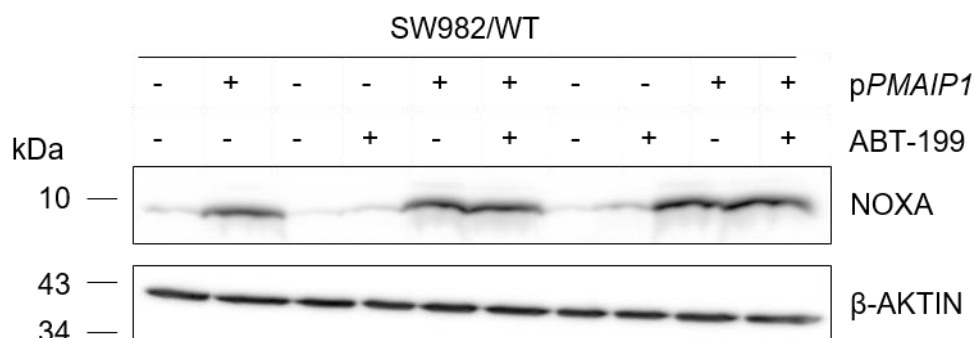


**Abbildung 31: ABT-199 vermittelt die transkriptionelle Induktion von *PMAIP1*.** Für die qRT-PCR und Western Blot Analyse wurden SW982/WT mit 15 μM ABT-199 und/oder 5 nM BTZ (+10 μM Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und anschließend die mRNA-Expression von *PMAIP1* und die Protein-Expression von NOXA in An- und Abwesenheit von 1 μM ACM-D bestimmt. Die Anwesenheit von ACM-D inhibierte signifikant die durch ABT-199 ± BTZ-vermittelte *PMAIP1*/NOXA-Expression. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD; n=3, β-AKTIN diente als Ladekontrolle.

Der Einfluss von ABT-199 auf die transkriptionelle Regulation von NOXA wurde weiterhin mit Hilfe transgener NOXA-Expression untersucht. SW982/WT-Zellen wurden mit einem konstitutiv aktivem NOXA-Plasmid (*pPMAIP1*) transfiziert und 24 h später für 8 h mit ABT-199 inkubiert. Die Analyse mittels Western Blot (Abbildung 32) bestätigte die hier erstmals beschriebene transkriptionelle Induktion von *PMAIP1* bzw. endogenem NOXA durch ABT-199;



die Expression des transgenen NOXA blieb nach Inkubation mit ABT-199 unverändert. Hierdurch wird wiederum bestätigt, dass die erhöhte NOXA-Expression nicht durch post-transkriptionelle oder post-translationale Mechanismen hervorgerufen wird.

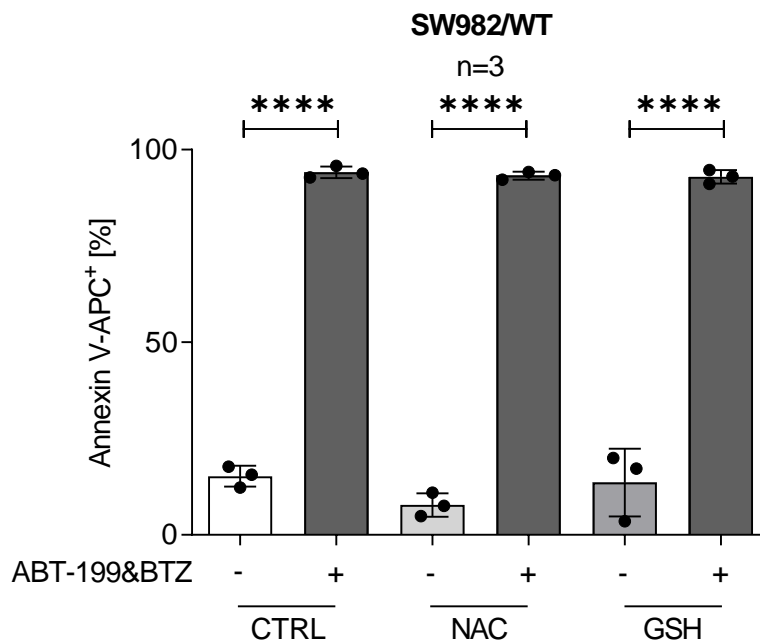


**Abbildung 32: ABT-199 verändert die transgene Expression von NOXA nicht.** Für die Untersuchung des Einflusses von ABT-199 auf die transkriptionelle Regulation von NOXA wurden SW982/WT-Zellen mit 2 µg des TET-induzierbaren Plasmids pHV Ad2 TRE-Puro myc Noxa und 0,5 µg des pTET-OFF-Plasmids mittels des Transfektionsreagenzes PEI im Verhältnis 1:6 (DNA:PEI) co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 15 µM ABT-199 (+10 µM Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und anschließend die NOXA-Expression mittels Western Blot untersucht. Es ließ sich eine transkriptionelle Induktion von *PMAIP1* bzw. endogenem NOXA durch ABT-199 feststellen, während die transgene Expression von NOXA unverändert blieb. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, β-AKTIN diente als Ladekontrolle.

## 6.9 Potentielle Mechanismen der *PMAIP1/NOXA*-Induktion

Die Entdeckung, dass ABT-199 die Expression von NOXA durch einen Transkriptions- und Translations-abhängigen Mechanismus, unabhängig von TP53, stark induziert, wirft die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus der *PMAIP1/NOXA*-Induktion auf. Bajpai *et al.* und weitere Arbeitsgruppen beschreiben die durch ABT-199 hervorgerufene Dysregulation des Mitochondriums (Bajpai *et al.* 2020; Roca-Portoles *et al.* 2020; Sharon *et al.* 2019). Eine Dysregulation des Mitochondriums geht häufig mit gesteigerter ROS-Produktion einher. In Publikationen der Arbeitsgruppe wurde bereits 2019 beschrieben, dass eine Dysregulation des Mitochondriums zu gesteigerter ROS-Produktion führt (Kleih *et al.* 2019). Um zu analysieren, ob die ROS-Produktion der Grund für die *PMAIP1/NOXA*-Induktion ist, wurden SW982/WT-Zellen für 2 h mit den Radikalfängern GSH oder NAC inkubiert, für weitere 24 h in Anwesenheit von ABT-199&BTZ kultiviert und anschließend der Zelltod durchflusszytometrisch analysiert.

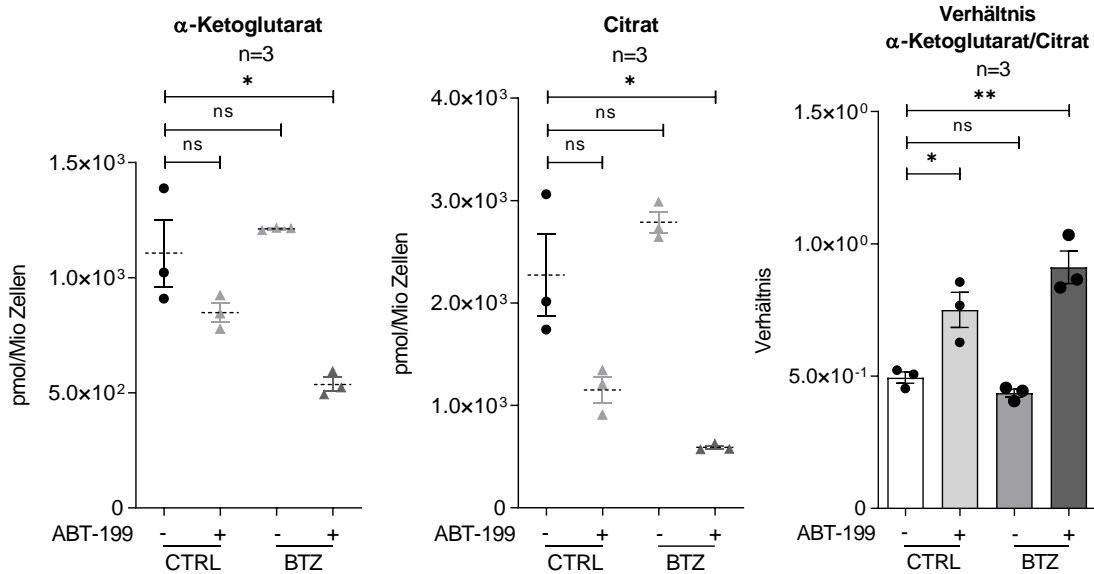
Weder NAC noch GSH reduzierten den ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod (Abbildung 33); in allen Ansätzen waren weiterhin ~98% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen. Hieraus wird geschlossen, dass ROS in diesem Setup keine Rolle bei der Zelltod-Induktion spielt und ABT-199&BTZ keine ROS-abhängige Apoptose einleitet.



**Abbildung 33: ABT-199&BTZ vermitteln keine ROS-abhängige Apoptose.** SW982/WT-Zellen wurden mit 2 mM GSH oder 2 mM NAC für 2 h vor-inkubiert und in Gegenwart von 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ für 24 h inkubiert und durchflusszytometrisch der Anteil an Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Weder GSH noch NAC reduzierten den durch ABT-199&BTZ induzierten Zelltod. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Roca-Portoles *et al.* beschreiben, dass ABT-199 mitochondriales metabolisches *Reprogramming* induziert und zu reduktiver Carboxylierung führt (Roca-Portoles *et al.* 2020). ABT-199 reduziert hierbei die Aktivität der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette. Die resultierende reduktive Carboxylierung wird durch ein ansteigendes Verhältnis von  $\alpha$ -KG zu Citrat definiert. Um eine mögliche reduktive Carboxylierung nach ABT-199 Inkubation im betrachteten Modellsystem zu untersuchen, wurden die relativen Mengen der Metabolite  $\alpha$ -KG und Citrat in der analytischen Abteilung Massenspektrometrisch bestimmt. Hierzu wurden SW982/WT 24 h mit ABT-199  $\pm$  BTZ inkubiert und in den gewonnenen Zellextrakten mittels GC-MS die Metabolit-Level von  $\alpha$ -KG und Citrat ermittelt (Maier *et al.* 2008).

Die GC-MS-Analyse bestätigte ein signifikant höheres Verhältnis von  $\alpha$ -KG:Citrat nach Inkubation mit ABT-199 und verstärkt nach ABT-199&BTZ und belegt so das mitochondriale metabolische *Reprogramming* (Abbildung 34).

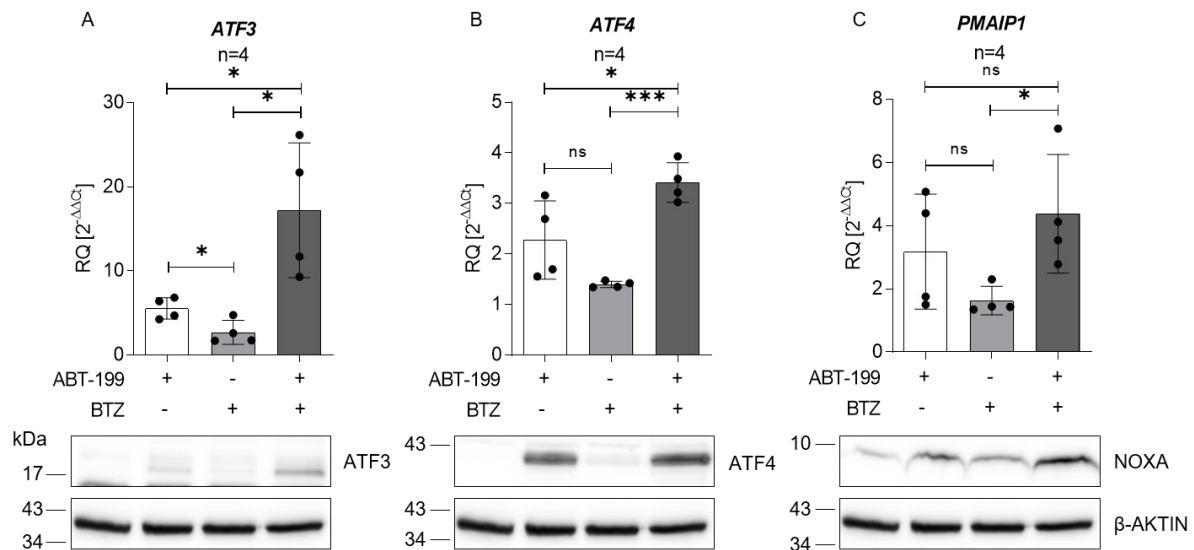


**Abbildung 34: Das signifikant ansteigende Verhältnis von  $\alpha$ -KG:Citrat bestätigt die Induktion des mitochondrialen metabolischen *Reprogrammings*.** Für die Analyse der relativen Metabolit-Level an  $\alpha$ -KG und Citrat wurden SW982/WT für 24 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM BTZ (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) inkubiert und die Zellen anschließend geerntet. Die Metabolit-Level von  $\alpha$ -KG und Citrat wurden mittels GC-MS bestimmt. ABT-199 allein und in Kombination mit BTZ führte zu signifikant ansteigendem Verhältnis an  $\alpha$ -KG:Citrat (reduktive Carboxylierung) und bestätigte somit die Induktion des mitochondrialen metabolischen *Reprogrammings*. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3.

Weiterhin beschreiben Bajpai *et al.*, dass die Inhibition der Atmungskette und die damit einhergehende reduzierte Aktivitäten der Atmungsketten-Komplexe I und II über die Aktivierung des ISR-Signalwegs die Expression des Transkriptionsfaktors ATF4 induziert (Bajpai *et al.* 2020). ATF4 kann ebenso wie ATF3 an den Promotor von *PMAIP1* binden und die Expression von *PMAIP1/NOXA* verstärken (Sharma *et al.* 2018). Um eine mögliche Aktivierung der ISR durch ABT-199 zu analysieren, wurden SW982/WT-Zellen für 8 h mit ABT-199 allein und/oder in Kombination mit BTZ inkubiert und die *ATF3* und *ATF4* mRNA- und Protein-Expression mittels *qRT-PCR* und Western Blot untersucht.

Die Proteasom-Inhibition zeigte keinen Einfluss auf die mRNA- oder Protein-Expression von *ATF3* und *ATF4*, wohingegen ABT-199 die Transkription von *ATF3* um das 6-fache erhöhte und in Kombination mit BTZ wurde die Transkription von *ATF3* um das 17-fache gesteigert (Abbildung 35 A). Die gesteigerte Proteinexpression von *ATF3* korrelierte mit der angestiegenen Transkript-Menge an *ATF3*. In Übereinstimmung mit einer post-transkriptionellen Regulation von *ATF4* war eine schwache mRNA-*ATF4*-Induktion nach Inkubation mit ABT-199 um das 2,2-fache zu sehen, die in Kombination mit BTZ signifikant auf das 3,4-fache anstieg (Abbildung 35 B). Die post-transkriptionelle Regulation von *ATF4* konnte

durch gesteigerte Expression von ATF4 auf Protein-Ebene nach Inkubation mit ABT-199 und verstärkt in Kombination mit BTZ nachgewiesen werden. ABT-199 allein steigerte die Transkription von *PMAIP1* um das 3-fache, während in Kombination mit BTZ die mRNA-Expression von *PMAIP1* auf das 4,4-fache erhöht wurde (Abbildung 35 C). Die Protein-Expression von NOXA korrelierte hier ebenso mit der gesteigerten mRNA-Expression von *PMAIP1*. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gesteigerte mRNA- und Protein-Expression von ATF3 und ATF4 als bekannte Stress-Marker eine erhöhte *PMAIP1*/NOXA-Expression mittels Aktivierung der integrierten Stress-Antwort (ISR) vermitteln. ABT-199 induziert also die Expression der Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4, die wiederum *PMAIP1*/NOXA transaktivieren und schlussendlich verstärkt NOXA die ABT-199&BTZ-induzierte Apoptose.



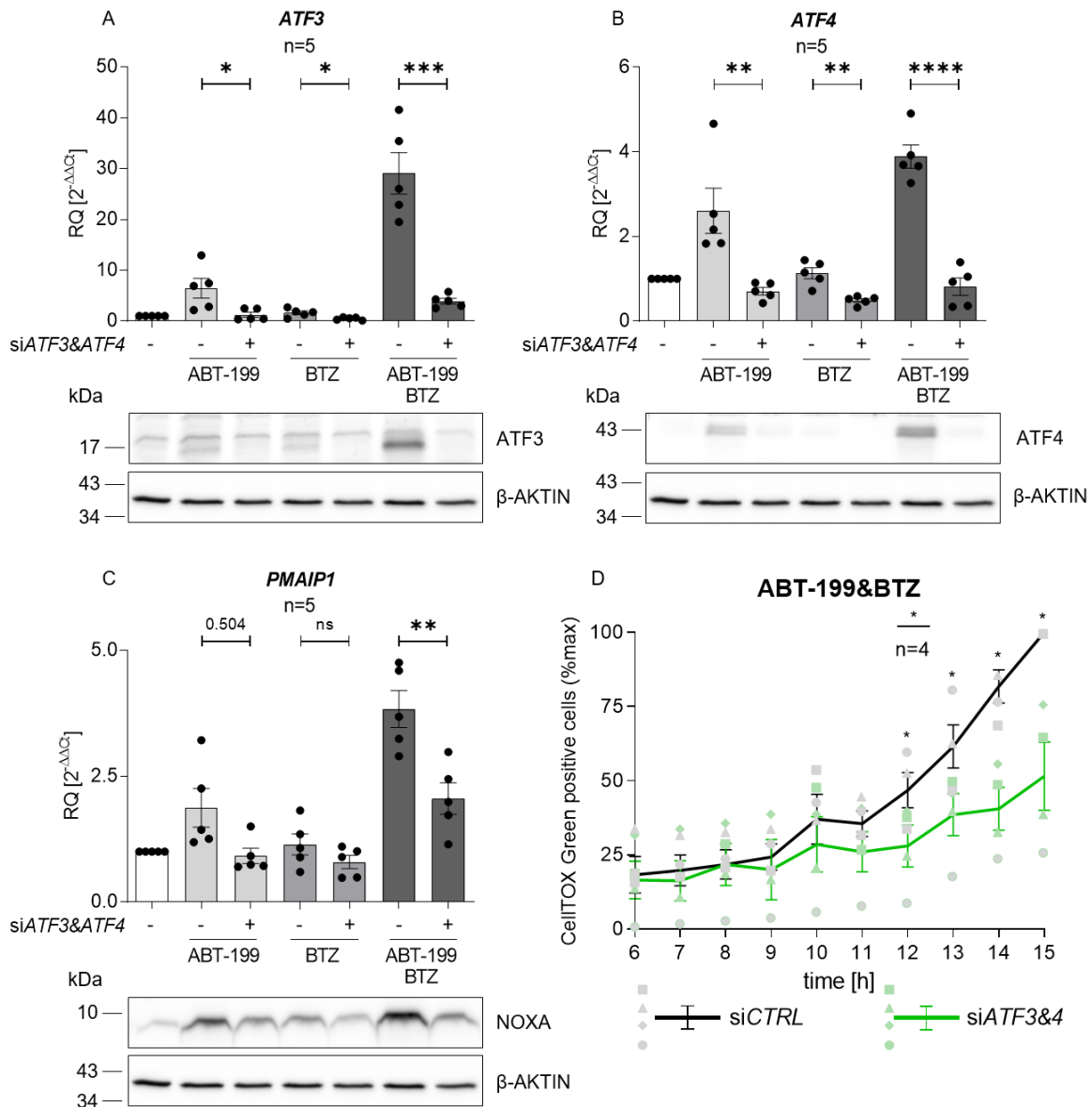
**Abbildung 35: Die Induktion von ATF3 und ATF4 durch ABT-199 erhöht parallel die PMAIP1/NOXA-Expression mittels Aktivierung der integrierten Stress-Antwort (ISR).** SW982/WT-Zellen wurden für 8 h mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM BTZ (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) inkubiert und anschließend die Proben für die Western Blot Analyse und für die Bestimmung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR gesplittet. A-C) ABT-199 allein und verstärkt in Kombination mit BTZ induzierte sowohl die Transkription und Proteinexpression von ATF3 und ATF4, als auch von PMAIP1/NOXA. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=3 mit einem repräsentativen Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

## 6.10 ABT-199 induziert die Integrierte Stress-Antwort (ISR)

Bisher wurde ABT-199 als Induktor der ISR identifiziert, im Folgenden wurde die Rolle der ISR bei der Expression von NOXA und die Zelltod-Induktion analysiert. Der spezifische ISR-Inhibitor ISRIB konnte weder die Transkription und Translation von ATF3, ATF4 und PMAIP1/NOXA, noch den durch ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod abschwächen. Daher wird

von einer begrenzten Wirksamkeit ausgegangen (Anhang Abbildung 43 A-C). ISRIB kann die in diesem Setup durch ABT-199&BTZ-induzierte ISR nicht abschwächen.

Um den kausalen Zusammenhang zwischen der durch die ISR-vermittelte *ATF3&ATF4*-Induktion und der *PMAIP1/NOXA*-Induktion herzustellen, wurde ein Doppel-*Knock-Down* der zwei induzierten Transkriptionsfaktoren *ATF3* und *ATF4* durchgeführt. Hierfür wurden SW982/WT mit *siATF3* und *siATF4* gleichzeitig transfiziert und nach 24 h mit ABT-199 ± BTZ für 8 h inkubiert. Der Einfluss eines *Knock-Downs* von *ATF3&ATF4* auf die *PMAIP1/NOXA*-Induktion wurde anschließend mittels qRT-PCR und Western Blot Analyse ausgewertet. Die Abbildung 36 A und 36 B verifizieren den simultanen *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-translationaler Ebene. Der *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* beeinflusste die durch ABT-199-vermittelte *PMAIP1*-Induktion mit einer Reduktion von 1,8-fach auf 0,9-fach nicht signifikant (Abbildung 36 C). Der simultane *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* konnte jedoch die durch ABT-199&BTZ-vermittelte Induktion von *PMAIP1* signifikant von 3,8-fach auf das 2-fache senken. Die Western Blots stehen im Einklang mit den qRT-PCR-Analysen und zeigen eine deutlich geringere Expression an NOXA nach *Knock-Down* von *ATF3&ATF4*. Des Weiteren ist zu erwarten, dass der *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* aufgrund verminderter Induktion von NOXA in verminderter Zelltod-Induktion resultiert. Um dies zu analysieren, wurden SW982/WT-Zellen mit *siATF3* und *siATF4* co-transfiziert und am nächsten Tag in Gegenwart von CellTOX Green mit ABT-199&BTZ kultiviert. Die Zellen wurden über 15 h im Cytation 1 Fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und die CellTOX Green positiven Zellen ausgezählt. Abbildung 36 D zeigt, dass nach *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* signifikant weniger CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen nach ABT-199&BTZ-Inkubation im Vergleich zur *siCTRL* über einen Zeitraum von 15 h gezählt wurden. Also sind die Transkriptionsfaktoren *ATF3* und *ATF4* sowohl für die *PMAIP1/NOXA*-Induktion als auch für die ABT-199&BTZ-induzierte Apoptose relevant, da der *Knock-Down* beider Transkriptionsfaktoren nicht die *PMAIP1/NOXA*-Expression reduziert, sondern der Zelltod signifikant vermindert ist.



**Abbildung 36: Der Knock-Down von ATF&ATF4 reduziert sowohl die PMAIP1/NOXA-Induktion als auch den ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod.** A-C) SW982/WT-Zellen wurden mit 50 nM siATF3 und siATF4 transfiziert, nach 24 h für 8 h mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM BTZ inkubiert und die Proben für die qRT-PCR-Analyse und für den Western Blot gesplittet. A und B) Der simultane Knock-Down von ATF3 und ATF4 führte sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene zu signifikant reduzierter ATF3&ATF4-Expression. C) Bei Knock-Down von ATF3&ATF4 war eine Reduktion der PMAIP1-Expression nur für ABT-199&BTZ feststellbar. Die Induktion der NOXA-Expression konnte durch ATF3&ATF4-Knock-Down deutlich gesenkt werden. D) Um den Einfluss von ATF3&ATF4 bei der Zelltod-Induktion zu untersuchen, wurden SW982/WT-Zellen mit 50 nM siATF3 und 50 nM siATF4 oder 50 nM siCTRL transfiziert und nach 24 h die Zellen mit 15  $\mu$ M ABT-199 und 5 nM BTZ kultiviert und mittels des Cytation 1 Fluoreszenzmikroskopisch CellTOX Green<sup>+</sup> Zellen über 15 h gezählt. Der ATF3&ATF4-Knock-Down resultierte dabei in signifikant geringerer Zelltod-Induktion im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD; n=5 (A-C) bzw. n=3 (D) mit einem repräsentativen Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

## 6.11 Mitochondrialer Import

ABT-199 allein und verstärkt in Kombination mit BTZ führt in SW982/WT-Zellen zu mitochondrialem metabolischen *Reprogramming* (Kapitel 6.9) und reduktiver Carboxylierung, wie es bereits von Roca-Portoles für ABT-199 allein herausgefunden wurde (Roca-Portoles *et al.* 2020). Des Weiteren kann ein Ungleichgewicht der mitochondrialen Atmungskette durch Reduktion der Aktivitäten der Atmungsketten-Komplexe I und II zur ISR führen (Bajpai *et al.* 2020). Auch eine in der Literatur beschriebene Induktion der ISR durch ABT-199&BTZ-vermittelte induzierte ISR konnte nachgewiesen werden (Kapitel 6.10). Ein beeinträchtigter mitochondrialer Import von UE der Komplexe I und II führt zu einer Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette.

Um zu untersuchen, ob ABT-199 den mitochondrialen Import beeinflusst, wurden einerseits die Proteinexpressionen von nukleär kodierten und ins Mitochondrium importierten Proteinen wie die Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) und die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) des Komplex II analysiert. Zum Vergleich wurde die mitochondrial kodierte Cytochrom C Oxidase I (MT-CO1/COX1) detektiert (Herrmann *et al.* 2012) und das in Anwesenheit von ABT-199 veränderte MCL-1-Bandenmuster untersucht.

Die Arbeitsgruppe von Perciavalle *et al.* publizierte 2012, dass MCL-1 durch seine zwei Spaltungsstellen in drei MCL-1-Formen auftreten kann. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass die 40 kDa und 38 kDa MCL-1-Formen in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sind, während die kleinste MCL-1-Form mit 36 kDa ausschließlich in der inneren mitochondrialen Membran vorkommt und über das Tom20/Tom70-Translokasen-System in die innere mitochondriale Membran transloziert wird. Dort übt das 36 kDa große MCL-1-Protein nicht die typische anti-apoptotische Funktion von MCL-1 aus, sondern reguliert die mitochondriale Struktur, Fusion und die Bioenergetik (Perciavalle *et al.* 2012).

Um den mitochondrialen Import von MCL-1 und der weiteren Proteine MnSOD, COX1/MT-CO1 und SDHA zu untersuchen, wurden H1299/WT-Zellen in An- und Abwesenheit von ABT-199 für 4 h und 8 h inkubiert und nach Lyse der Zellen mittels eines *Dounce Homogenisators* die Mitochondrien isoliert und über Zentrifugationsschritte angereichert. Die Proteinexpression in der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion wurde zusammen mit dem Gesamtlisat mittels Western Blot analysiert.

Für die nukleär kodierten Proteine MnSOD und SDHA ließ sich nach 4 h und nach 8 h Inkubation mit ABT-199 eine unveränderte Proteinexpression feststellen. Dabei waren die Bandenintensitäten für MnSOD und SDHA in der mitochondrialen Fraktion im Vergleich zum Gesamtlisat stärker und in der cytosolischen Fraktion nicht vertreten (Abbildung 37). Auch für die mitochondrialen Marker TOM20 und TOM70 zeigte sich in der mitochondrialen Fraktion

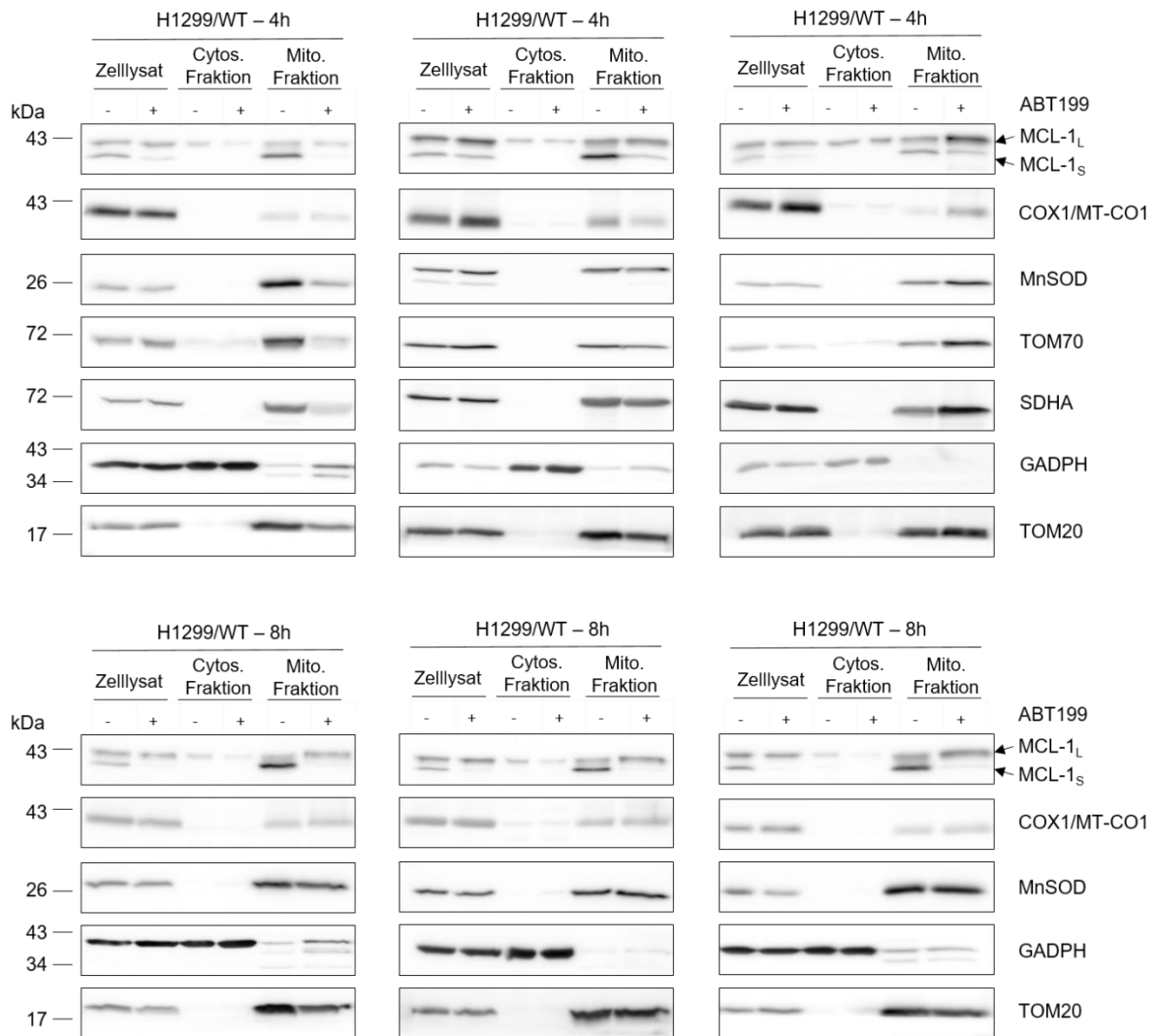
eine stärkere Bandenintensität als im Gesamtlysate, während TOM20 und TOM70 in der cytosolischen Fraktion nicht detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu wurde eine schwache Bandenintensität für den cytosolischen Marker GAPDH in der mitochondrialen Fraktion identifiziert, der jedoch in der cytosolischen Fraktion und im Gesamtlysate deutlich detektierbar war (Abbildung 37).

Das mitochondrial kodierte COX1/MT-CO1 wies nach 4 h eine stärkere Bandenintensität im Gesamtlysate als in der mitochondrialen Fraktion auf, wobei es in der cytosolischen Fraktion nicht nachgewiesen wurde (Abbildung 37). Ein Unterschied der Proteinexpression nach ABT-199-Inkubation ließ sich nicht feststellen. Nach 8 h war eine Veränderung der Bandenintensität von COX1/MT-CO1 zu beobachten, bei der die starke Bandenintensität im Gesamtlysate mit der Proteinexpression in der mitochondrialen Fraktion zu vergleichen war (Abbildung 37).

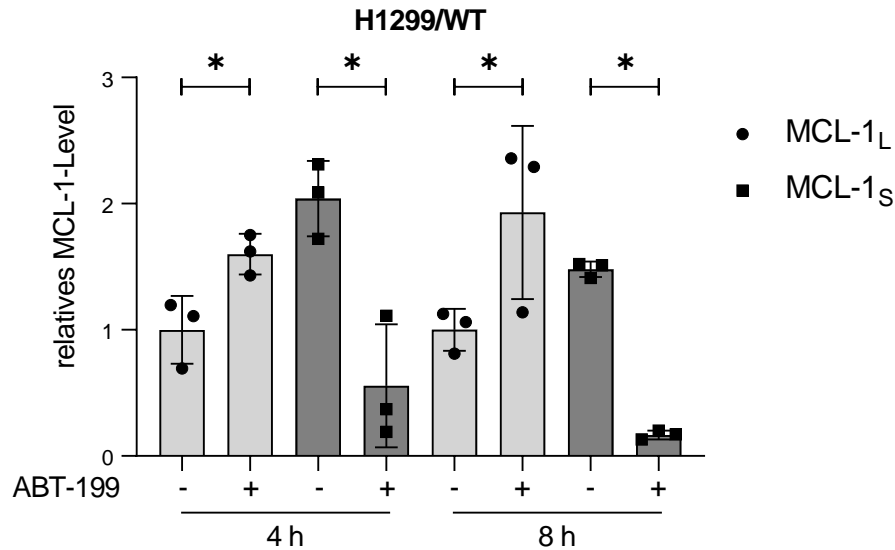
Für die MCL-1-Formen war nach 4 h und nach 8 h Inkubation mit ABT-199 eine veränderte Bandenintensität in der mitochondrialen Fraktion sichtbar. Sowohl nach 4 h als auch nach 8 h war die MCL-1<sub>S</sub>-Bande in Abwesenheit von ABT-199 in der mitochondrialen Fraktion vorhanden, wohingegen in Anwesenheit von ABT-199 die MCL-1<sub>S</sub>-Bande nach 4 h bereits schwächer und nach 8 h nicht mehr zu detektieren war (Abbildung 37). Im Gegenzug konnte eine Zunahme der Bandenintensität der MCL-1<sub>L</sub>-Form in Anwesenheit von ABT-199 in der mitochondrialen Fraktion beobachtet werden.

Die MCL-1-Bandenmuster wurden in den mitochondrialen Fraktionen densitometrisch ausgewertet und die Werte für MCL-1 auf die mitochondriale Ladekontrolle TOM20 normiert (Abbildung 38). Die densitometrische Auswertung bestätigte die im Western Blot erkannte Veränderung: MCL-1<sub>L</sub> zeigte ein signifikant erhöhtes relatives MCL-1<sub>L</sub>-Level in Anwesenheit von ABT-199 nach 4 h mit einer Steigerung auf das 1,6-fache, während nach 8 h das relative MCL-1<sub>L</sub>-Level auf das 1,9-fache in der mitochondrialen Fraktion anstieg. Nach 4 h ließ sich eine signifikante Reduktion des relativen MCL-1<sub>S</sub>-Levels in Anwesenheit von ABT-199 von 2 auf 0,5 und nach 8 h von 1,5 auf 0,2 feststellen (Abbildung 38). Dies lässt den Schluss zu, dass ABT-199 den Import von MCL-1<sub>S</sub> mit mitochondrialer N-terminaler Signalsequenz signifikant reduziert.





**Abbildung 37: ABT-199 führt zu einer Reduktion der MCL-1<sub>S</sub>-Form in der mitochondrialen Fraktion.** H1299/WT-Zellen wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 4 h und 8 h inkubiert und Gesamtzelllysate, Mitochondrien-angereicherte und cytosolische Fraktionen mittels Western Blot analysiert. Sowohl nach 4 h als auch nach 8 h war eine Reduktion der MCL-1<sub>S</sub>-Bandenintensität in Anwesenheit von ABT-199 sichtbar. GAPDH diente als cytosolischer Marker; TOM20 und TOM70 als mitochondriale Marker. Dargestellt sind drei Western Blot Replikate von drei unabhängigen Experimenten, die zur densitometrischen Auswertung herangezogen wurden.



**Abbildung 38: Erhöhtes relatives MCL-1<sub>L</sub>-Level und signifikante Reduktion von MCL-1<sub>S</sub> in der mitochondrialen Fraktion in Anwesenheit von ABT-199.** H1299/WT-Zellen wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 4 h und 8 h inkubiert und Gesamtzelllysate, Mitochondrien-angereicherte und cytosolische Fraktionen mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der zwei MCL-1-Formen in der mitochondrialen Fraktion wurde densitometrisch mit Hilfe der *ImageJ*-Software ausgewertet und auf das mitochondriale Markerprotein TOM20 normiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD des relativen MCL-1-Levels nach 4 h und 8 h; n=3.

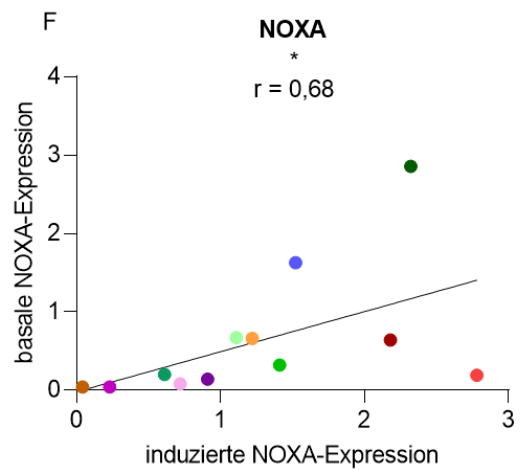
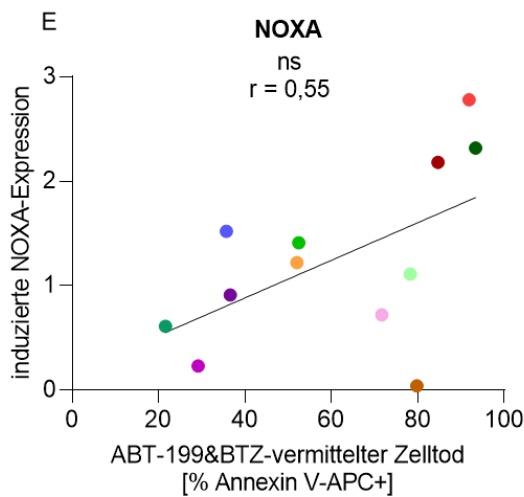
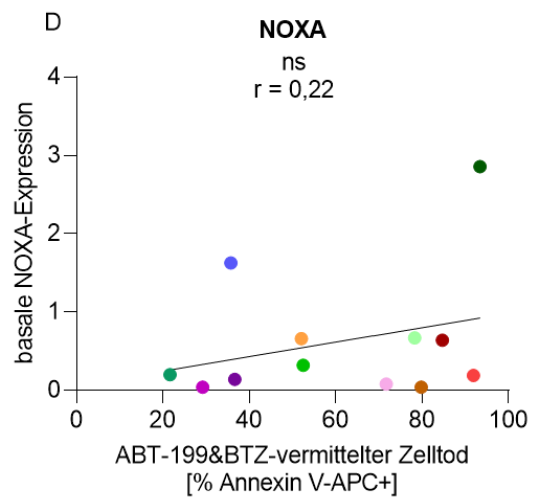
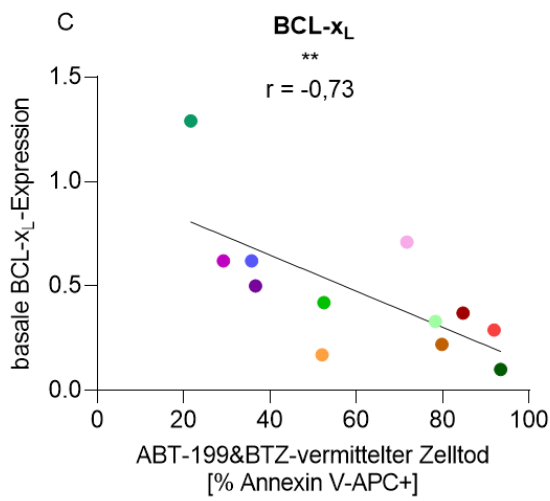
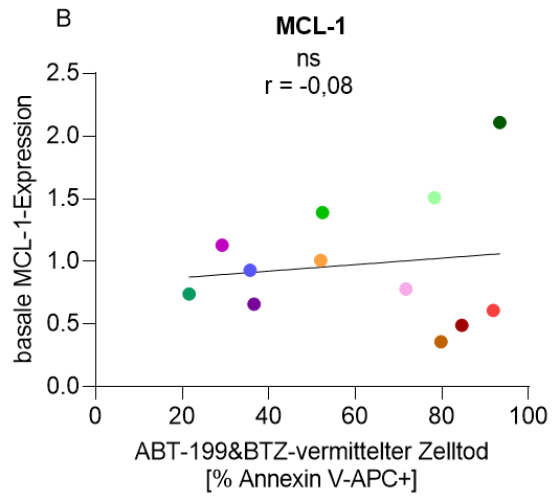
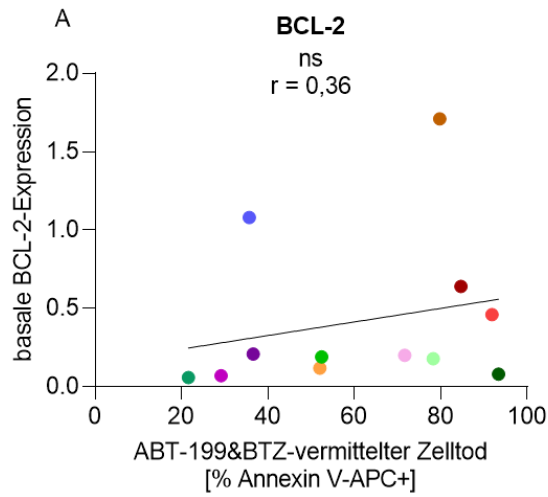
## 6.12 Expression von BCL-2-Proteinen als prädiktive Marker des ABT-199&PI-vermittelten Zelltods

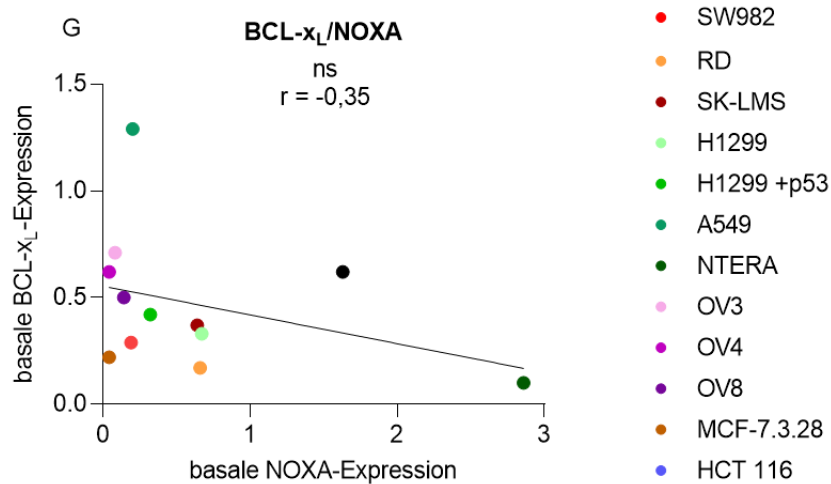
Die hier gezeigten Daten legen die synergistische Zelltod-Induktion durch ABT-199&PI in verschiedensten Tumor-Zelllinien nahe. Die TP53-unabhängige, transkriptionelle Induktion von NOXA ist eine zusätzliche Wirkung von ABT-199, separat zur spezifischen BCL-2-Inhibition. Diese Wirkung ist auch bei erworbener, intrinsischer BH3-Mimetika-Resistenz relevant, zum Beispiel durch Überexpression von MCL-1 in MM (Wuillème-Toumi *et al.* 2005) oder bei Neurotoxizität (Kumar *et al.* 2020). Der spezifische BCL-2-Inhibitor ABT-199 vermittelt in Kombination mit Proteasom-Inhibition mit den klinisch relevanten PIs BTZ, CFZ und IXZ in dieser Arbeit bei Sarkomzellen eine synergistische Zelltod-Induktion. Der hier aufgedeckte, synergistische Mechanismus beschreibt eine wichtige Rolle von NOXA in der durch ABT-199&PI-vermittelten Zelltod-Induktion. Um den Einfluss der unterschiedlich exprimierten BCL-2-Proteine auf die ABT-199&PI-vermittelte Zelltod-Induktion zu untersuchen, wurden die basalen Expressionslevel der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine in 12 Krebs-Zelllinien (Tabelle 16 und Abbildung 44) mit der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion mittels Spearman-Korrelation verglichen. Die basale Expression von BCL-2 korrelierte nur schwach mit der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion, was in Anbetracht der vorherigen

Ergebnisse eines *Off-Target*-Effekts von ABT-199 zu erwarten war (Abbildung 39 A). Da NOXA eine wichtige Rolle in der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion spielt, wurde die basale Expression des NOXA-Antagonisten MCL-1 untersucht. Auch hier ergab die Korrelationsanalyse keinen Zusammenhang zwischen basaler MCL-1-Expression und Apoptose-Induktion in den Zelllinien (Abbildung 39 B). Überraschenderweise korrelierte die Expression von BCL-xL negativ mit der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion. Eine niedrige basale BCL-xL-Expression ist mit erhöhter ABT-199&BTZ-vermittelter Apoptose-Induktion assoziiert (Abbildung 39 C). Für die basale NOXA-Expression war nur eine schwache Korrelation mit erhöhter Zelltod-Induktion feststellbar, die vergleichbar mit dem Verhalten der basalen BCL-2-Expression war (Abbildung 39 D). Die ABT-199&BTZ-induzierte NOXA-Expression korrelierte deutlich mit der Apoptose-Induktion (Abbildung 39 E). Eine erhöhte induzierte NOXA-Expression führte zu höherem ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod. Dies bestätigt den Befund, dass der NOXA-Induktion eine wichtige Rolle in der ABT-199&BTZ-induzierten Apoptose zukommt. Dabei zeigte sich, dass eine höhere basale NOXA-Expression mit einer stärkeren induzierten NOXA-Expression einherging (Abbildung 39 F). Interessanterweise zeigte sich eine schwache Korrelation zwischen der basalen BCL-xL- und basalen NOXA-Expression. Eine höhere basale BCL-xL-Expression war mit niedrigerer basaler NOXA-Expression assoziiert (Abbildung 39 G). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BCL-xL als unabhängiger prädiktiver Marker identifiziert wurde und die basale Expression von BCL-xL bei einer synergistisch wirkenden Kombination von BCL-2-Inhibitoren mit PIs in unterschiedlichen Tumor-Entitäten relevant ist. Auch die hier entdeckte Korrelation zwischen der induzierten NOXA-Expression und der ABT-199&BTZ-induzierten Apoptose bestätigt die wichtige Rolle der NOXA-Induktion in diesem Kontext.

**Tabelle 16: Verwendete Zelllinien für die Bestimmung der basalen Expressionslevel verschiedener BCL-2-Proteine**

Zelllinien	Ursprung	Proteine
SW982/WT, RD, SK-LMS	Sarkome	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA
H1299/WT, H1299/ <i>TP53</i> , A549	Bronchialkarzinome	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA
NTERA	Embryonales Hodenkarzinom	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA
OV3, OV4, OV8	Ovariakarzinom	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA
MCF-7.3.28	Mamma-Karzinom	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA
HCT116/WT	Kolorektales Karzinom	BCL-2, MCL-1, BCL-xL, NOXA





**Abbildung 39: Die basale BCL-xL-Expression korreliert mit der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion.** A-G) Die Expression der Proteine BCL-2, MCL-1, BCL-xL und NOXA wurde mittels Western Blot detektiert und densitometrisch mit Hilfe der *ImageJ*-Software ausgewertet. Die Expressionen der entsprechenden Proteine wurden auf die Ladekontrolle  $\beta$ -AKTIN normiert und über Korrelationsanalysen der Zusammenhang der basalen Protein-Expression in Bezug auf den ABT-199&BTZ-induzierten Zelltod ermittelt. Die induzierte NOXA-Expression wurde nach 8 h Inkubation mit 15  $\mu$ M ABT-199 densitometrisch im Western Blot bestimmt. Dargestellt sind die Streudiagramme aus zwei unabhängigen Experimenten mit Berechnung der Korrelationen unter Verwendung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten.

## 7. Diskussion

Bei der Entstehung maligner Neoplasien wird das Gleichgewicht in gesunden Geweben zwischen Zellproliferation mittels mitotischer Zellteilung und dem Zellsterben über den programmierten Zelltod gestört. Gesunde Zellen transformieren dabei zu „Krebszellen“ mit veränderten Zellproliferations- und Zelltodeigenschaften. Hanahan und Weinberg haben die Eigenschaften von Tumoren in grundlegende und aufkommende Merkmale eingeteilt (Hanahan und Weinberg 2011). Eines dieser Merkmale ist die verminderte Apoptose-Empfindlichkeit, die mitunter durch den Verlust des Tumorsuppressors TP53 oder durch Strategien wie einer Überexpression anti-apoptotischer Regulatoren bewerkstelligt wird.

Ein Beispiel hierfür ist die Überexpression anti-apoptotischer BCL-2-Proteine, die bei Krebszellen die Toleranz gegenüber Apoptose-induzierender Substanzen erhöht. Nicht nur hämatopoetische Erkrankungen weisen eine BCL-2- oder MCL-1 Überexpression auf, auch die schwer therapierbaren Sarkome zeigen häufig eine gesteigerte BCL-2-Expression (DiNardo *et al.* 2019; Gores und Kaufmann 2012; Kaufmann *et al.* 1998; Roberts und Huang 2017). Vor allem in Synovial-Sarkomen führt die chromosomale Translokation t(X;18) im *BCL-2*-Gen durch die Entstehung des chimären Fusionsproteins SYT-SSX zu einer BCL-2-Überexpression, aber auch weitere mit SYT-SSX einhergehende Veränderungen, wie die Herunterregulation der Transkription und damit der Expression bestimmter Zielgene sind bekannt (Hirakawa *et al.* 1996; Kawai *et al.* 1998). Auch das anti-apoptotisch wirkende Protein MCL-1 spielt in Sarkomen für das Ansprechen auf Krebstherapien eine wichtige Rolle. Die Arbeitsgruppe von Thallinger *et al.* beobachtete in verschiedenen humanen Sarkom-Zelllinien und in Sarkom-Xenotransplantierten Mäusen einen Einfluss von MCL-1, das zur Chemosensitivität beiträgt (Thallinger *et al.* 2004). Thallinger *et al.* postulierte, dass die Herunterregulation von MCL-1 mittels *antisense*-Oligonukleotiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* potentiell die Chemosensitivität der humanen Sarkome erhöht. Inzwischen laufen mehrere Studien für MCL-1-spezifische BH3-Mimetika, unter anderem A-1210477 (Leverson *et al.* 2015), S63845 (Kotschy *et al.* 2016) oder AMG-397 (Caenepeel *et al.* 2020), die nicht nur in hämatopoetischen Erkrankungen therapeutisches Potential aufweisen, sondern die auch als effektives Krebstherapeutikum in soliden Tumoren eingesetzt werden. Für den MCL-1-Inhibitor S63845 wurde erst kürzlich ein Synergismus mit ABT-199 in Synovialsarkomen beschrieben (Fairchild *et al.* 2020).

### 7.1 Neue Therapieansätze in der Krebsforschung durch die Entwicklung niedermolekularer BCL-2-Inhibitoren/BH3-Mimetika

Um spezifisch anti-apoptotische Proteine blockieren zu können, wurde eine neuartige Klasse niedermolekularer BCL-2-Inhibitoren/BH3-Mimetika entwickelt (Roberts und Huang 2017;

Taylor *et al.* 2011). Bei Einsatz der BH3-Mimetika ABT-737 und dem Analogon ABT-263, die hohe Affinitäten zu BCL-2, BCL-xL und BCL-w aufweisen, kam es jedoch zu Problemen mit starken Nebenwirkungen wie zum Beispiel einer Thrombozytopenie (Vogler *et al.* 2011). Daraufhin ist der spezifische BCL-2-Inhibitor ABT-199 entstanden, der sich in hämatopoetischen Erkrankungen wie AML oder CLL als wirksam erwies (Roberts *et al.* 2016). Klinische Phase II Studien belegen hierbei die Effizienz von ABT-199 in AML (Konopleva *et al.* 2016) oder in Patienten mit wiederkehrender CLL oder del(12p) CLL (Stilgenbauer *et al.* 2016; Stilgenbauer *et al.* 2018).

Im Allgemeinen führen Monotherapien häufig zu Resistenzentwicklung, da Zellen problemloser einer Veränderung in einem Signalweg entgegensteuern können. Auch für ABT-199 sind erworbene Resistenzen bekannt, bei denen es nicht selten zur Hochregulation der zwei anti-apoptotischen Proteine MCL-1 und BCL-xL kommt. In Xenograft-Modellen mit folliculärem Lymphom zeigten isolierte Zellen des Tumors bei erneuter ABT-199-Inkubation eine ansteigende Tendenz zur Resistenz, die von erhöhter MCL-1- und BCL-xL-Expression und reduzierter BIM-Expression begleitet wurde (Bodo *et al.* 2016). Die Daten der Choudhary-Gruppe bestätigen eine Veränderung der Proteinexpression in generierten ABT-199-resistenten Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, bei der die erworbene ABT-199-Resistenz in erhöhter MCL-1- und BCL-xL-Expression resultierte (Choudhary *et al.* 2015). Folglich stellen Medikamenten-Kombinationen aus ABT-199 mit einem spezifischen MCL-1-Inhibitor eine attraktive Alternative dar, wie laufende Studien für ABT-199 und A-1210477 (Levenson *et al.* 2015) oder ABT-199 und S63845 (Kotschy *et al.* 2016) bestätigen.

## 7.2 Proteasom-Blockierung als Alternative zur MCL-1-Inhibition

Eine bereits etablierte Therapie-Alternative zur direkten MCL-1-Inhibition stellt die Hemmung des Proteasoms dar, bei der durch Blockierung der Proteindegradierung zellulärer Stress ausgelöst wird, der häufig in Apoptose-Induktion resultiert. Der PI BTZ steht als klinisch anerkanntes Medikament bei der Krebstherapie mit eindeutigem therapeutischem Potential zur Verfügung und wird beim MM und im Speziellen auch beim MCL angewandt (Manasanch und Orlovski 2017; Richardson *et al.* 2003). Eine klinische Phase III Studie aus dem Jahr 2015 konnte bei einer BTZ-basierten Therapie bei MCL-diagnostizierten Patienten eine Verbesserung des Progressions-freien Überlebens von 59% im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielen (Robak *et al.* 2015). Eine Vielzahl weiterer Studien belegen die zytostatische Wirkung von BTZ in verschiedenen Tumor-Entitäten (Adams *et al.* 1999), allerdings zeigte eine BTZ-Monotherapie oder Kombinationstherapie mit Vorinostat kein vielversprechendes Therapie-Ansprechen bei fortgeschrittenen Sarkomen (Attia *et al.* 2011; Maki *et al.* 2005). Es wurde jedoch berichtet, dass die Kombination aus ABT-199 und BTZ mit Dexamethason vielversprechende Effizienz in klinischen Studien der Phase 1b und III in Patienten mit

rezidiviertem/refraktärem MM zeigte (Kumar *et al.* 2020; Moreau *et al.* 2017). Die BELLINI-Studie ist die erste Phase-III-Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von ABT-199, bei dem ABT-199 in Kombination mit BTZ und Dexamethason Patienten mit rezidiviertem/refraktärem MM verabreicht wurde. Dabei zeigte sich eine verbesserte Ansprechrate und Progressions-freies Überleben der Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Allerdings zeichnete sich ein höheres Gesamtüberleben in der Placebo-Gruppe ab, was auf ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis bei unspezifisch ausgewählten Patienten mit MM schließen lässt. Jedoch zeigen Subgruppenanalysen, dass Patienten mit rezidiviertem/refraktärem MM mit Translokation t(11;14) oder hoher BCL-2-Expression eine Verbesserung des Ansprechens und Progressions-freien Überlebens ohne erhöhte Sterblichkeit aufweisen. Aufgrund der fehlenden Vorauswahl spezifischer Patienten anhand von Biomarkern wie der BCL-2-Expression hat ABT-199 trotzdem das Potential als effektives Therapeutikum bei ausgewählten Patienten mit MM bewiesen (Kumar *et al.* 2020; Moreau *et al.* 2017).

### **7.3 ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion mit Erfordernis von BAX und NOXA**

Die kürzlich erschienene Publikation mit Kombination aus ABT-199 und Proteasom-Inhibition mit BTZ konnte demonstrieren, dass in STS-Zelllinien und humanen Sarkomzellen ABT-199 und BTZ synergistisch wirken und effektiv Apoptose induzieren (Muenchow *et al.* 2020). Durch jeweiligen *Knock-Out* der drei Effektorproteine BAX, BAK und BOK wies die Arbeitsgruppe nach, dass nur die Abwesenheit von BAX zu signifikant reduzierter ABT-199&BTZ-vermittelter Apoptose-Induktion führt. Des Weiteren wurde die in der Literatur beschriebene PI-induzierte Akkumulation des proteasomalen Proteins NOXA nach Inkubation mit BTZ und vor allem nach Inkubation mit ABT-199&BTZ beobachtet, welches für die Neutralisierung der anti-apoptotischen Aktivität von MCL-1 zuständig ist (Chen *et al.* 2005) und folglich als MCL-1-Inhibitor fungieren kann. In der Tat wurde in der Publikation von Muenchow *et al.* ebenso das pro-apoptotische BH3-*only* Protein NOXA als wichtiges Schlüsselmolekül identifiziert. Der *Knock-Down* von NOXA resultierte ebenfalls in einer verminderten Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ, die allerdings weniger deutlich als beim BAX-*Knock-Out* war (Muenchow *et al.* 2020). Anders als erwartet war die NOXA-Expression bei alleiniger Inkubation mit BTZ im Vergleich zur Kontrolle nur schwach erhöht. Überraschenderweise zeigte die Inkubation mit ABT-199 und ABT-199&BTZ im Vergleich zu BTZ eine wesentlich stärkere NOXA-Induktion. Bisherige Studien beschreiben eine NOXA-Induktion durch Proteasom-Inhibition mittels BTZ in verschiedenen Zelllinien, unter anderem in MM (Gomez-Bougie *et al.* 2007), aber auch in Melanomen (Qin *et al.* 2006) oder dem MCL (Pérez-Galán *et al.* 2006). Zu beachten ist, dass die NOXA-Induktion in den erwähnten Veröffentlichungen bei höher eingesetzter BTZ-Konzentration erreicht wurde. Die Arbeitsgruppe von Pérez-Galán setzte BTZ in den MCL-



Zelllinien in einem Bereich zwischen 10-50 nM ein, auch im MM wurde die doppelte Konzentration an BTZ verwendet, während in Melanomzellen erst mit 1 µM BTZ eine verstärkte NOXA-Expression feststellbar war. In der Publikation von Muenchow *et al.* wurden jedoch 5 nM BTZ eingesetzt, was eine niedrigere Konzentration darstellt. Daher ist es wenig überraschend, dass eine durchaus schwächere NOXA-Induktion nach alleiniger Inkubation mit 5 nM PI BTZ erzielt wurde. Bei Steigerung der BTZ-Konzentration auf bis zu 15 nM konnte eine Konzentrations-abhängige NOXA-Induktion festgestellt werden. Es ist durchaus denkbar, dass bei höheren Konzentrationen an PI die NOXA-Induktion weiter ansteigt. Da jedoch bereits 5 nM PI in Kombination mit 15 µM ABT-199 für eine synergistische Zelltod-Induktion ausreicht, wird die geringe PI-Konzentration verwendet, um toxische Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Es stellt sich die Frage, ob eine geringere Konzentration mit 5 µM ABT-199 in Kombination mit 15 nM BTZ dieselbe synergistische Zelltod-Induktion hervorrufen würde.

Als Schlüsselmoleküle für die Wirkung von ABT-199&BTZ wurden in dieser Arbeit (Kapitel 6.2-6.5) BAX und NOXA identifiziert. Der *Knock-Out* von BAX in SW982/WT-Zellen bewirkte eine signifikante Reduktion der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion, während interessanterweise im Gegensatz dazu der *Knock-Out* von BAK oder BOK keine signifikante Reduktion der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion nach sich zog. Die Proteine BAK und BOK scheinen keine entscheidende Rolle zu spielen. Ein Aspekt des beobachteten, unterschiedlichen Einflusses nach *Knock-Out* der Effektorproteine BAX, BAK und BOK könnte trotz hoher Struktur- und Sequenz-Homologie und deren teils funktioneller Redundanz auf Unterschiede in deren Lokalisation oder verschiedenen Expressionsleveln zurückzuführen sein (Czabotar *et al.* 2014; Westphal *et al.* 2014). Unterschiedliche Expressionslevel an vorhandenem BAX- oder BAK-Protein verändert die MOMP und die damit assoziierte Apoptose. Cosentino *et al.* bestätigten erst kürzlich, dass BAX und BAK wesentlich in der Größe der Porenkomplexe, aber auch in der Dynamik der Porenbildung starke Unterschiede aufweisen (Cosentino *et al.* 2022). Sie fanden heraus, dass BAK in kürzerer Zeit Poren-Cluster bildet, inaktives BAK in höherer Anzahl pro Membranfläche vorhanden ist und die Dimer-Interaktionen effektiver in BAX/BAK DKO HCT116-Zellen mit mEGFP-BAK als in Zellen mit mEGFP-BAX nachweisbar sind. Im Vergleich dazu spielt das Expressionslevel von BAX bzw. BAK und auch die subzelluläre Verteilung von BAX und BAK keine Rolle in der Porenbildung- und Größe (Cosentino *et al.* 2022).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen keine signifikanten Veränderungen der Expression der Effektorproteine BAX, BAK und BOK bei *Knock-Out* von einem der Effektorproteine BAX, BAK oder BOK. Eventuell kann die unterschiedliche Bindungsaffinität der Effektorproteine an die anti-apoptischen Proteine den Unterschied hinsichtlich der Zelltod-Induktion erklären. Darüber hinaus beschreibt die Literatur für BAX eine präferentielle Bindung an BCL-2 vor. Bei

einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  ABT-199 können alle BCL-2-Moleküle mit ABT-199 gesättigt und dadurch inhibiert werden. BAX bleibt ohne Bindung des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 frei und kann Poren in der Mitochondrienmembran ausbilden, während im Gegensatz dazu BAK weiterhin vorrangig durch das anti-apoptotische Protein MCL-1 inaktiviert wird. Durch *Knock-Out* von BAX fällt der Effekt der Porenbildung durch freie, aktive BAX-Moleküle bei gleichzeitiger Inhibition von BAK durch MCL-1 weg. Es ist zu erwarten, dass die BCL-2-Inhibition einen größeren Einfluss auf freiwerdendes BAX als auf BAK oder BOK hat, was der Grund für die stärkste Reduktion der Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ bei Abwesenheit von BAX erklärt. Einen weiteren Beleg der wichtigen Rolle von BAX für die synergistische Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ lieferten Wang und Youle, die zeigen, dass HCT116<sup>BAX<sup>KO</sup></sup> im Vergleich zu HCT116/WT oder HCT116<sup>BAK<sup>KO</sup></sup> resistenter gegenüber ABT-737 sind (Wang und Youle 2012). Sie stellen die Hypothese auf, dass ABT-737 vorrangig BCL-2, BCL-w und BCL-xL, aber nicht MCL-1 inhibiert und BAX nicht von MCL-1 gehemmt wird. Folglich wird BAK in Abwesenheit von BAX in HCT116-Zellen weiterhin durch nicht inhibiertes MCL-1 kontrolliert, in HCT116<sup>BAK<sup>KO</sup></sup>-Zellen hingegen wird BAX durch ABT-737-Inkubation frei und kann Apoptose einleiten. Diese Beobachtung bestätigen die hier erzielten Ergebnisse in SW982-Zellen: SW982/BAX<sup>KO</sup> sind im Vergleich zu SW982/BAK<sup>KO</sup> oder SW982/BOK<sup>KO</sup> resistenter gegenüber der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion. ABT-199 inhibiert hierbei nur spezifisch BCL-2, wodurch BCL-xL und auch MCL-1 weiterhin die pro-apoptotischen Aktivitäten von BAK und BOK in SW982/BAX<sup>KO</sup> neutralisieren und in Anwesenheit von ABT-199&BTZ die Zelltod-Induktion reduzieren.

Zusätzlich zu dem Effektorprotein BAX wird in dieser Arbeit als weiteres Schlüsselmolekül für die ABT-199&BTZ-induzierte Apoptose das BH3-*only* Protein *PMAIP1/NOXA* identifiziert. Durch *Knock-Down* von *PMAIP1* zeigte sich eine signifikante Reduktion von ~20 – 40% der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion in SW982/WT-Zellen (Abbildung 17). NOXA wurde als BH3-*only* Protein bereits früh mit der Apoptose-Regulation in Verbindung gebracht. Als Apoptose-induzierendes, pro-apoptotisches Protein wird allerdings unter anderem das apoptotische Potential von NOXA in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite stuft die Arbeitsgruppe von Chen *et al.* NOXA als schwachen „Killer“ ein, während im Gegensatz dazu die BH3-*only* Proteine BAD und PUMA eine hohe „Killer“-Aktivität aufweisen (Chen *et al.* 2005). Für die vorstehend genannte Aussage wurden immortalisierte 3T9 MEF-Zellen mit Retroviren infiziert, die das BH3-*only* Protein mit getagtem GFP exprimierten. GFP<sup>+NOXA</sup>-exprimierende Zellen zeigten eine Viabilität von 90%, während die Zell-Viabilität von GFP<sup>+PUMA</sup>-exprimierenden Zellen auf <20% sank. Chen *et al.* zogen daraus den Schluss, dass NOXA nicht alle anti-apoptotischen Proteine neutralisiert. Bei gleicher Expression aller anti-apoptotischen Proteine in den 3T9 MEF-Zellen behalten genügend anti-apoptotische Proteine ihre Aktivität bei, wodurch trotz NOXA-Überexpression eine hohe Zellviabilität verbleibt. Auf

der anderen Seite stehen die konträren Ergebnisse neuerer Publikationen, die NOXA als starken Induktor der intrinsischen Apoptose einstufen (Jin *et al.* 2020; Núñez-Vázquez *et al.* 2021; Oda *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2018). Sharma *et al.* wiesen eine NOXA-Induktion bei Inkubation von Cisplatin in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopfes und Halses (HN8 und HN12) mit einhergehender Apoptose-Induktion nach. Durch *Knock-Down* von *PMAIP1* konnte die Cisplatin-induzierte Apoptose in HN8- und HN12-Zellen um mehr als die Hälfte reduziert werden. Sharma *et al.* schlussfolgern, dass NOXA ein starker Vermittler in dem Cisplatin-induzierten Apoptose-Signalweg ist. Auch in AML-Zelllinien (OCI-AML5, Kasumi-1 und MV4-11) demonstrierten Jin *et al.* eine durch 5'-Azacitidin- bzw. ABT-199-vermittelte NOXA-Induktion mit daraus resultierender Apoptose. Mit Hilfe der CRISPR/CAS9-Technologie inaktivierten Jin *et al.* *PMAIP1* in OCI-AML5-, Kasumi-1- und MV4-11-Zellen und dieser *Knock-Out* von *PMAIP1* führte bei Inkubation sowohl mit 5'-Azacitidin als auch mit ABT-199 zu signifikanter Zelltod-Reduktion. Weiterhin reduzierte die Deletion von *PMAIP1* das Ausmaß des Zelltods, das durch die kombinierte Inkubation mit 5'-Azacitidin&ABT-199 in OCI-AML5-, Kasumi-1- und MV4-11-Zellen hervorgerufen wurde. Die Resultate bestätigen, dass NOXA in der Kombination mit 5'-Azacitidin&ABT-199 für die Zelltod-Induktion von AML-Zellen unerlässlich ist (Jin *et al.* 2020). Auch in der Publikation von Nuñez-Vázquez *et al.* wurde eine NOXA-Induktion nach Fluorizolin-Inkubation in HeLa-Zellen und einer CML-Zelllinie (HAP1) nachgewiesen. Sowohl HeLa- als auch HAP-1-Zellen waren nach CRISPR/CAS9-KO von *PMAIP1* gegenüber einem Fluorizolin-induziertem Zelltod resistent. NOXA wurde als starker Induktor in der Fluorizolin-vermittelten Apoptose identifiziert (Núñez-Vázquez *et al.* 2021). Der Unterschied des apoptotischen Potentials von NOXA macht sich nicht nur am Interaktionsspektrum fest, sondern auch daran, ob NOXA in den verschiedenen Modellsystemen für die Apoptose-Induktion ausreicht oder nicht. Die hier erzielten Ergebnisse des *PMAIP1-Knock-Downs* in SW982/WT-Zellen bestätigen, dass NOXA für die Zelltod-Induktion durch ABT-199&BTZ ausreicht und in diesem Setup als Schlüsselmolekül bezeichnet werden kann.

### 7.3.1 ABT-199&PI-vermittelte synergistische Zelltod-Induktion

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen PIs BTZ, CFZ und IXZ wurde die synergistische Wirkung von ABT-199 und BTZ in Bezug auf die Zelltod-Induktion auch für die PIs CFZ und IXZ bestätigt. Der Vergleich zeigte außerdem, dass die höchste Zelltod- und NOXA-Induktion mit der Kombination ABT-199&CFZ erzielt wurde. Da CFZ im Gegensatz zu BTZ und IXZ die katalytischen UE  $\beta_5$  und  $\beta_2$  und nicht  $\beta_5$  und  $\beta_1$  blockiert, lässt dies auf eine wichtige Rolle der  $\beta_5$ - und  $\beta_2$ -Inhibition schließen (Besse *et al.* 2019). 2016 beschrieben Lamothe *et al.* die Überwindung einer BTZ-Resistenz durch CFZ in CLL-Patienten-Proben durch die irreversible Inhibition der proteasomalen UE (Lamothe *et al.* 2016). Sie postulierten, dass die Wirkung von CFZ einerseits in erhöhter Akkumulation von MCL-1-NOXA-Komplexen resultiert, andererseits

aber auch die ER-Stress-Antwort *triggert* und zu erhöhter Expression von ATF4 und dem *Downstream* liegenden *Target* CHOP führt. Der pro-apoptotische Transkriptionsfaktor CHOP reguliert unter anderem die Transkription des Todesrezeptors DR5 (Yamaguchi und Wang 2004). Es ist also denkbar, dass CFZ eine zusätzliche Wirkung durch Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs besitzt. Der Einfluss von CFZ auf den extrinsischen Signalweg wurde 2015 von Han *et al.* bestätigt. Einerseits resultierte eine CFZ-Inkubation in verschiedenen Krebszelllinien wie der Lungenkarzinom-Zelllinie A549, dem Melanom A375 oder auch in kolorektalen HCT116-Zellen in einer Hochregulation von DR5 mit einhergehender Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs (Han *et al.* 2015). Auf der anderen Seite induzierte CFZ in diesen Zelllinien effektiv intrinsische Apoptose durch Aktivierung von Caspase-3 mit einhergehender Spaltung von Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP). Die Befunde in der Literatur deuten darauf hin, dass CFZ durch die Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs eine zusätzliche zytotoxische Wirkung aufweist. Diese zusätzliche Wirkung von CFZ auf den extrinsischen Apoptose-Signalweg kann die starke Apoptose-Induktion bei Inkubation von ABT-199 mit CFZ in SW982/WT-Zellen begründen. In welchem Ausmaß CFZ in der hier in der Arbeit verwendeten SW982-Zelllinie den Transkriptionsfaktor CHOP und DR5 induziert und dadurch die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs anschiebt, muss durch nachfolgende Untersuchungen bestätigt werden.

Eine überraschende Erkenntnis dieser Arbeit war, dass der oral verfügbare PI IXZ eine wesentlich schwächere Zelltod- und NOXA-Induktion als BTZ oder CFZ allein und auch in Kombination mit ABT-199 zeigte. Ein Grund könnte die reversible Bindung von IXZ an die proteasomale UE  $\beta_1$  sein, wobei die  $\beta_1$ -UE laut erzielter Ergebnisse der proteasomalen Aktivitätsbestimmung in SW982/WT-Zellen nicht ausschlaggebend ist (Abbildung 19). Interessanterweise weisen BTZ und IXZ trotz reversibler Bindung der proteasomalen UE  $\beta_5$  und  $\beta_1$  auch eine mit CFZ vergleichbare  $\beta_2$ -Inhibition im proteasomalen Aktivitäts-Assay auf. Dies stellt eine schlüssige Erklärung für die ähnliche Zelltod-Induktion von ABT-199&BTZ und ABT-199&CFZ dar, erklärt jedoch nicht den hier beschriebenen Unterschied für IXZ.

Die signifikant geringere Effizienz von IXZ im Vergleich zu BTZ und CFZ lässt vermuten, dass IXZ im Gegensatz zu BTZ und CFZ die schwächste Inhibition der  $\beta_5$ -UE aufweist. Ist dieser beschriebene Effekt tatsächlich dafür verantwortlich, dass IXZ die schwächste Wirkung besitzt, müsste im Gegenzug dazu BTZ mit der stärksten inhibitorischen Aktivität für die  $\beta_5$ -UE die höchste Zelltod-Induktion mit ABT-199 erzielen. Auffallend ist jedoch, dass die Kombination ABT-199&CFZ eine stärkere Zelltod-Induktion als ABT-199&BTZ aufweist. Dieser Unterschied kann mit der irreversiblen Hemmung von CFZ im Gegensatz zur reversiblen Bindung von BTZ an die  $\beta_5$ -UE zusammenhängen. Es reicht jedoch nicht aus, nur die proteasomalen Aktivitätsdaten der PIs zu betrachten. Es sollten zusätzlich spätere Mess-Zeitpunkte bestimmt

werden, um zu sehen, ob CFZ und BTZ gegebenenfalls aufgrund der irreversiblen beziehungsweise reversiblen Hemmungs-Fähigkeit unterschiedlich inhibieren. Da die Halbwertszeiten der Inhibitoren sich stark unterscheiden, von <1h für CFZ über ~8 Tage für BTZ bis hin zu 9,5 Tagen für IXZ (European Union 2023 - EMA), könnte dies für Aktivitätsmessungen später als nach 4 h PI-Inkubation relevant sein. Momentan kann keine zufriedenstellende Erklärung für die unterschiedlich beobachtete proteasomale Aktivitätsmessung der PIs gegeben werden, die die Differenz der Zelltod-Induktion durch ABT-199&PIs erklären könnte.

Für weitere präklinische Versuche muss beachtet werden, dass die Darreichungsform der Substanzen sowohl eine Rolle bei der Bioverfügbarkeit spielt als auch deren Stabilität beeinflusst. IXZ wird im Gegensatz zu BTZ und CFZ nicht intravenös verabreicht, sondern kann in Tablettenform oral eingenommen werden (European Union 2023). Weiterhin ist gut charakterisiert, dass alle drei PIs als Substrat des P-Glykoprotein (P-gp)-Transporters dienen und eine differenzielle Wirkung der drei PIs durch eine unterschiedliche Effluxrate aus der Zelle ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich ist kein relevanter Einfluss der Medikamenten-Transporter der OATP (Organo-Anion-Transporter)-Klasse auf die PIs beschrieben (Clemens *et al.* 2017).

Zu vermuten ist, dass IXZ als oral verfügbarer Wirkstoff eine Aktivierung durchlaufen muss. Des Weiteren könnte ein Grund sein, dass die Bioverfügbarkeit von IXZ als oral verabreichtes Medikament durch den P-gp Effluxtransporter eingeschränkt ist. Die P-gp Effluxtransporter verringern den Zugang von verabreichten Medikamenten, indem sie den Efflux zurück ins Lumen fördern. Somit wird die Bioverfügbarkeit verringert und die Arzneimittelelimination über Galle und Urin gefördert (Gharavi und Hassan 2018). Die letztgenannte Vermutung steht im Einklang mit aufgrund fehlender Effizienz von IXZ verworfenen oder abgebrochenen klinischen Studien (NCT03856112). Allerdings muss beachtet werden, dass bereits in den *In vitro*-Zellkultur-Experimenten hinsichtlich der Effizienz der drei PIs ein Unterschied feststellbar war. In den *in vitro*-Zellkultur-Experimenten könnte eine veränderte Aufnahme der PIs in die Zelle durch unterschiedliche ABC-Transporter-Interaktionen oder verschiedene Membrangängigkeit die unterschiedliche Zelltod-Induktionen der PIs hervorgerufen haben.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die starke Abweichung der zwei eigentlich identisch wirkenden PIs BTZ und IXZ ist, dass BTZ in der Zelle in diesem Modell später als IXZ abgebaut wird. Hierfür sind weitere Untersuchungen wie ein proteasomaler Aktivitätsassay als Zeitkinetik über 24 h nötig, um die Fähigkeit der Inhibition über die Zeit an die proteasomalen UE der PIs BTZ und IXZ im Vergleich zu bestimmen. Die Wirkung der PIs bedarf weiterer Untersuchungen bezüglich der Pharmakokinetik, um genaue Rückschlüsse auf die unterschiedliche Effizienz der PIs in dem hier verwendeten Modell der Sarkomzelllinie SW982/WT treffen zu können.

## 7.4 TP53-abhängige und TP53-unabhängige NOXA-Induktion

Die in dieser Dissertation beobachtete Akkumulation von NOXA identifizierte das BH3-*only* Protein als wichtiges Schlüsselmolekül bei der Apoptose-Induktion durch ABT-199&PIs. NOXA kann über das Tumorsuppressorprotein TP53 reguliert werden. Eine Vielzahl von proapoptischen Signalen wie DNA-Schaden, ER-Stress oder Proteasom-Inhibition aktivieren TP53 und induzieren die Expression von NOXA (Guikema *et al.* 2017; Oda *et al.* 2000; Ploner *et al.* 2008; Villunger *et al.* 2003). Oda *et al.* fanden, dass NOXA als Vermittler der p53-abhängigen Apoptose dienen kann. In primären Mauszellen, die Röntgenstrahlung ausgesetzt waren, konnte eine p53-abhängige NOXA-Induktion detektiert werden. In p53-defizienten Saos2-Zellen wurde eine konstitutiv aktive p53-Überexpression herbeigeführt. Die Herunterregulation von NOXA inhibierte auch hier die durch überexprimiertes p53 hervorgerufene induzierte Apoptose (Oda *et al.* 2000). Auch Villunger *et al.* beschrieben eine p53-abhängige NOXA-Induktion. Nach Herunterregulation von NOXA war in embryonalen Maus-Fibroblasten die p53-vermittelte Apoptose reduziert (Villunger *et al.* 2003).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit in Bezug auf die Kombinationen von ABT-199&PIs zeigen nur eine teilweise TP53-abhängige Regulation von NOXA, da der *Knock-Down* von TP53 in SW982/WT-Zellen sowohl die Proteinexpression von NOXA als auch die mRNA-Expression von PMAIP1 nur geringfügig reduzierte (Abbildung 25 und Abbildung 26). Daher liegt die Vermutung nahe, dass NOXA in diesem Setup über eine in der Literatur bereits beschriebene TP53-unabhängige Regulation induziert wird. Dies wurde durch Experimente in TP53-defizienten H1299-Zellen bestätigt. In den TP53-defizienten H1299/WT-Zellen war die Protein- und mRNA-Expression von NOXA im Vergleich zu der H1299-Zelllinie mit rekonstituierter TP53-Expression (H1299/TP53) nur geringfügig schwächer. Dies steht im Einklang mit verschiedenen Publikationen, die ebenfalls eine TP53-unabhängige NOXA-Regulation belegen (Kim *et al.* 2004; Pérez-Galán *et al.* 2006; Ploner *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2018).

Obwohl Noxa ursprünglich als TP53-Zielgen identifiziert wurde (Hijikata *et al.* 1990), ist in vielen Tumoren durch Deletion oder Mutation TP53 inaktiviert (Eischen *et al.* 1999). Daher sind TP53-unabhängige Regulationsmechanismen von NOXA von besonderem Interesse und könnten auch Resistenzentwicklung bei Monotherapien unabhängig vom TP53-Status verhindern oder durchbrechen. Darauf weisen Ergebnisse von Kim *et al.* hin, die eine transkriptionelle Induktion von PMAIP1/NOXA unter hypoxischen Bedingungen in p53-deletierten Saos-2-Zellen über den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  durch das auf dem NOXA-Promotor befindliche HRE (*Hypoxia-Response Element*) gefunden haben. Weitere Belege liefert auch die Gruppe von Sharma *et al.*, die 2017 eine transkriptionelle mRNA-Induktion von PMAIP1 in HNSCC-Zellen mit inaktivem TP53 bei Cisplatin-Therapie beschrieben. Im Unterschied zu Kim *et al.*, ist die von Sharma *et al.* beschriebene TP53-unabhängige NOXA-

Regulation nicht über HIF-1 $\alpha$  gewährleistet, sondern durch die gemeinsame Bindung der induzierten Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 an den NOXA-Promotor. Die vorgeschlagene ATF3&ATF4-vermittelte NOXA-Induktion wird von teilweise erst kürzlich erschienenen Ergebnissen gestützt (Núñez-Vázquez *et al.* 2021). Um die Regulation der NOXA-Expression besser zu verstehen, generierten Wang *et al.* ein Reportergenkonstrukt, das die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines DNA-Abschnitts aus dem NOXA-Promotor exprimiert. Im Reportergenassay wurde die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem CHOP, ATF6, ATF3 und ATF4 analysiert. Es zeigte sich, dass ATF3 und ATF4 den NOXA-Promotor mäßig aktivieren konnten, während CHOP und ATF6 keine oder nur minimale Luciferase-Aktivität induzierten. Interessanterweise induzierte die Co-Expression von ATF3 und ATF4 eine deutlich verstärkte Luciferase-Aktivität. Des Weiteren zeigte ein Reporterkonstrukt mit fehlender p53-Bindestelle im NOXA-Promotor weiterhin eine Luciferase-Aktivität, was wiederum eine p53-unabhängige Bindung von ATF3 und ATF4 bestätigt. Mit Hilfe eines *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) zeigte sich, dass ATF3 fähig ist, ATF4 an den NOXA-Promotor zu rekrutieren und dort einen ternären DNA-Protein-Komplex bildet (Wang *et al.* 2009). Diese Bindung von ATF3 und ATF4 an den NOXA-Promotor wurden auch von Nuñez-Vázquez *et al.* beschrieben. Diese Untersuchungen identifizieren zudem eine wichtige CRE-Bindestelle im NOXA-Promotor, die für die transkriptionelle NOXA-Aktivierung durch Fluorizolin unerlässlich ist. Durch Chromatin-Immunopräzipitations-Assays (ChIP) wurden die zwei Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 identifiziert, die bei Fluorizolin-Inkubation in HeLa-Zellen an den NOXA-Promotor gebunden vorlagen. Als pro-apoptisches Agens bindet Fluorizolin an Prohibitin 1 und 2, wodurch die mitochondrial-vermittelte Apoptose p53-unabhängig ausgelöst wird. Durch *Knock-Out* von ATF3 und ATF4 über CRISPR/CAS9 konnte bestätigt werden, dass ATF3 und ATF4 für die Fluorizolin-induzierte NOXA-Expression verantwortlich sind. Nach *Knock-Out* von ATF3 und ATF4 war die Fluorizolin-induzierte NOXA-Expression in Western Blot Analysen nicht mehr zu detektieren (Núñez-Vázquez *et al.* 2021). Weitere Aspekte, die für eine transkriptionelle NOXA-Induktion sprechen, sind folgende Ergebnisse: In AML-Zelllinien und primären Patientenproben wurde eine transkriptionelle NOXA-Induktion nach Inkubation mit 5'-Azacitidin beobachtet. Durch eine vielversprechende klinische Phase II Studie mit ABT-199 als Monotherapie mit einer Ansprechrate (ORR) von 19% (Konopleva *et al.* 2016) (NCT01994837) wurde ABT-199 als klinisch aktives und mit tolerierbarem Sicherheitsprofil als Einzelwirkstoff bei Patienten mit rezidivierender oder refraktärer AML eingestuft. Dies diente als Grundlage für eine Phase Ib Studie mit ABT-199 in Kombination mit 5'-Azacitidin für die Behandlung von AML (DiNardo *et al.* 2020; DiNardo *et al.* 2019) (NCT02203773). Aufgrund der ermutigenden Daten mit einer ORR von 67% bei der Kombinationstherapie mit ABT-199 und 5'-Azacitidin in AML-Patienten wurde eine Phase III Studie für AML-Patienten, die für eine Standard-Induktionstherapie nicht in Frage kamen,

gestartet (M15-656, NCT02993523). Die Studie inkludierte AML-Patienten, die für eine Chemotherapie nicht in Frage kamen. Das Resultat der Studie zeigte, dass die Gesamtüberlebenszeit und die Inzidenz der Remission bei den AML-Patienten, die die Kombinationstherapie mit 5'-Azacitidin und ABT-199 erhielten, länger und höher war als bei denen, die nur 5'-Azacitidin erhielten (DiNardo *et al.* 2020).

Die Arbeitsgruppe von Jin *et al.* erforschte den zugrundeliegenden Mechanismus der beobachteten Kombinationswirkung von ABT-199 und 5'-Azacitidin. Für die transkriptionelle Hochregulation von NOXA wurde die Induktion von ATF4, die im Zuge der ISR-Aktivierung erfolgt, identifiziert (Jin *et al.* 2020). Das zentrale Ereignis der ISR ist die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ , die eine allgemeine Reduktion der Protein-Synthese und gleichzeitig die Translation spezifischer mRNAs oder offener Leserahmen von alternativen Startcodons veranlasst (Costa-Mattioli und Walter 2020; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016). Eine weitere, erst kürzlich erschienene Publikation beschreibt eine pro-apoptotische Wirkung von ABT-199 und Auranofin in *B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia* (BCP-ALL), bei der ebenfalls die ISR aktiviert wird. Auranofin inhibiert die Thioredoxin-Reduktase und wird als Basistherapie bei rheumatoider Arthritis eingesetzt. In BCP-ALL-Zelllinien fördert Auranofin epigenetische Veränderungen und Chromatin-Relaxation im *PMAIP1*-Gen, sodass das *PMAIP1*-Gen empfänglicher für die transkriptionelle Aktivierung ist. Zusätzlich triggert Auranofin mitochondrialen Stress und induziert p53-unabhängig Apoptose. In Kombination mit ABT-199 erhöht Auranofin die Chemosensitivität von BCP-ALL-Zelllinien für ABT-199. Sowohl in BCP-ALL-Zelllinien als auch in PDX-Modellen wurde durch die Kombination aus ABT-199&Auranofin ATF4 induziert und über ISR der ABT-199&Auranofin-vermittelte Zelltod gefördert. Auch hier konnte bestätigt werden, dass die transkriptionelle Induktion von NOXA p53-unabhängig durch Involvierung von ATF4 und der ISR reguliert wird (Fidyt *et al.* 2022).

Auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen eine transkriptionelle ATF3&ATF4-vermittelte NOXA-Induktion in Anwesenheit von ABT-199 allein und verstärkt in Kombination mit den PIs durch Aktivierung der ISR. In den zwei oberen Abschnitten erwähnten Publikationen wurde berichtet, dass eine transkriptionelle NOXA-Induktion durch Fluorizolin, 5'-Azacitidin oder Auranofin vermittelt wurde, während die Anwesenheit von ABT-199 nur zu einer Sensitivierung der Apoptose führte (Fidyt *et al.* 2022; Jin *et al.* 2020; Núñez-Vázquez *et al.* 2021). Im Gegensatz dazu verursacht ABT-199 in dieser Arbeit allein und verstärkt in Kombination mit BTZ eine ATF3&ATF4-abhängige transkriptionelle *PMAIP1*-Induktion.



## 7.5 Mögliche Mechanismen der *PMAIP1*/NOXA-Induktion

### 7.5.1 ABT-199-vermittelte Transaktivierung von NOXA

Im Gegensatz zu anderen Veröffentlichungen (Fidyt *et al.* 2022; Jin *et al.* 2020; Núñez-Vázquez *et al.* 2021) beschreibt die vorliegende Arbeit interessanterweise die durch ABT-199 vermittelte und durch PI verstärkte (BTZ, CFZ, IXZ) ATF3&ATF4-abhängige *PMAIP1*-Induktion. Der Transkriptioneninhibitor ACM-D blockiert die ABT-199 hervorgerufene *PMAIP1*-Induktion effektiv, wodurch erkennbar ist, dass die NOXA-Induktion transkriptionellen Ursprungs ist. Die transkriptionelle Aktivierung von *PMAIP1* durch ABT-199 ist ein hier erstmals beschriebener *Off-Target*-Effekt von ABT-199. Zudem wurde in Anwesenheit von CHX die NOXA-Induktion sowohl bei Inkubation mit den PIs als auch in Kombination mit ABT-199 blockiert, was auf eine Protein-Neusynthese von NOXA schließen lässt. Die verstärkte NOXA-Expression ist deshalb nicht nur auf die Akkumulation von NOXA zurückzuführen, das aufgrund der Inhibition des Proteasoms nicht abgebaut wird.

Das erhöhte (P)-eIF2 $\alpha$ -Level und die Induktion von ATF3 auf transkriptioneller und von ATF4 auf post-transkriptioneller Ebene bestätigen die ISR als Antwort auf ABT-199  $\pm$  PIs. Allerdings bleibt unklar, wie ATF4 über die ISR induziert wird. Sobald mögliche parallele Signalwege aufgeklärt oder *Upstream*-Schlüsselmoleküle identifiziert sind, könnten diese Moleküle als Aktivatoren eine alternative Strategie sein, um NOXA gezielt zu induzieren und so effizient den Zelltod auszulösen. (P)-eIF2 $\alpha$  könnte nicht-identifizierte Transkriptionsfaktoren induzieren, die wiederum die Transkription von ATF4 oder weiteren Elementen der ISR fördern. Nun stellt sich die Frage, ob die ISR direkt ATF3&ATF4 induziert oder indirekt über weitere Transkriptionsfaktoren. Zur Beantwortung dieser Frage könnten reverse ChIP-Experimente durchgeführt werden, um weitere involvierte Transkriptionsfaktoren/Schlüsselmoleküle bei der Aktivierung von ATF4 mittels Massenspektrometrie zu identifizieren.

Ein alternativer Grund für die Induktion von ATF4 ist die Abhängigkeit von der Effektivität der ISR, die wiederum von der Art des Stress-Signals, von dessen Dauer und Stärke bestimmt wird, aber auch von dem Ausmaß der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und der Translation von ATF4 (Dey *et al.* 2010; Guan *et al.* 2014; Pakos-Zebrucka *et al.* 2016). Unter normalen Bedingungen wird der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  in der Zelle durch spezifische Phosphatase-Komplexe entgegengesteuert. Das konstitutiv exprimierte CReP reguliert die Phosphatase-Aktivität durch Rekrutierung der Protein-Phosphatase-1c (PP1c) und damit zu einer stetigen Dephosphorylierungsrate von (P)-eIF2 $\alpha$ . Unter Stress-Bedingungen wird die mRNA von GADD34 durch ATF4 transkriptionell induziert, die GADD34-Proteinkonzentration in der Zelle damit erhöht und die Dephosphorylierung von (P)-eIF2 $\alpha$  mittels GADD34 vorangetrieben. Diese Rückkopplungsschleife von GADD34 antagonisiert die relative Stärke der ISR-

Aktivierung und erlaubt der Zelle die Beseitigung der verlangsamten globalen Proteinsynthese, wodurch die ISR aufgehoben werden kann (Jousse *et al.* 2003; Novoa *et al.* 2001). Wenn der zelluläre Stress nicht durch den Abbau an (P)-eIF2 $\alpha$  mittels GADD34 neutralisiert werden kann, hält die verlangsamte globale Proteinsynthese an und durch die Translation spezifischer mRNAs wie ATF4 vermittelt induziertes ATF4 die Apoptose (Costa-Mattioli und Walter 2020).

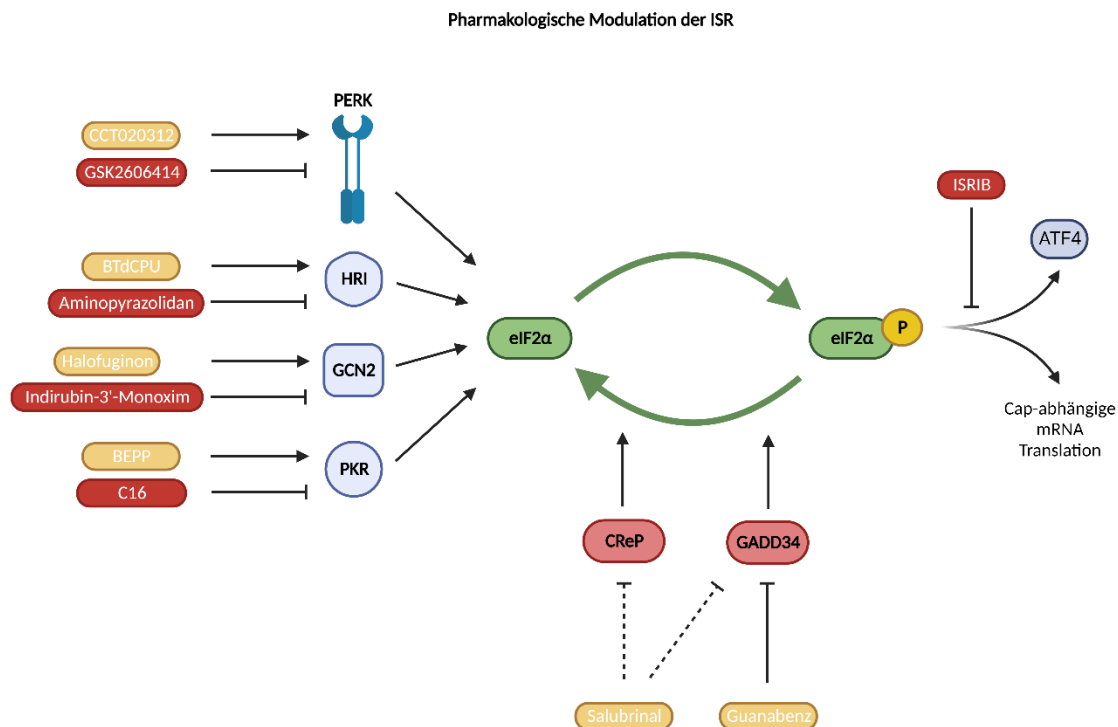
Um die Rolle der ISR in der ABT-199-induzierten NOXA-Expression genauer zu betrachten, wurde der spezifische ISR-Inhibitor ISRIB eingesetzt. ISRIB antagonisiert den inhibitorischen Effekt von (P)-eIF2 $\alpha$ . Durch Bindung an die regulatorische  $\delta$ -UE fördert ISRIB den Zusammenbau des aktiven eIF2B-Komplexes und stabilisiert diesen, wodurch ein ausreichender Pool an aktiven eIF2B-Komplexen entsteht. Die GEF-Aktivität des eIF2B-Komplexes gewährleistet die Bildung des ternären Komplexes aus eIF2, GTP und Met-tRNA und die durch zellulären Stress verlangsamte Protein-Synthese wird bei gleichzeitiger Attenuation der Translation spezifischer mRNAs wieder angeschoben. Durch Verlangsamung der ATF4-Translation wird das Level an aktiven Phosphatase-Komplexen wie GADD34 und die Dephosphorylierung von (P)-eIF2 $\alpha$  gesenkt (Costa-Mattioli und Walter 2020; Zyryanova *et al.* 2018). Einige Publikationen bestätigen die Fähigkeit von ISRIB, die ISR abzuschwächen (Arai *et al.* 2020; Jin *et al.* 2020; Palam *et al.* 2015). Bereits 2015 konnten Palam *et al.* eine Verlangsamung der globalen Protein-Synthese bei gleichzeitiger Stress-induzierter eIF2-Phosphorylierung mit gesteigerter ATF4 und CHOP mRNA- und Protein-Expression nach Gemcitabin-Inkubation in der pankreatischen Krebszelllinie PANC-1 beobachten (Palam *et al.* 2015). Nach Co-Applikation mit 500 nM ISRIB und 10  $\mu$ M Gemcitabin konnte die ATF4-Proteinexpression signifikant reduziert werden. Allerdings war die durch Gemcitabin vermittelte eIF2-Phosphorylierung und GADD34-Hochregulation durch ISRIB nur zu dem Zeitpunkt von 6 h verringert, nach 12 h wirkte ISRIB in diesem Setup bereits nicht mehr. Ein vergleichbares Ergebnis erzielten Arai *et al.*, die eine bereits durch 100 nM ISRIB abgeschwächte NOXA-Induktion durch den Tyrosin-Kinase-Inhibitor Erlotinib in LNCaP Prostatakarzinomzellen zeigen. Interessant ist, dass die Vorinkubation mit 100 nM ISRIB für 1 h entscheidend für reduzierte *PMAIP1* mRNA-Induktion durch Erlotinib war (Arai *et al.* 2020). Auch in AML-Zelllinien konnte die durch 5'-Azacitidin hervorgerufene ISR mit begleiteter NOXA-Induktion durch Co-Applikation mit 200 nM ISRIB abgeschwächt werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der *PMAIP1* mRNA nach 6 h, während der 5'-Azacitidin-vermittelte Zelltod nur teilweise durch die Co-Applikation von ISRIB vermindert wurde (Jin *et al.* 2020).

Überraschenderweise zeigte ISRIB in den hier erzielten Ergebnissen nach 8 h keinen signifikanten Einfluss auf die ABT-199&BTZ-vermittelte transkriptionelle Induktion von *ATF3*, *ATF4* oder *PMAIP1*. Nach Inkubation mit ABT-199 war die mRNA-Expression von *ATF3*, *ATF4*

und *PMAIP1* nur leicht verringert (Abbildung 43). Die im Western Blot bestätigte Akkumulierung von (P)-eIF2 $\alpha$  nach 8 h durch ABT-199&BTZ in Anwesenheit von ISRIB war nach 48 h nicht mehr zu detektieren. Dies kann durch die Induktion von GADD34 erklärt werden, da das bei Stress induzierte GADD34 zur Dephosphorylierung von (P)-eIF2 $\alpha$  beiträgt. Als Konsequenz der unbeeinflussten ATF4-Expression bei Inkubation mit ABT-199&BTZ in Anwesenheit von ISRIB kam es auch zu keinen Expressions-Veränderungen der Proteine ATF3 und NOXA. Durch die Abwesenheit eines Effekts durch ISRIB in Bezug auf veränderte mRNA- und Proteinexpressionen von *ATF3*, *ATF4* und *PMAIP1/NOXA*, blieb auch der ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod durch ISRIB unverändert. Es ist festzuhalten, dass ISRIB in diesem Setup die ISR nicht abschwächen konnte. Es ist bekannt, dass ISRIB nur ein begrenztes Wirkfenster aufweist und die Antagonisierung der ISR zudem von der Stärke des Stress-*Triggers* abhängt (Rabouw *et al.* 2019). Weitere Hinweise von Rabouw *et al.* zeigen, dass ISRIB sowohl die durch Picornaviren induzierte als auch die durch Arsenit ausgelöste ISR nicht beenden kann. Rabouw *et al.* schlagen vor, dass das Level an akkumuliertem (P)-eIF2 $\alpha$  mit der Fähigkeit von ISRIB, die ISR abzuschwächen, korreliert. ISRIB kann die ISR nur abschwächen, wenn das (P)-eIF2 $\alpha$ -Level unter einem kritischen Schwellenwert von 40% des maximalen (P)-eIF2 $\alpha$ -Levels ist. Rabouw *et al.* schlägt vor, dass ISRIB nur bei Bedingungen mit limitiertem Zellstress effektiv wirken kann. Auch die hier durch ABT-199&BTZ-aktivierte ISR könnte bereits zu stark sein, wodurch ISRIB nicht mehr wirksam ist. Um dies zu überprüfen, muss bei nachfolgenden Experimenten die Versuchsbedingung geändert werden und ISRIB 1-2 h vor Aktivierung der Stressantwort zugegeben werden. So kann ISRIB eine antagonisierende Wirkung direkt bei Eintritt der ISR entfalten, da ISRIB *Downstream* von (P)-eIF2 $\alpha$  angreift (Costa-Mattioli und Walter 2020). Es ist auch denkbar, dass die ABT-199&BTZ-induzierte ISR nicht aufgehoben wird, da nicht ausreichend eIF2-UE für die ISRIB-induzierte eIF2B-Komplexbildung zur Verfügung stehen (Rabouw *et al.* 2019). Zudem werden aktive eIF2B-Komplexe wiederum von (P)-eIF2 $\alpha$  inhibiert, wodurch nicht genügend aktive eIF2B-Komplexe für eine teilweise Wiederherstellung der Proteinsyntheserate durch ISRIB vorhanden sind (Costa-Mattioli und Walter 2020). Aufgrund dessen muss die Effizienz von ISRIB, die aktivierte ISR zu antagonisieren, kritisch betrachtet werden. Um der Ursache in diesem Kontext auf den Grund zu gehen, ob die Stressantwort bereits zu weit fortgeschritten ist und ISRIB die antagonisierende Wirkung deshalb nicht entfalten kann oder die Verfügbarkeit von UE für den Zusammenbau des aktiven eIF2B-Komplexes der limitierende Faktor ist, müssen weiterführende Untersuchungen erfolgen.

Als mögliche Alternative zu ISRIB, die Rolle der ISR in der ABT-199-induzierten NOXA-Expression zu analysieren, ist der Einsatz weiterer Substanzen, die verschiedene Komponenten der ISR aktivieren oder inhibieren. Untersuchungen, wie das Steigern der ISR durch Kinase-Aktivierung/Phosphatase-Inhibierung oder das Absenken der ISR durch

Blockierung der eIF2 $\alpha$ -Kinasen sind wichtige Stellschrauben, um eine möglicherweise veränderte ABT-199-induzierte NOXA-Expression durch pharmakologische Modulation der ISR festzustellen. Die PERK-Kinase kann durch CCT020312 aktiviert werden, die HRI-Kinase mittels BTdCPU, die GCN2-Kinase mit Hilfe von Halofuginon und die PKR mittels BEPP, was zu gesteigerter Akkumulation von (P)-eIF2 $\alpha$  führt (Abbildung 40). Auch die Inhibierung der Dephosphorylierung durch die Phosphatase-Inhibitoren Salubrinal oder Guanabenz stellen attraktive Methoden dar, *Upstream* von eIF2 $\alpha$  in den Signalweg einzugreifen. Um die Auswirkungen einer verminderten ISR auf die Induktion von ATF3 und ATF4 und die Transkription von *PMAIP1* zu analysieren, sind eIF2 $\alpha$ -Kinase-Inhibitoren wie GSK2606414 für die PERK-Inaktivierung, C16 für die PKR-Inaktivierung, Aminopyrazolidan für die HRI-Inaktivierung und Indirubin-3'-Monoxim für die GCN2-Inaktivierung interessant (Pakos-Zebrucka *et al.* 2016).



**Abbildung 40: Pharmakologische Modulation zur Aktivierung/Inhibierung verschiedener Komponenten der ISR.** Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  als zentrales Ereignis der ISR kann entweder durch Aktivierung der eIF2 $\alpha$ -Kinasen mit CCT020312, BTdCPU, Halofuginon oder BEPP stimuliert werden oder durch Inhibitoren wie GSK2606414, Aminopyrazolidan, Indirubin-3'-Monoxim oder C16 verhindert werden. Guanabenz und Salubrinal können die Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  blockieren. ISRIB wiederum antagonisiert den inhibitorischen Effekt von (P)-eIF2 $\alpha$  (mit BioRender.com erstellt).

## 7.5.2 Die Rolle von ATF3&ATF4 in der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion

Eine alternative Möglichkeit, um den Zusammenhang zwischen der ISR, der ATF3&ATF4-Induktion und der erhöhten *PMAIP1*/NOXA-Expression zu überprüfen, stellt die gleichzeitige Herunterregulation der zwei Transkriptionsfaktoren *ATF3* und *ATF4* mittels siRNA dar. In der Tat konnte bestätigt werden, dass *ATF3&ATF4* bei der transkriptionellen *PMAIP1*/NOXA-Induktion und der ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion beteiligt sind. Allerdings kann der *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* den ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod nicht vollständig verhindern. Das könnte an dem nicht-kompletten *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* liegen.

Der Zusammenhang der Involvierung der ISR und einer ATF3&ATF4-Induktion mit transkriptioneller Induktion von *PMAIP1* durch ABT-199 sind neue Erkenntnisse. Jedoch wird die transkriptionelle Induktion von *PMAIP1* durch *ATF3&ATF4* in einer Vielzahl weiterer Publikationen diskutiert. Die Arbeitsgruppe von Sharma *et al.* erzielte bei *Knock-Down* von entweder *ATF3* oder *ATF4* in HN8- oder HN12-Zellen beidermaßen eine stark reduzierte Cisplatin vermittelte NOXA-Induktion (Sharma *et al.* 2018). Ebenso stimmen die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse des *Knock-Downs* von *ATF3&ATF4* in Teilen mit dem Bericht von Nuñez-Vaquéz *et al.* überein, in dem ebenfalls bei Herunterregulation von *ATF4* eine signifikant reduzierte Fluorizolin-vermittelte NOXA mRNA-Expression beobachtet wurde (Núñez-Vázquez *et al.* 2021). Auffallend ist, dass durch *Knock-Out* von *ATF4* nach 24 h die Fluorizolin-vermittelte NOXA-Expression komplett verhindert werden konnte, während der *Knock-Out* von *ATF3* die NOXA-Expression nur schwach reduzierte. Ebenso zeigte der *Knock-Out* von *ATF3* oder *ATF4* eine signifikant erhöhte Zellviabilität nach Fluorizolin-Inkubation in HeLa- oder HAP1-Zellen nach 24 h. Interessant wäre der gleichzeitige *Knock-Down* von *ATF3&ATF4* in der Cisplatin oder Fluorizolin-vermittelten NOXA-Induktion, da bislang nur der *Knock-Down* oder *Knock-Out* von einem der zwei Gene *ATF3* oder *ATF4* gezeigt wurde. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse des simultanen *Knock-Downs* von *ATF3&ATF4* legen nahe, dass hauptsächlich ATF3&ATF4 als Mediatoren der ISR und der damit einhergehenden NOXA-Induktion wichtig sind. Trotzdem kann die Involvierung weiterer Signalwege oder Faktoren, aufgrund dessen die *PMAIP1*/NOXA-Expression nicht vollständig unterdrückt wird, in diesem Setup nicht ausgeschlossen werden. Als Beispiel wäre hier die Interaktion weiterer, nicht identifizierter Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls an den NOXA-Promotor binden und dessen Transkription fördern könnten, aufzuführen.

## 7.5.3 ROS-Produktion als möglicher Induktor der ISR

Um der Frage nachzugehen, auf welche Weise die eIF2 $\alpha$ -Kinasen aktiviert werden, wurde oxidativer Stress als möglicher Induktor der ISR untersucht. Oxidativer Stress erhöht das ROS-Level in der Zelle. Die ROS-Produktion durch Mitochondrien kann zu oxidativen Schäden der

Zelle führen, wodurch es zu Beeinträchtigungen der ATP-Synthese und weiteren Stoffwechselfunktionen kommt (Murphy 2009). Vorherige Arbeiten in der Gruppe zeigen, dass Cisplatin neben dem vielfach beschriebenen DNA-Schaden auch zu erhöhtem mtROS-Level in den Ovarialkarzinom-Zelllinien OV3, OV4 und OV8 führt und der Cisplatin-induzierte Zelltod proportional zu mtROS ist. Dabei senkt der ROS-Fänger GSH die Zelltod-Raten von Cisplatin-sensitiven OV3 und OV4 signifikant (Kleih *et al.* 2019). Erst kürzlich beschrieb die Gruppe von Lee *et al.*, dass ABT-199 die ROS-Produktion anhebt (Lee *et al.* 2021). Interessant ist jedoch, dass die durch ABT-199&BTZ-induzierte Apoptose in dieser Arbeit unabhängig von ROS ist, da die Radikalfänger GSH oder NAC die ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion nicht reduzierten (Abbildung 33). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die ansteigende ROS-Produktion nach ABT-199&BTZ-Inkubation zu gering ist und in den hier untersuchten SW982/WT-Zellen nicht die entscheidende Rolle zur Aktivierung von ATF4 spielt. Somit wird die ATF4-Induktion nicht über oxidativen Stress ausgelöst. Des Weiteren ist zu beachten, dass die alleinige Anwesenheit von ABT-199 die Zellen „primen“ könnte, wodurch die bekannten Stress-Marker *ATF3* und *ATF4* verstärkt induziert werden. Dies treibt die transkriptionelle Induktion von *PMAIP1* mit einhergehender Translation von NOXA-Protein voran. Aber erst durch den zusätzlichen Stress-Trigger der Proteasom-Inhibition mit Hilfe von BTZ könnte ein kritischer Schwellenwert erreicht werden, der zur synergistischen ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod-Induktion führt.

#### **7.5.4 ABT-199 induziert mitochondrial metabolisches *Reprogramming***

Erst kürzlich zeigten Roca-Portoles *et al.*, dass ABT-199 unabhängig von der BCL-2-Inhibition mitochondriales metabolisches *Reprogramming* verursacht (Roca-Portoles *et al.* 2020). In CT26-Zellen führte die Inkubation mit 1  $\mu$ M ABT-199 bereits zu einer signifikant geringeren OCR. Des Weiteren wurden die Metabolit-Level mittels GC-MS analysiert. Eine Veränderung der Metabolite des *tricarboxylic acid cycle* (TCA-Zyklus) wie  $\alpha$ -KG und Citrat weisen auf mitochondriales metabolisches *Reprogramming* hin. Charakteristisch für die reduktive Carboxylierung ist mitunter das ansteigende Verhältnis von  $\alpha$ -KG zu Citrat (Fendt *et al.* 2013). 1  $\mu$ M ABT-199 führte zur Akkumulation von  $\alpha$ -KG und Succinat und ließ den Schluss zu, dass ABT-199 den *tricarboxylic acid cycle* (TCA-Zyklus) inhibiert, das ein Indiz für die reduktive Carboxylierung darstellt (Roca-Portoles *et al.* 2020). Die bei Roca-Portoles *et al.* gezeigten metabolischen Veränderungen entstehen im Zuge der Aktivierung der ISR bei gleichzeitiger ATF4-Induktion. Bestätigt wird dies durch *Knock-Down* von ATF4, das die reduzierte OCR aufhebt und die reduktive Carboxylierung verhindert (Roca-Portoles *et al.* 2020). ATF4 hilft einerseits bei geringen Stress-Signalen zur zellulären Homöostase zu führen, andererseits trägt es hingegen bei zu hohem Stress-Level über Aktivierung des pro-apoptischen BH3-*only* Proteins NOXA zum Zelltod bei. Wie die ATF4-Induktion allerdings in den mit ABT-199-inkubierten CT26-Zellen bei Roca-Portoles *et al.* eingeleitet wird, bleibt im Unklaren. Das

mitochondriale metabolische *Reprogramming*, das bei ABT-199-Inkubation in CT26-Zellen entsteht, wurde von der Roca-Portoles-Gruppe angeführt, die nachwies, dass ABT-199 zu Veränderungen in der Mitochondrien-Morphologie führt. Eine veränderte Mitochondrien-Morphologie spiegelte sich in CT26- und MCF-7-Zellen durch Vergrößerung der Mitochondrien wieder. Außerdem senkt ABT-199 die Aktivitäten der Komplexe I und II der Atmungskette. Der Komplex II der Atmungskette ist ein Enzymkomplex aus vier UE, wobei eine UE die Succinate-Coenzym Q Reduktase (SQR) ist. ABT-199 beeinträchtigt die Aktivität der SQR, die die Oxidation von Succinat zu Fumarat und die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol als gekoppelte Reaktion in der inneren Mitochondrienmembran katalysiert. Dies erklärt die von ABT-199 hervorgerufene Akkumulation von Succinat, das durch verminderte Aktivität des Komplexes II in geringerem Umfang zu Fumarat umgewandelt wird.

Die Tatsache, dass ABT-199 die Atmungskette unabhängig von seinem Zielmolekül BCL-2 beeinflusst, wird auch von Bajpai *et al.* beschrieben, die annehmen, dass die Inhibition des Komplexes II durch ABT-199 ausschlaggebend für die ATF4-Induktion ist (Bajpai *et al.* 2020). Gleichzeitig führt eine Dysbalance in der ETC durch Komplex II-Inhibition zur Induktion von ATF4. Die ATF4-Induktion wird von der NOXA-Induktion begleitet. Bajpai *et al.* beschreiben weiter, dass NOXA mit höherer Affinität an MCL-1 bindet als BIM (Bajpai *et al.* 2020) und postulieren, dass freigesetztes BIM daraufhin vermehrt an BCL-2 bindet. Somit konnte eine Resistenz gegenüber ABT-199 in MM-Zelllinien mit hohem BCL-2-Expressionslevel durch freigewordenes BIM überwunden werden. Die Inhibition des Komplexes II mittels TTFA induzierte ATF4 und NOXA ebenso in MM-Patientenproben und verringerte den IC<sub>50</sub>-Wert von ABT-199 signifikant im Vergleich zur alleinigen Gabe von ABT-199 (Bajpai *et al.* 2020). Die metabolische Wirkung von ABT-199 durch Dysbalance in der ETC kann in Kombination mit Komplex II Inhibitor TTFA ABT-199-resistente MM-Zellen für eine Kombination mit ABT-199 resensitivieren.

In Übereinstimmung mit der Literatur erzielten ABT-199 ± BTZ in dieser Arbeit ebenso eine metabolische Wirkung, die sich in einem gesteigerten Verhältnis an  $\alpha$ -KG zu Citrat widerspiegelte (Abbildung 34). Eine schlüssige Erklärung ist hierbei eine Inhibition des TCA-Zyklus. Das signifikant ansteigende Verhältnis an  $\alpha$ -KG:Citrat bestätigt, dass ABT-199 mitochondrial metabolisches *Reprogramming* induziert und zu steigender reduktiver Carboxylierung beiträgt. Inwieweit hier die Aktivität des Komplexes II der SQR durch ABT-199 beeinträchtigt wird und ob dies eine entscheidende Rolle spielt, muss durch weitere Analysen, zum Beispiel mittels eines SQR-Aktivitäts-Assays, bestimmt werden. Des Weiteren gilt es zu untersuchen, ob eine daraus resultierende Dysbalance in der ETC zur ATF4-Induktion führt und welche weiteren über ATF4 *Upstream* liegenden Schlüssel-moleküle in der ISR-Aktivierung involviert sind.

Da der von Roca-Portoles *et al.* beschriebene respiratorische Effekt von ABT-199 zu dem synergistischen Effekt beiträgt, sollte zusätzlich die Rolle der veränderten Mitochondrien-Morphologie als mögliche Kompensation und Ursache der dysregulierten ETC erforscht werden. Aufgrund dessen sollte ein weiteres zukünftiges Ziel die Prüfung der ABT-199-veränderten Mitochondrien-Morphologie sein, die nicht nur von Roca-Portoles Arbeitsgruppe demonstriert wurde, sondern bereits von Sharon *et al.* 2019 publiziert wurde (Sharon *et al.* 2019). Auch hier zeigten Zellen, die mit ABT-199 inkubiert wurden, unabhängig von der BCL-2-Inhibition eine veränderte Mitochondrien-Morphologie mit signifikant vergrößerten Mitochondrien in MOLM-13-Zellen. Durch die Veränderungen in der Atmungskette und der damit einhergehenden Inhibierung der oxidativen Phosphorylierungs-Aktivität (OXPHOS) bei gleichzeitiger Unterdrückung der glykolytischen Kapazität kann die ATP-Produktion in den mit ABT-199-inkubierten MOLM-13-Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden. Dies führt zu einem energetischen Kollaps und zum Zelltod (Sharon *et al.* 2019). Auch in den SW982/WT-Zellen wäre der von Sharon und seiner Arbeitsgruppe beschriebene energetische Kollaps denkbar. Mittels eines ATP-Assays könnte man Rückschlüsse auf eine veränderte ATP-Produktion bzw. Veränderungen in der Aktivität der Atmungskette erhalten.

### 7.5.5 Mitochondrialer Import

ABT-199 ruft eine Dysbalance in der Atmungsketten-Funktion hervor und damit geht eine veränderte mitochondriale Respiration einher. Die Komplexe I, III und IV der Atmungskette enthalten nukleär und mitochondrial kodierte UE, während Komplex II ausschließlich aus vier nukleär kodierten UE aufgebaut wird (van Vranken *et al.* 2015). Bei dem Ablauf der ATP-Produktion in Mitochondrien ist es daher von enormer Wichtigkeit, dass der mitochondriale Import der UE der ETC-Komplexe ungestört erfolgt. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten auf einen durch ABT-199 gestörten mitochondrialen Proteinimport von UE der Atmungskette zurückzuführen sein.

Perciavalle *et al.* beschrieben interessanterweise den mitochondrialen Import des anti-apoptotischen Proteins MCL-1. Die Ergebnisse legen nahe, dass das anti-apoptotische Protein MCL-1 eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz besitzt. Über TOM/TIM-vermittelte Translokation ins Mitochondrium entsteht eine verkürzte MCL-1-Form (MCL-1<sub>s</sub>), die ausschließlich in der inneren mitochondrialen Membran und der Matrix vorzufinden ist, während eine größere, nicht prozessierte MCL-1-Form (MCL-1<sub>L</sub>) nur in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Die Autoren postulieren, dass in den untersuchten MEF-Zellen (Maus-embryonale-Fibroblasten) MCL-1<sub>L</sub> die typische anti-apoptotische Aktivität besitzt und BAX und BAK antagonisiert, um die mitochondriale Integrität aufrecht zu erhalten. Eine anti-apoptotische Funktion von MCL-1 wurde für MCL-1<sub>s</sub> nicht bestätigt. Es wurde demonstriert, dass MCL-1<sub>s</sub> die mitochondriale Struktur und Energieproduktion aufrechterhält



und die Fusion reguliert (Perciavalle *et al.* 2012). Es muss berücksichtigt werden, dass die beschriebenen Ergebnisse auf einer endogenen MCL-1-Deletion in MEFs basiert. Dabei führt die MCL-1-Deletion auf der einen Seite zu verminderter Proliferation und zu Defekten der mitochondrialen Morphologie wie Verlust von tubulären Strukturen, auf der anderen Seite werden reduzierte enzymatische Aktivitäten der Atmungsketten-Komplexe I, II und IV beobachtet (Perciavalle *et al.* 2012). Übereinstimmend mit der Beschreibung der zwei MCL-1-Formen konnte in dieser Arbeit ebenso ein verändertes Bandenmuster von MCL-1 in Anwesenheit von ABT-199 beobachtet werden. ABT-199 führte nach 4 h und 8 h zu einer signifikanten Reduktion der MCL-1<sub>s</sub>-Form in der mitochondrialen Fraktion aus der H1299/WT-Zelllinie. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ABT-199 den Import von MCL-1 beeinträchtigt. Allerdings ist unklar, wie ABT-199 in diesem Zusammenhang exakt agiert. Eine Vermutung ist, dass ABT-199 in der eingesetzten Konzentration (15 µM) trotz hoher Affinität für BCL-2 zusätzlich MCL-1 bindet und durch Stabilisierung der Konformation den Import und die Prozessierung des MCL-1-Moleküls ins Mitochondrium beeinträchtigt.

Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, könnte eine MCL-1-Überexpression in SW982/NOXA<sup>KO</sup>-Zellen mit anschließender Bestimmung der zwei MCL-1-Formen im Western Blot durchgeführt werden. Es wäre zu erwarten, dass aufgrund der Überexpression MCL-1 bei niedriger ABT-199 Konzentration nicht vollständig von ABT-199 gebunden wird und weiterhin zum Teil ins Mitochondrium importiert werden kann. In diesem System fällt zusätzlich die Inhibition von MCL-1 durch *Knock-Out* von NOXA weg, sodass eine NOXA-Bindung als Grund für beeinträchtigten MCL-1 Import ausgeschlossen ist. Um den funktionellen Einfluss der in Mitochondrien importierten MCL-1<sub>s</sub> Variante zu untersuchen, könnte MCL-1 und eine MCL-1 Variante mit einer mutierten N-terminalen mitochondrialen Importsequenz in SW982/MCL-1<sup>KO</sup>-Zellen transgen zur Expression gebracht werden. Das letztere System besitzt dann nur noch die MCL-1<sub>L</sub>-Form, nicht aber MCL-1<sub>s</sub>, womit die Funktion von MCL-1<sub>s</sub>, die mitochondriale Struktur und Energieproduktion aufrecht zu erhalten und die Fusion zu regulieren, durch Vergleich mit dem MCL-1/WT-System analysiert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass ABT-199 den mitochondrialen Proteinimport stört, wie es an dem Beispiel der fehlenden prozessierten MCL-1<sub>s</sub>-Form im Mitochondrium bei Inkubation mit ABT-199 deutlich wird. Eine weitere Folge des gestörten Proteinimports von UE der Atmungskette bei Anwesenheit von ABT-199 ruft eine Dysbalance der ETC hervor, die zum veränderten mitochondrialen Metabolismus und in diesem Zuge zur Aktivierung der ISR mit gesteigerter ATF3- und ATF4-Induktion in dem SW982/WT-System führt.

## 7.1 Identifizierung prognostischer Marker für Therapieansprechen

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte auch in Zukunft ein Augenmerk daraufgelegt werden, mögliche Off-Target-Effekte von Therapeutika aufzudecken, um weitere involvierte zelluläre Signalwege bei Antwort auf ein Therapeutikum zu berücksichtigen. Dadurch können zusätzliche prognostische Marker für ein Therapieansprechen identifiziert werden. Die Kombination aus ABT-199 und BTZ ist ein vielversprechender Therapie-Ansatz, da der Zelltod unabhängig vom TP53-Status des Tumors in erster Linie durch eine BCL-2-Inhibition reguliert wird. Momentan werden Therapie-Optionen für einen kleinen Teil solider Tumore auch anhand ihrer sogenannten Treibermutationen, die durch Sequenzanalysen der Tumor-Biopsien identifiziert werden, ausgewählt. Häufig entwickelt sich jedoch durch die spezifisch auf die Treibermutationen zugeschnittenen Chemotherapeutika nach einiger Behandlungszeit eine Resistenz gegen das Therapeutikum. Bei der zielgerichteten Therapie von NSCLC mit EGFR-Mutation mittels Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) entstehen spontane Mutationen im EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), wie zum Beispiel die Mutation in der EGFR-Domäne T790M, wodurch der Tumor resistent gegenüber Erst- und Zweit-Generation TKIs wird (Sequist *et al.* 2011). Weiter entwickelte TKIs der dritten Generation sind an spezifische, häufig auftretende sekundäre Mutationen angepasst und wirken effizient. Aber auch die erfolgreiche Therapie mit TKIs der 3. Generation zieht weitere Mutationen und Resistenz nach sich. Auch kolorektale Karzinome weisen unter anderem eine EGFR/HER (*human epidermal growth factor receptor*)-Überexpression auf, daher werden auch hier Agentien wie anti-EGFR-monoklonale Antikörper oder TKIs zur Therapie eingesetzt (Xie *et al.* 2020). Der anti-EGFR-monoklonale Antikörper Cetuximab ist bei kolorektalen Karzinomen, die keine *KRAS* (*kirsten rat sarcoma virus*)-Mutation aufweisen, von klinischem Nutzen. Analog zu TKI-Resistenz in NSCLC entwickeln wildtypische *KRAS*-kolorektale Karzinome Mutationen in der extrazellulären Domäne des EGFR, die mit Cetuximab interferiert (Arteaga und Engelman 2014). In hepatozellulären Karzinomen spielen TKIs bei der Systemtherapie ebenso eine wichtige Rolle. Der TKI Sorafenib wurde 2007 für hepatozelluläre Karzinome als Erstlinientherapie zugelassen (Da Fonseca *et al.* 2020). Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität in hepatozellulären Karzinomen kommt es häufig zu primärem und sekundärem Therapieversagen bei Sorafenib (Cabral *et al.* 2020). Daher sind Kombinationstherapien, die alternative Signalwege angreifen, von Nutzen (Tang und Lu 2018). Das Konzept der Kombination von beispielsweise TKIs mit ABT-199 stellt ein allgemein aktives Prinzip eines tumoragnostischen Wirkmechanismus dar. Eine entsprechende Kombination mit ABT-199 könnte nicht nur in den hier analysierten Tumor-Zelllinien Anwendung finden, sondern auch in kolorektalen oder hepatozellulären Karzinomen. Dabei würde ABT-199 die Tumorzellen für die entsprechenden Zytostatika der Erstlinientherapie sensitivieren. Für diese Sensitivierung ist nicht nur die BCL-2-Inhibition ausschlaggebend, sondern zusätzlich wäre der *Off-Target*-Effekt

von ABT-199 ein großer Vorteil für die Therapie, da Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus unabhängig vom Signalweg der TKIs oder der BH3-Mimetika sind.

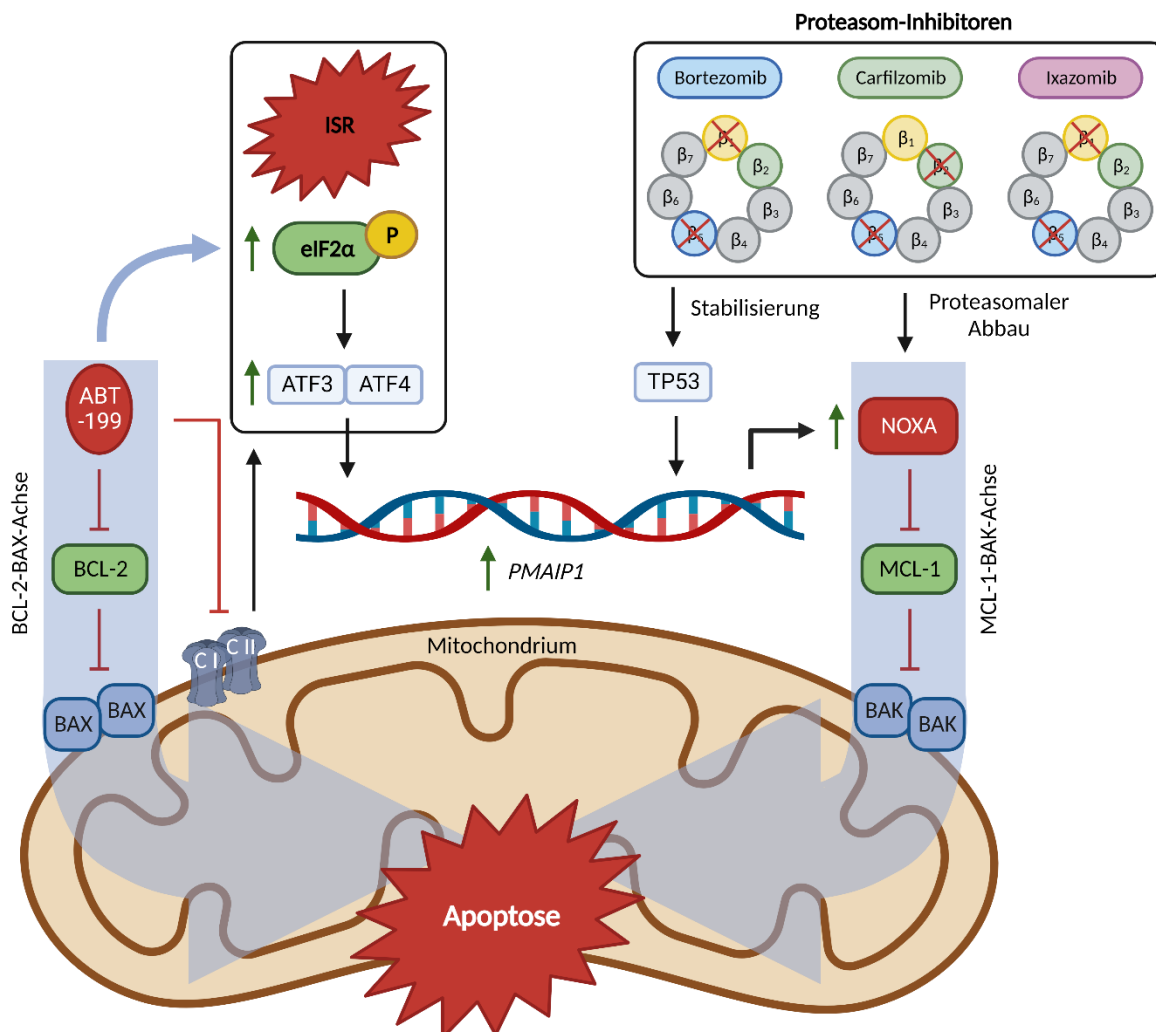
Die Identifizierung von prognostischen Markern für bestmögliche personalisierte Therapieansätze bleibt ein großes Ziel der translationalen Onkologie. Der hier mittels Spearman's-Korrelationsanalysen ermittelte prognostische Marker BCL-xL könnte als klinisch relevanter Marker dienen. Nicht nur die Kombination aus ABT-199&BTZ könnte ein Therapieansatz in der Klinik sein, sondern auch die Kombination mit BCL-xL-Antagonisten könnte ein therapeutisches Fenster schaffen. Es wird erwartet, dass dieses Molekül in der Abbildung als Biomarker und mögliches Zielmolekül zur Verbesserung der Zelltod-Induktion und der ABT-199-Sensitivität dienen könnte, um unter anderem ABT-199-Resistenz zu überwinden. BCL-xL scheint in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell, bei dem NOXA die anti-apoptische Funktion von MCL-1 neutralisiert und BCL-2 durch ABT-199 inhibiert wird, ausschlaggebend für die Apoptose-Sensitivität zu sein und könnte weiterhin für Resistenz gegen Inhibitoren für BCL-2 oder MCL-1 relevant sein. Zielführende Experimente sollten mit Tumorzelllinien mit hoher basaler BCL-xL-Expression durchgeführt werden und die ABT-199&BTZ-vermittelte Zelltod-Induktion im Vergleich zu einer Kombination aus ABT-199 und einem BCL-xL-Inhibitor untersucht werden.

Gegenwärtig ist nur ein unvollständiges Verständnis des therapeutischen Potentials von ABT-199&BTZ als Auslöser des Zelltods bekannt. Als Schlüssel zur weiteren Aufdeckung dieses Potentials wäre weiterhin wichtig, einen größeren Ansatz an charakterisierten Zelllinien für die Korrelationsanalyse zu verwenden. Idealerweise wäre eine Ausweitung auf Primärmaterial wünschenswert, um identifizierte ausschlaggebende BCL-2-Proteine aus Zelllinien-Daten für die Korrelation von Proteinexpression und ABT-199&BTZ-vermitteltem Zelltod zu bestätigen. Da sicherlich auch andere Stresssignalwege einen Einfluss auf die Wirkung von ABT-199&BTZ haben, sollte eine Ausdehnung auf weitere potentielle Gene/Proteine stattfinden. Differenzielle Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierungen von Zelllinien/Primärmaterial und die Verwendung von PDX-Modellen sollten für weitere Untersuchungen, welche Voraussetzungen für eine Korrelation der Proteinexpression und dem ABT-199&BTZ-vermittelten Zelltod gegeben sein müssen, in Betracht gezogen werden.

Zudem sollten klinische Studien von Patienten mit Sarkomen oder in größerem Maßstab von Patienten mit soliden Tumoren in Erwägung gezogen werden. Anhand der Genexpressionsanalyse der Probanden kann mit ABT-199 und dem identifizierten prognostischen Marker (bspw. einem spezifischen Inhibitor gegen BCL-2, BCL-xL oder MCL-1) individuell behandelt werden, sodass ein verbessertes Therapieansprechen erreicht werden kann.

## 8. Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zur Zelltod-Induktion und der abgeleitete molekulare Mechanismus einer Transaktivierung von NOXA sind in Abbildung 41 zusammengefasst und wurden erfolgreich publiziert (Weller *et al.* 2022). Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass der spezifische BCL-2-Inhibitor ABT-199 das BH3-*only* Protein NOXA durch Induktion der zwei Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 über die ISR transaktiviert. Des Weiteren belegen die Ergebnisse, dass NOXA in diesem System TP53-unabhängig reguliert wird. Zusätzlich zur BCL-2-Inhibition vermittelt ABT-199 die Transaktivierung von NOXA und antagonisiert hierdurch MCL-1. Somit besitzt ABT-199 einen doppelten Effekt i) durch die direkte Inhibition von BCL-2 und die daraus resultierende Aktivierung der BCL-2-BAX-Achse und ii) durch die Aktivierung der MCL-1-BAK-Achse mittels Transaktivierung von NOXA. Durch gleichzeitige Proteasom-Inhibition (über BTZ, CFZ oder IXZ) wird die NOXA-Degradierung reduziert und die durch ABT-199&PI-vermittelte Apoptose-Induktion verstärkt.



**Abbildung 41: Postulierter Mechanismus der durch ABT-199&PI-vermittelten synergistischen Zelltod-Induktion durch Transaktivierung von NOXA.** Neben der TP53-abhängigen Stabilisierung des BH3-*only* Proteins NOXA wird der proteasomale Abbau von

NOXA durch Proteasom-Inhibition (über BTZ, CFZ oder IXZ) verhindert. ABT-199 blockiert die anti-apoptotische Aktivität von BCL-2 und erlaubt BAX-Aktivierung. Zusätzlich wirkt ABT-199 auf die Atmungskette und reduziert die Aktivität der Komplexe I und II – dies resultiert in metabolischem *Reprogramming* (reduktiver Carboxylierung) mit einhergehender Aktivierung der ISR. Gesteigerte Expression an ATF4 und ATF3 vermittelt die Transaktivierung von *PMAIP1/NOXA*, welches die anti-apoptotische Aktivität von MCL-1 inhibiert und zur BAK-Aktivierung beiträgt. Die aktiven Effektorproteine BAX und BAK oligomerisieren in der äußeren Mitochondrienmembran, führen zur mitochondrialen Außenmembran-Permeabilisierung (MOMP) und leiten durch Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung der Caspasen die intrinsische Apoptose ein ((Weller *et al.* 2022), mit BioRender.com erstellt).

Tumore erwerben häufig Resistenz gegenüber Therapeutika durch die Akkumulation protektiver Mutationen mit Auswirkung auf *Downstream*-liegende Signalmoleküle oder auf parallel existierende Signalwege.

Des Weiteren entwickeln viele Tumore intrinsische BH3-Mimetika-Resistenz und steuern durch Überexpressionen anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2, MCL-1 oder BCL-xL einer effektiven Therapie entgegen (Wuillème-Toumi *et al.* 2005). Es ist von großer Wichtigkeit, dass eine Therapie möglichst viele Tumor-Entitäten (inter-individuell) bzw. die Heterogenität innerhalb individueller Tumoren anspricht. Diese Voraussetzung erfüllt die Kombination von ABT-199 mit PIs. Die hier demonstrierte synergistische Zelltod-Induktion von ABT-199&BTZ konnte sowohl in Zelllinien und Zellen aus verschiedenen Weichteil-Sarkomen (SW982, RD und SK-LMS) als auch in Zelllinien anderen Ursprungs wie Lungenkrebs (H1299/WT, H1299/*TP53*) (Abbildung 28) oder kolorektalem Krebs (HCT116/WT) (Abbildung 23) nachgewiesen werden (Weller *et al.* 2022).

Durch Medikamenten-Kombinationen aus ABT-199&PI könnten therapeutische Erfolge erzielt werden, die sowohl Zelltyp- als auch *TP53*-unabhängig sind. Des Weiteren könnte die Medikamenten-Kombination aus ABT-199&PI für Krebsarten, die nicht zielgerichtet therapierbar sind (Corless *et al.* 2002; Corless *et al.* 2005), auf der Grundlage relevanter Expressionsmarker angewandt werden. Der hier entdeckte Effekt der Transaktivierung von NOXA und des metabolischen *Reprogrammings* durch ABT-199 könnte sogar BCL-2 unabhängig verwendet werden, um solide Tumoren ohne BCL-2-Überexpression durch Aktivierung der ISR für andere Therapeutika empfindlich zu machen oder sogar autark zu wirken.

Der hier postulierte synergistische Mechanismus zeigt, dass „*Off-Target*“-Effekte auch als Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden könnten. Häufig werden vielversprechende Medikamenten-Kombinationen aus der Forschung in klinischen Studien wieder verworfen, da die Kriterien zur Auswahl der Probanden (beispielsweise Genexpressionsanalysen der Tumore oder Treibermutationen) eine unzureichende Determinante für die effiziente Wirkung

getesteter Therapeutika sind. In der Regel werden jedoch alternative Wirkmechanismen/*Off-Target*-Effekte der Therapeutika nicht in Betracht gezogen. Klinisch relevante Marker, die eine Vorhersage für eine bestimmte Therapie zulassen, sind von enormem Interesse, unter anderem, um ineffiziente, gegebenenfalls kostenintensive Therapien, die möglicherweise die Lebensqualität herabsetzen, auszuschließen. Als prognostischer Marker für die Kombination ABT-199&BTZ ist BCL-xL relevant - inwieweit BCL-2 oder MCL-1 auch prognostische Marker und damit interessant für Therapien mit BCL-xL-Inhibitoren sind, muss im Rahmen zukünftiger Arbeiten beantwortet werden.

## 9. Literatur

### Literaturverzeichnis

Adams, J.; Palombella, V. J.; Sausville, E. A.; Johnson, J.; Destree, A.; Lazarus, D. D. *et al.* (1999): Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. In: *Cancer research* 59 (11), S. 2615–2622.

Algarín, Esperanza M.; Díaz-Tejedor, Andrea; Mogollón, Pedro; Hernández-García, Susana; Corchete, Luis A.; San-Segundo, Laura *et al.* (2020): Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. In: *Haematologica* 105 (3), e116-e120. DOI: 10.3324/haematol.2018.212308.

Amankwah, Ernest K.; Conley, Anthony P.; Reed, Damon R. (2013): Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. In: *Clinical epidemiology* 5, S. 147–162. DOI: 10.2147/CLEP.S28390.

Arai, Seiji; Varkaris, Andreas; Nouri, Mannan; Chen, Sen; Xie, Lisha; Balk, Steven P. (2020): MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.54954.

Arteaga, Carlos L.; Engelman, Jeffrey A. (2014): ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. In: *Cancer cell* 25 (3), S. 282–303. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.025.

Ashcroft, M.; Vousden, K. H. (1999): Regulation of p53 stability. In: *Oncogene* 18 (53), S. 7637–7643. DOI: 10.1038/sj.onc.1203012.

Attia, S.; Mahoney, M. R.; Okuno, S. H.; Adkins, D.; Ahuja, H. G.; Ducker, T. P. *et al.* (2011): A phase II consortium trial of vorinostat and bortezomib for advanced soft tissue sarcomas. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (15\_suppl), S. 10075. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15\_suppl.10075.

Aubrey, Brandon J.; Strasser, Andreas; Kelly, Gemma L. (2016): Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a026062.

Bajpai, Richa; Sharma, Aditi; Achreja, Abhinav; Edgar, Claudia L.; Wei, Changyong; Siddiq, Arusha A. *et al.* (2020): Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1228. DOI: 10.1038/s41467-020-15051-z.

Bao, Q.; Shi, Y. (2007): Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. In: *Cell death and differentiation* 14 (1), S. 56–65. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402028.

- Baou, Maria; Kohlhaas, Susan L.; Butterworth, Michael; Vogler, Meike; Dinsdale, David; Walewska, Renata *et al.* (2010): Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. In: *Haematologica* 95 (9), S. 1510–1518. DOI: 10.3324/haematol.2010.022368.
- Barrott, Jared J.; Zhu, Ju-Fen; Smith-Fry, Kyllie; Susko, Asia M.; Nollner, Dakota; Burrell, Lance D. *et al.* (2017): The Influential Role of BCL2 Family Members in Synovial Sarcomagenesis. In: *Molecular cancer research : MCR* 15 (12), S. 1733–1740. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0315.
- Bate-Eya, Laurel T.; Hartog, Ilona J. M. den; van der Ploeg, Ida; Schild, Linda; Koster, Jan; Santo, Evan E. *et al.* (2016): High efficacy of the BCL-2 inhibitor ABT199 (venetoclax) in BCL-2 high-expressing neuroblastoma cell lines and xenografts and rational for combination with MCL-1 inhibition. In: *Oncotarget* 7 (19), S. 27946–27958. DOI: 10.18632/oncotarget.8547.
- Berthelet, Jean; Dubrez, Laurence (2013): Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). In: *Cells* 2 (1), S. 163–187. DOI: 10.3390/cells2010163.
- Besse, Andrej; Besse, Lenka; Kraus, Marianne; Mendez-Lopez, Max; Bader, Jürgen; Xin, Bo-Tao *et al.* (2019): Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma: Head-to-Head Comparison of Currently Available Proteasome Inhibitors. In: *Cell chemical biology* 26 (3), 340-351.e3. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.11.007.
- Bodo, Juraj; Zhao, Xiaoxian; Durkin, Lisa; Souers, Andrew J.; Phillips, Darren C.; Smith, Mitchell R.; Hsi, Eric D. (2016): Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. In: *Oncotarget* 7 (43), S. 70000–70010. DOI: 10.18632/oncotarget.12132.
- Buchholz, Thomas A.; Stivers, David N.; Stec, James; Ayers, Mark; Clark, Edward; Bolt, Andrew *et al.* (2002): Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 8 (6), S. 461–468. DOI: 10.1097/00130404-200211000-00010.
- Cabral, Loraine Kay D.; Tiribelli, Claudio; Sukowati, Caecilia H. C. (2020): Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma: The Relevance of Genetic Heterogeneity. In: *Cancers* 12 (6). DOI: 10.3390/cancers12061576.
- Caenepeel, Sean; Karen, Rex; Belmontes, Brian; Verlinsky, Alla; Tan, Hong; Yang, Yajing *et al.* (2020): Abstract 6218: Discovery and preclinical evaluation of AMG 397, a potent, selective and orally bioavailable MCL1 inhibitor. In: *Cancer research* 80 (16\_Supplement), S. 6218. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-6218.



- Carpio, Marcos A.; Means, Robert E.; Brill, Allison L.; Sainz, Alva; Ehrlich, Barbara E.; Katz, Samuel G. (2021): BOK controls apoptosis by Ca<sup>2+</sup> transfer through ER-mitochondrial contact sites. In: *Cell reports* 34 (10), S. 108827. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108827.
- Casali, P. G.; Abecassis, N.; Aro, H. T.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bielack, S. *et al.* (2018): Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (Suppl 4), iv268-iv269. DOI: 10.1093/annonc/mdy321.
- Chang, David W.; Xing, Zheng; Capacio, Vanessa L.; Peter, Marcus E.; Yang, Xiaolu (2003): Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. In: *The EMBO journal* 22 (16), S. 4132–4142. DOI: 10.1093/emboj/cdg414.
- Chen, D.; Frezza, M.; Schmitt, S.; Kanwar, J.; Dou, Q. P. (2011): Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. In: *Current cancer drug targets* 11 (3), S. 239–253. DOI: 10.2174/156800911794519752.
- Chen, Lin; Willis, Simon N.; Wei, Andrew; Smith, Brian J.; Fletcher, Jamie I.; Hinds, Mark G. *et al.* (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. In: *Molecular cell* 17 (3), S. 393–403. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.12.030.
- Chinnaiyan, A. M. (1999): The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 1 (1), S. 5–15. DOI: 10.1038/sj.neo.7900003.
- Choudhary, G. S.; Al-Harbi, S.; Mazumder, S.; Hill, B. T.; Smith, M. R.; Bodo, J. *et al.* (2015): MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. In: *Cell death & disease* 6, e1593. DOI: 10.1038/cddis.2014.525.
- Clemens, Jannick; Welti, Lukas; Schäfer, Julia; Seckinger, Anja; Burhenne, Jürgen; Theile, Dirk; Weiss, Johanna (2017): Bortezomib, carfilzomib and ixazomib do not mediate relevant transporter-based drug-drug interactions. In: *Oncology letters* 14 (3), S. 3185–3192. DOI: 10.3892/ol.2017.6560.
- Corless, Christopher L.; McGreevey, Laura; Haley, Andrea; Town, Aja; Heinrich, Michael C. (2002): KIT Mutations Are Common in Incidental Gastrointestinal Stromal Tumors One Centimeter or Less in Size. In: *The American Journal of Pathology* 160 (5), S. 1567–1572. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61103-0.
- Corless, Christopher L.; Schroeder, Arin; Griffith, Diana; Town, Aja; McGreevey, Laura; Harrell, Patina *et al.* (2005): PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. In: *Journal of clinical oncology : official journal of*

*the American Society of Clinical Oncology* 23 (23), S. 5357–5364. DOI: 10.1200/JCO.2005.14.068.

Cosentino, Katia; Hertlein, Vanessa; Jenner, Andreas; Dellmann, Timo; Gojkovic, Milos; Peña-Blanco, Aida *et al.* (2022): The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. In: *Molecular cell* 82 (5), 933-949.e9. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.01.008.

Costa-Mattioli, Mauro; Walter, Peter (2020): The integrated stress response: From mechanism to disease. In: *Science (New York, N. Y.)* 368 (6489). DOI: 10.1126/science.aat5314.

Crook, N. E.; Clem, R. J.; Miller, L. K. (1993): An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. In: *Journal of virology* 67 (4), S. 2168–2174. DOI: 10.1128/JVI.67.4.2168-2174.1993.

Czabotar, Peter E.; Lessene, Guillaume; Strasser, Andreas; Adams, Jerry M. (2014): Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (1), S. 49–63. DOI: 10.1038/nrm3722.

Da Fonseca, Leonardo G.; Reig, Maria; Bruix, Jordi (2020): Tyrosine Kinase Inhibitors and Hepatocellular Carcinoma. In: *Clinics in liver disease* 24 (4), S. 719–737. DOI: 10.1016/j.cld.2020.07.012.

Dauids, Matthew S.; Letai, Anthony (2013): ABT-199: taking dead aim at BCL-2. In: *Cancer cell* 23 (2), S. 139–141. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.018.

Demetri, G. D.; Elias, A. D. (1995): Results of single-agent and combination chemotherapy for advanced soft tissue sarcomas. Implications for decision making in the clinic. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 9 (4), S. 765–785.

Demetri, George D.; Chawla, Sant P.; Mehren, Margaret von; Ritch, Paul; Baker, Laurence H.; Blay, Jean Y. *et al.* (2009): Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (25), S. 4188–4196. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.0088.

Demicco, Elizabeth G.; Maki, Robert G.; Lev, Dina C.; Lazar, Alexander J. (2012): New therapeutic targets in soft tissue sarcoma. In: *Advances in anatomic pathology* 19 (3), S. 170–180. DOI: 10.1097/PAP.0b013e318253462f.

Dent, Paul; Curiel, David T.; Fisher, Paul B.; Grant, Steven (2009): Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: mechanisms for improved cancer therapy. In: *Drug resistance*

*updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 12 (3), S. 65–73. DOI: 10.1016/j.drug.2009.03.001.

Dey, Souvik; Baird, Thomas D.; Zhou, Donghui; Palam, Lakshmi Reddy; Spandau, Dan F.; Wek, Ronald C. (2010): Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (43), S. 33165–33174. DOI: 10.1074/jbc.M110.167213.

Diaz-Flores, Ernesto; Comeaux, Evan Q.; Kim, Kailyn L.; Melnik, Ella; Beckman, Kyle; Davis, Kara L. *et al.* (2019): Bcl-2 Is a Therapeutic Target for Hypodiploid B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. In: *Cancer research* 79 (9), S. 2339–2351. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0236.

DiNardo, Courtney D.; Jonas, Brian A.; Pullarkat, Vinod; Thirman, Michael J.; Garcia, Jacqueline S.; Wei, Andrew H. *et al.* (2020): Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 383 (7), S. 617–629. DOI: 10.1056/NEJMoa2012971.

DiNardo, Courtney D.; Pratz, Keith; Pullarkat, Vinod; Jonas, Brian A.; Arellano, Martha; Becker, Pamela S. *et al.* (2019): Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. In: *Blood* 133 (1), S. 7–17. DOI: 10.1182/blood-2018-08-868752.

Djajawi, Tirta Mario; Liu, Lei; Gong, Jia-Nan; Huang, Allan Shuai; Luo, Ming-Jie; Xu, Zhen *et al.* (2020): MARCH5 requires MTCH2 to coordinate proteasomal turnover of the MCL1:NOXA complex. In: *Cell death and differentiation* 27 (8), S. 2484–2499. DOI: 10.1038/s41418-020-0517-0.

Donehower, L. A.; Harvey, M.; Slagle, B. L.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A.; Butel, J. S.; Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. In: *Nature* 356 (6366), S. 215–221. DOI: 10.1038/356215a0.

Dumont, S. N.; Yang, D.; Dumont, A. G.; Reynoso, D.; Blay, J-Y; Trent, J. C. (2014): Targeted polytherapy in small cell sarcoma and its association with doxorubicin. In: *Molecular oncology* 8 (8), S. 1458–1468. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.05.016.

Dutta, Sanjib; Gullá, Stefano; Chen, T. Scott; Fire, Emiko; Grant, Robert A.; Keating, Amy E. (2010): Determinants of BH3 binding specificity for Mcl-1 versus Bcl-xL. In: *Journal of molecular biology* 398 (5), S. 747–762. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.03.058.

Einsele-Scholz, Stephanie; Malmshaimer, Silke; Bertram, Katrin; Stehle, Daniel; Johanning, Janina; Manz, Marianne *et al.* (2016): Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers

- apoptosis in the absence of Bax and Bak. In: *Journal of cell science* 129 (15), S. 3054. DOI: 10.1242/jcs.193946.
- Eischen, C. M.; Weber, J. D.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Cleveland, J. L. (1999): Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. In: *Genes & development* 13 (20), S. 2658–2669. DOI: 10.1101/gad.13.20.2658.
- Eliyahu, D.; Raz, A.; Gruss, P.; Givol, D.; Oren, M. (1984): Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. In: *Nature* 312 (5995), S. 646–649. DOI: 10.1038/312646a0.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- European Union (2023): EMA. Online verfügbar unter [https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/institutions-and-bodies/institutions-and-bodies-profiles/ema\\_de](https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/institutions-and-bodies/institutions-and-bodies-profiles/ema_de), zuletzt aktualisiert am 02.01.2023, zuletzt geprüft am 02.01.2023.
- Fairchild, Carter Kent; Floros, Konstantinos; Jacob, Sheeba; Coon, Colin; Puchalapalli, Madhavi; Hu, Bin *et al.* (2020): Evaluation of combined BCL-2/MCL-1 inhibition as a therapeutic approach for synovial sarcoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 38 (15\_suppl), e23561-e23561. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.e23561.
- Fendt, Sarah-Maria; Bell, Eric L.; Keibler, Mark A.; Olenchock, Benjamin A.; Mayers, Jared R.; Wasylenko, Thomas M. *et al.* (2013): Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells. In: *Nature communications* 4, S. 2236. DOI: 10.1038/ncomms3236.
- Fennell, D. A.; Chacko, A.; Mutti, L. (2008): BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. In: *Oncogene* 27 (9), S. 1189–1197. DOI: 10.1038/sj.onc.1210744.
- Fidyt, Klaudyna; Pastorczak, Agata; Cyran, Julia; Crump, Nicholas T.; Goral, Agnieszka; Madzio, Joanna *et al.* (2022): Potent, p53-independent induction of NOXA sensitizes MLL-rearranged B-cell acute lymphoblastic leukemia cells to venetoclax. In: *Oncogene* 41 (11), S. 1600–1609. DOI: 10.1038/s41388-022-02196-y.
- Fischer, U.; Stroh, C.; Schulze-Osthoff, K. (2006): Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. In: *Oncogene* 25 (1), S. 152–159. DOI: 10.1038/sj.onc.1209015.
- Fletcher, Jamie I.; Meusburger, Sarina; Hawkins, Christine J.; Riglar, David T.; Lee, Erinna F.; Fairlie, W. Douglas *et al.* (2008): Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot

restrain Bax. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47), S. 18081–18087. DOI: 10.1073/pnas.0808691105.

Galluzzi, L.; Maiuri, M. C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. (2007): Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. In: *Cell death and differentiation* 14 (7), S. 1237–1243. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402148.

Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V. *et al.* (2012): Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. In: *Cell death and differentiation* 19 (1), S. 107–120. DOI: 10.1038/cdd.2011.96.

Gharavi, Robert; Hassan, Hazem E. (2018): Genomics and Drug Transporters and Application in Drug Discovery, Delivery, and Development. In: Yashwant Pathak (Hg.): *Genomics-Driven Healthcare*. Singapore: Springer Singapore, S. 133–175.

Gomez-Bougie, Patricia; Wuillème-Toumi, Soraya; Ménoret, Emmanuelle; Trichet, Valérie; Robillard, Nelly; Philippe, Moreau *et al.* (2007): Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. In: *Cancer research* 67 (11), S. 5418–5424. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4322.

Gores, Gregory J.; Kaufmann, Scott H. (2012): Selectively targeting Mcl-1 for the treatment of acute myelogenous leukemia and solid tumors. In: *Genes & development* 26 (4), S. 305–311. DOI: 10.1101/gad.186189.111.

Gravestain, L. A.; Borst, J. (1998): Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. In: *Seminars in immunology* 10 (6), S. 423–434. DOI: 10.1006/smim.1998.0144.

Green, Douglas R.; Llambi, Fabien (2015): Cell Death Signaling. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a006080.

Guan, Bo-Jhih; Krokowski, Dawid; Majumder, Mithu; Schmotzer, Christine L.; Kimball, Scot R.; Merrick, William C. *et al.* (2014): Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . In: *The Journal of biological chemistry* 289 (18), S. 12593–12611. DOI: 10.1074/jbc.M113.543215.

Guikema, Jeroen E.; Amiot, Martine; Eldering, Eric (2017): Exploiting the pro-apoptotic function of NOXA as a therapeutic modality in cancer. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 21 (8), S. 767–779. DOI: 10.1080/14728222.2017.1349754.

Guy, Jean-Baptiste; Espenel, Sophie; Louati, Safa; Gauthier, Arnaud; Garcia, Max-Adrien; Vial, Nicolas *et al.* (2021): Combining radiation to EGFR and Bcl-2 blockade: a new approach

- to target cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 147 (7), S. 1905–1916. DOI: 10.1007/s00432-021-03593-8.
- Han, Bo; Yao, Weilong; Oh, You-Take; Tong, Jing-Shan; Li, Shaohua; Deng, Jiusheng *et al.* (2015): The novel proteasome inhibitor carfilzomib activates and enhances extrinsic apoptosis involving stabilization of death receptor 5. In: *Oncotarget* 6 (19), S. 17532–17542. DOI: 10.18632/oncotarget.3947.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harvey, M.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A.; Butel, J. S.; Bradley, A.; Donehower, L. A. (1993): Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. In: *Nature genetics* 5 (3), S. 225–229. DOI: 10.1038/ng1193-225.
- Haschka, Manuel D.; Karbon, Gerlinde; Soratroi, Claudia; O'Neill, Katelyn L.; Luo, Xu; Villunger, Andreas (2020): MARCH5-dependent degradation of MCL1/NOXA complexes defines susceptibility to antimetabolic drug treatment. In: *Cell death and differentiation* 27 (8), S. 2297–2312. DOI: 10.1038/s41418-020-0503-6.
- Hehlgans, Thomas; Pfeffer, Klaus (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. In: *Immunology* 115 (1), S. 1–20. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- Herrmann, Johannes M.; Longen, Sebastian; Weckbecker, Daniel; Depuydt, Matthieu (2012): Biogenesis of mitochondrial proteins. In: *Advances in experimental medicine and biology* 748, S. 41–64. DOI: 10.1007/978-1-4614-3573-0\_3.
- Hijikata, M.; Kato, N.; Sato, T.; Kagami, Y.; Shimotohno, K. (1990): Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line. In: *Journal of virology* 64 (10), S. 4632–4639. DOI: 10.1128/JVI.64.10.4632-4639.1990.
- Hilmer, Sarah N.; Cogger, Victoria C.; Muller, Michael; Le Couteur, David G. (2004): The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32 (8), S. 794–799. DOI: 10.1124/dmd.32.8.794.
- Hirakawa, Naoya; Naka, Takahiko; Yamamoto, Ichiro; Fukuda, Toshiro; Tsuneyoshi, Masazumi (1996): Overexpression of bcl-2 protein in synovial sarcoma: A comparative study of other soft tissue spindle cell sarcomas and an additional analysis by fluorescence in situ hybridization. In: *Human Pathology* 27 (10), S. 1060–1065. DOI: 10.1016/s0046-8177(96)90284-1.

- Hoang, Ngoc T.; Acevedo, Luis A.; Mann, Michael J.; Tolani, Bhairavi (2018): A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. In: *Cancer management and research* 10, S. 1089–1114. DOI: 10.2147/CMAR.S159641.
- Hsu, S. Y.; Kaipia, A.; McGee, E.; Lomeli, M.; Hsueh, A. J. (1997): Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (23), S. 12401–12406. DOI: 10.1073/pnas.94.23.12401.
- Huang, Kai; O'Neill, Katelyn L.; Li, Jian; Zhou, Wei; Han, Na; Pang, Xiaming *et al.* (2019): BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. In: *Cell research* 29 (11), S. 942–952. DOI: 10.1038/s41422-019-0231-y.
- In, Gino K.; Hu, James S.; Tseng, William W. (2017): Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations. In: *Therapeutic advances in medical oncology* 9 (8), S. 533–550. DOI: 10.1177/1758834017712963.
- Jänicke, R. U.; Sprengart, M. L.; Wati, M. R.; Porter, A. G. (1998): Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (16), S. 9357–9360. DOI: 10.1074/jbc.273.16.9357.
- Jin, Sha; Cojocari, Dan; Purkal, Julie J.; Popovic, Relja; Talaty, Nari N.; Xiao, Yu *et al.* (2020): 5-Azacytidine Induces NOXA to Prime AML Cells for Venetoclax-Mediated Apoptosis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 26 (13), S. 3371–3383. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1900.
- Jousse, Céline; Oyadomari, Seiichi; Novoa, Isabel; Lu, Phoebe; Zhang, Yuhong; Harding, Heather P.; Ron, David (2003): Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. In: *The Journal of cell biology* 163 (4), S. 767–775. DOI: 10.1083/jcb.200308075.
- Kaufmann, Scott H.; Karp, Judith E.; Svingen, Phyllis A.; Krajewski, Stan; Burke, Philip J.; Gore, Steven D.; Reed, John C. (1998): Elevated Expression of the Apoptotic Regulator Mcl-1 at the Time of Leukemic Relapse. In: *Blood* 91 (3), S. 991–1000. DOI: 10.1182/blood.V91.3.991.
- Kawai, A.; Woodruff, J.; Healey, J. H.; Brennan, M. F.; Antonescu, C. R.; Ladanyi, M. (1998): SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. In: *The New England journal of medicine* 338 (3), S. 153–160. DOI: 10.1056/NEJM199801153380303.

- Kelly, Gemma L.; Strasser, Andreas (2011): The essential role of evasion from cell death in cancer. In: *Advances in cancer research* 111, S. 39–96. DOI: 10.1016/B978-0-12-385524-4.00002-7.
- Kim, Jee-Youn; Ahn, Hyun-Jong; Ryu, Jong-Hoon; Suk, Kyoungho; Park, Jae-Hoon (2004): BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (1), S. 113–124. DOI: 10.1084/jem.20030613.
- Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: *The EMBO journal* 14 (22), S. 5579–5588. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x.
- Kleih, Markus; Böpple, Kathrin; Dong, Meng; Gaißler, Andrea; Heine, Simon; Olayioye, Monilola A. *et al.* (2019): Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. In: *Cell death & disease* 10 (11), S. 851. DOI: 10.1038/s41419-019-2081-4.
- Konopleva, Marina; Pollyea, Daniel A.; Potluri, Jalaja; Chyla, Brenda; Hogdal, Leah; Busman, Todd *et al.* (2016): Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. In: *Cancer discovery* 6 (10), S. 1106–1117. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0313.
- Kotschy, András; Szlavik, Zoltán; Murray, James; Davidson, James; Maragno, Ana Leticia; Le Toumelin-Braizat, Gaëtane *et al.* (2016): The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. In: *Nature* 538 (7626), S. 477–482. DOI: 10.1038/nature19830.
- Krebs - Das ZfKD (2023). Online verfügbar unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd\\_node.html;jsessionid=26492AF258D4B2443067E0D1AA621566.internet122](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd_node.html;jsessionid=26492AF258D4B2443067E0D1AA621566.internet122), zuletzt aktualisiert am 02.01.2023, zuletzt geprüft am 02.01.2023.
- Kumar, Shaji K.; Harrison, Simon J.; Cavo, Michele; La Rubia, Javier de; Popat, Rakesh; Gasparetto, Cristina *et al.* (2020): Venetoclax or placebo in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (BELLINI): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 21 (12), S. 1630–1642. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30525-8.
- Lakin, N. D.; Jackson, S. P. (1999): Regulation of p53 in response to DNA damage. In: *Oncogene* 18 (53), S. 7644–7655. DOI: 10.1038/sj.onc.1203015.



- Lamothe, Betty; Wierda, William G.; Keating, Michael J.; Gandhi, Varsha (2016): Carfilzomib Triggers Cell Death in Chronic Lymphocytic Leukemia by Inducing Proapoptotic and Endoplasmic Reticulum Stress Responses. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (18), S. 4712–4726. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2522.
- Lane, D. P.; Crawford, L. V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. In: *Nature* 278 (5701), S. 261–263. DOI: 10.1038/278261a0.
- Leber, Brian; Lin, Jialing; Andrews, David W. (2007): Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12 (5), S. 897–911. DOI: 10.1007/s10495-007-0746-4.
- Lecker, Stewart H.; Goldberg, Alfred L.; Mitch, William E. (2006): Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17 (7), S. 1807–1819. DOI: 10.1681/ASN.2006010083.
- Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. (2007): Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. In: *Cell death and differentiation* 14 (9), S. 1711–1713. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402178.
- Lee, Jong Bok; Khan, Dilshad H.; Hurren, Rose; Xu, Mingjing; Na, Yoosu; Kang, Hyeonjeong *et al.* (2021): Venetoclax enhances T cell-mediated antileukemic activity by increasing ROS production. In: *Blood* 138 (3), S. 234–245. DOI: 10.1182/blood.2020009081.
- Leverson, J. D.; Zhang, H.; Chen, J.; Tahir, S. K.; Phillips, D. C.; Xue, J. *et al.* (2015): Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). In: *Cell death & disease* 6, e1590. DOI: 10.1038/cddis.2014.561.
- Li, Honglin; Zhu, Hong; Xu, Chi-jie; Yuan, Junying (1998): Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. In: *Cell* 94 (4), S. 491–501. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81590-1.
- Llambi, Fabien; Wang, Yue-Ming; Victor, Bernadette; Yang, Mao; Schneider, Desiree M.; Gingras, Sébastien *et al.* (2016): BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. In: *Cell* 165 (2), S. 421–433. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.026.
- Locksley, Richard M.; Killeen, Nigel; Lenardo, Michael J. (2001): The TNF and TNF Receptor Superfamilies. In: *Cell* 104 (4), S. 487–501. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9.

- López-Pousa, A.; Martín Broto, J.; Martínez Trufero, J.; Sevilla, I.; Valverde, C.; Álvarez, R. *et al.* (2016): SEOM Clinical Guideline of management of soft-tissue sarcoma (2016). In: *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 18 (12), S. 1213–1220. DOI: 10.1007/s12094-016-1574-1.
- Lucendo, Estefanía; Sancho, Mónica; Lolicato, Fabio; Javanainen, Matti; Kulig, Waldemar; Leiva, Diego *et al.* (2020): Mcl-1 and Bok transmembrane domains: Unexpected players in the modulation of apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (45), S. 27980–27988. DOI: 10.1073/pnas.2008885117.
- Maier, Klaus; Hofmann, Ute; Reuss, Matthias; Mauch, Klaus (2008): Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient <sup>13</sup>C-labeling experiments: Part II. Flux estimation. In: *Biotechnology and bioengineering* 100 (2), S. 355–370. DOI: 10.1002/bit.21746.
- Maki, Robert G.; Kraft, Andrew S.; Scheu, Kelly; Yamada, Jennifer; Wadler, Scott; Antonescu, Cristina R. *et al.* (2005): A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. In: *Cancer* 103 (7), S. 1431–1438. DOI: 10.1002/cncr.20968.
- Manasanch, Elisabet E.; Orłowski, Robert Z. (2017): Proteasome inhibitors in cancer therapy. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 14 (7), S. 417–433. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.206.
- Marine, J-C; Lozano, G. (2010): Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. In: *Cell death and differentiation* 17 (1), S. 93–102. DOI: 10.1038/cdd.2009.68.
- Moldoveanu, Tudor; Zheng, Janet H. (2018): Metastability, an emerging concept governing BOK-mediated apoptosis initiation. In: *Oncotarget* 9 (57), S. 30944–30945. DOI: 10.18632/oncotarget.25801.
- Moreau, Philippe; Chanan-Khan, Asher; Roberts, Andrew W.; Agarwal, Amit B.; Facon, Thierry; Kumar, Shaji *et al.* (2017): Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. In: *Blood* 130 (22), S. 2392–2400. DOI: 10.1182/blood-2017-06-788323.
- Muenchow, Alina; Weller, Sandra; Hinterleitner, Clemens; Malenke, Elke; Bugl, Stefanie; Wirths, Stefan *et al.* (2020): The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. In: *Cell death & disease* 11 (8), S. 701. DOI: 10.1038/s41419-020-02910-2.
- Murphy, Michael P. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. In: *The Biochemical journal* 417 (1), S. 1–13. DOI: 10.1042/BJ20081386.

- Nakajima, W.; Hicks, M. A.; Tanaka, N.; Krystal, G. W.; Harada, H. (2014): Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. In: *Cell death & disease* 5, e1052. DOI: 10.1038/cddis.2014.6.
- Nakajima, Wataru; Tanaka, Nobuyuki (2016): BH3 mimetics: Their action and efficacy in cancer chemotherapy. In: *Integr Cancer Sci Therap* 3 (3), S. 437–441. DOI: 10.15761/ICST.1000184.
- Novoa, I.; Zeng, H.; Harding, H. P.; Ron, D. (2001): Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. In: *The Journal of cell biology* 153 (5), S. 1011–1022. DOI: 10.1083/jcb.153.5.1011.
- Núñez-Vázquez, Sonia; Sánchez-Vera, Ismael; Saura-Esteller, José; Cosialls, Ana M.; Noisier, Anaïs F. M.; Albericio, Fernando *et al.* (2021): NOXA upregulation by the prohibitin-binding compound fluorizoline is transcriptionally regulated by integrated stress response-induced ATF3 and ATF4. In: *The FEBS journal* 288 (4), S. 1271–1285. DOI: 10.1111/febs.15480.
- Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T. *et al.* (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. In: *Science (New York, N. Y.)* 288 (5468), S. 1053–1058. DOI: 10.1126/science.288.5468.1053.
- Orlowski, M.; Michaud, C. (1989): Pituitary multicatalytic proteinase complex. Specificity of components and aspects of proteolytic activity. In: *Biochemistry* 28 (24), S. 9270–9278. DOI: 10.1021/bi00450a006.
- Pakos-Zebrucka, Karolina; Koryga, Izabela; Mnich, Katarzyna; Lujic, Mila; Samali, Afshin; Gorman, Adrienne M. (2016): The integrated stress response. In: *EMBO reports* 17 (10), S. 1374–1395. DOI: 10.15252/embr.201642195.
- Palam, L. R.; Gore, J.; Craven, K. E.; Wilson, J. L.; Korc, M. (2015): Integrated stress response is critical for gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Cell death & disease* 6, e1913. DOI: 10.1038/cddis.2015.264.
- Pandey, Manoj K.; Gowda, Krishne; Doi, Kenichiro; Sharma, Arun K.; Wang, Hong-Gang; Amin, Shantu (2013): Proteasomal degradation of Mcl-1 by maritoclax induces apoptosis and enhances the efficacy of ABT-737 in melanoma cells. In: *PloS one* 8 (11), e78570. DOI: 10.1371/journal.pone.0078570.
- Pang, Xiaming; Zhang, Jingjing; Lopez, Hernando; Wang, Yushu; Li, Wenyang; O'Neill, Katelyn L. *et al.* (2014): The carboxyl-terminal tail of Noxa protein regulates the stability of Noxa and Mcl-1. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (25), S. 17802–17811. DOI: 10.1074/jbc.M114.548172.

- Perciavalle, Rhonda M.; Stewart, Daniel P.; Koss, Brian; Lynch, John; Milasta, Sandra; Bathina, Madhavi *et al.* (2012): Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. In: *Nature cell biology* 14 (6), S. 575–583. DOI: 10.1038/ncb2488.
- Pérez-Galán, Patricia; Roué, Gaël; Villamor, Neus; Montserrat, Emili; Campo, Elias; Colomer, Dolors (2006): The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. In: *Blood* 107 (1), S. 257–264. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2091.
- Pickart, Cecile M.; Eddins, Michael J. (2004): Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. In: *Biochimica et biophysica acta* 1695 (1-3), S. 55–72. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
- Pistritto, Giuseppa; Trisciuglio, Daniela; Ceci, Claudia; Garufi, Alessia; D'Orazi, Gabriella (2016): Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. In: *Aging* 8 (4), S. 603–619. DOI: 10.18632/aging.100934.
- Ploner, C.; Kofler, R.; Villunger, A. (2008): Noxa: at the tip of the balance between life and death. In: *Oncogene* 27 Suppl 1, S84-92. DOI: 10.1038/onc.2009.46.
- Qin, Jian-Zhong; Xin, Hong; Sitailo, Leonid A.; Denning, Mitchell F.; Nickoloff, Brian J. (2006): Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. In: *Cancer research* 66 (19), S. 9636–9645. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0747.
- Rabouw, Huib H.; Langereis, Martijn A.; Anand, Aditya A.; Visser, Linda J.; Groot, Raoul J. de; Walter, Peter; van Kuppeveld, Frank J. M. (2019): Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (6), S. 2097–2102. DOI: 10.1073/pnas.1815767116.
- Reed, John C.; Doctor, Kutbuddin S.; Godzik, Adam (2004): The domains of apoptosis: a genomics perspective. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004 (239), re9. DOI: 10.1126/stke.2392004re9.
- Richardson, Paul G.; Hideshima, Teru; Anderson, Kenneth C. (2003): Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. In: *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 10 (5), S. 361–369. DOI: 10.1177/107327480301000502.
- Riley, Todd; Sontag, Eduardo; Chen, Patricia; Levine, Arnold (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (5), S. 402–412. DOI: 10.1038/nrm2395.

- Robak, Tadeusz; Huang, Huiqiang; Jin, Jie; Zhu, Jun; Liu, Ting; Samoilova, Olga *et al.* (2015): Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 372 (10), S. 944–953. DOI: 10.1056/NEJMoa1412096.
- Roberts, A. W.; Huang, Dcs (2017): Targeting BCL2 With BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 101 (1), S. 89–98. DOI: 10.1002/cpt.553.
- Roberts, Andrew W.; Davids, Matthew S.; Pagel, John M.; Kahl, Brad S.; Puvvada, Soham D.; Gerecitano, John F. *et al.* (2016): Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 374 (4), S. 311–322. DOI: 10.1056/NEJMoa1513257.
- Roca-Portoles, Alba; Rodriguez-Blanco, Giovanny; Sumpton, David; Cloix, Catherine; Mullin, Margaret; Mackay, Gillian M. *et al.* (2020): Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition. In: *Cell death & disease* 11 (8), S. 616. DOI: 10.1038/s41419-020-02867-2.
- Rock, Kenneth L.; Kono, Hajime (2008): The inflammatory response to cell death. In: *Annual review of pathology* 3, S. 99–126. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
- Roth, Wilfried; Reed, John C. (2004): FLIP Protein and TRAIL-Induced Apoptosis. In: TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), Bd. 67: Elsevier (Vitamins & Hormones), S. 189–206.
- Saelens, Xavier; Festjens, Nele; Vande Walle, Lieselotte; van Gorp, Maria; van Loo, Geert; Vandenabeele, Peter (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. In: *Oncogene* 23 (16), S. 2861–2874. DOI: 10.1038/sj.onc.1207523.
- Schulman, Jacquelyn J.; Wright, Forrest A.; Han, Xiaobing; Zluhan, Eric J.; Szczesniak, Laura M.; Wojcikiewicz, Richard J. H. (2016): The Stability and Expression Level of Bok Are Governed by Binding to Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (22), S. 11820–11828. DOI: 10.1074/jbc.M115.711242.
- Sequist, Lecia V.; Waltman, Belinda A.; Dias-Santagata, Dora; Digumarthy, Subba; Turke, Alexa B.; Fidias, Panos *et al.* (2011): Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. In: *Science translational medicine* 3 (75), 75ra26. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002003.
- Shalem, Ophir; Sanjana, Neville E.; Hartenian, Ella; Shi, Xi; Scott, David A.; Mikkelsen, Tarjei *et al.* (2014): Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166), S. 84–87. DOI: 10.1126/science.1247005.

- Shapovalov, Yuriy; Benavidez, David; Zuch, Daniel; Eliseev, Roman A. (2010): Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma. In: *International journal of cancer* 127 (1), S. 67–76. DOI: 10.1002/ijc.25024.
- Sharma, Kanika; Vu, Thien-Trang; Cook, Wade; Naseri, Mitra; Zhan, Kevin; Nakajima, Wataru; Harada, Hisashi (2018): p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. In: *Molecular oncology* 12 (6), S. 788–798. DOI: 10.1002/1878-0261.12172.
- Sharon, David; Cathelin, Severine; Mirali, Sara; Di Trani, Justin M.; Yanofsky, David J.; Keon, Kristine A. *et al.* (2019): Inhibition of mitochondrial translation overcomes venetoclax resistance in AML through activation of the integrated stress response. In: *Science translational medicine* 11 (516). DOI: 10.1126/scitranslmed.aax2863.
- Shieh, Sheau-Yann; Ikeda, Masako; Taya, Yoichi; Prives, Carol (1997): DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. In: *Cell* 91 (3), S. 325–334. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80416-X.
- Sleijfer, Stefan; Ouali, Monia; van Glabbeke, Martine; Krarup-Hansen, Anders; Rodenhuis, Sjoerd; Le Cesne, Axel *et al.* (2010): Prognostic and predictive factors for outcome to first-line ifosfamide-containing chemotherapy for adult patients with advanced soft tissue sarcomas: an exploratory, retrospective analysis on large series from the European Organization for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC-STBSG). In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 46 (1), S. 72–83. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.09.022.
- Stehle, Daniel; Grimm, Melanie; Einsele-Scholz, Stephanie; Ladwig, Friederike; Johanning, Janina; Fischer, Gerd *et al.* (2018): Contribution of BH3-domain and Transmembrane-domain to the Activity and Interaction of the Pore-forming Bcl-2 Proteins Bok, Bak, and Bax. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 12434. DOI: 10.1038/s41598-018-30603-6.
- Stilgenbauer, Stephan; Eichhorst, Barbara; Schetelig, Johannes; Coutre, Steven; Seymour, John F.; Munir, Talha *et al.* (2016): Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. In: *The Lancet Oncology* 17 (6), S. 768–778. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30019-5.
- Stilgenbauer, Stephan; Eichhorst, Barbara; Schetelig, Johannes; Hillmen, Peter; Seymour, John F.; Coutre, Steven *et al.* (2018): Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (19), S. 1973–1980. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6840.

- Tang, Zheng-Hai; Lu, Jin-Jian (2018): Osimertinib resistance in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies. In: *Cancer letters* 420, S. 242–246. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.004.
- Tao, Zhi-Fu; Hasvold, Lisa; Le Wang; Wang, Xilu; Petros, Andrew M.; Park, Chang H. *et al.* (2014): Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. In: *ACS medicinal chemistry letters* 5 (10), S. 1088–1093. DOI: 10.1021/ml5001867.
- Taylor, Barry S.; Barretina, Jordi; Maki, Robert G.; Antonescu, Cristina R.; Singer, Samuel; Ladanyi, Marc (2011): Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (8), S. 541–557. DOI: 10.1038/nrc3087.
- Thallinger, Christiane; Wolschek, Markus F.; Maierhofer, Helmut; Skvara, Hans; Pehamberger, Hubert; Monia, Brett P. *et al.* (2004): Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (12 Pt 1), S. 4185–4191. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0774.
- Townsend, Paul A.; Kozhevnikova, Maria V.; Cexus, Olivier N. F.; Zamyatnin, Andrey A.; Soond, Surinder M. (2021): BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 40 (1), S. 355. DOI: 10.1186/s13046-021-02157-5.
- Tse, Christin; Shoemaker, Alexander R.; Adickes, Jessica; Anderson, Mark G.; Chen, Jun; Jin, Sha *et al.* (2008): ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. In: *Cancer research* 68 (9), S. 3421–3428. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
- Tsujimoto, Y.; Finger, L. R.; Yunis, J.; Nowell, P. C.; Croce, C. M. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. In: *Science (New York, N.Y.)* 226 (4678), S. 1097–1099. DOI: 10.1126/science.6093263.
- van Oosterom, A.T; Mouridsen, H.T; Nielsen, O.S; Dombernowsky, P.; Krzemieniecki, K.; Judson, I. *et al.* (2002): Results of randomised studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (STBSG) with two different ifosfamide regimens in first- and second-line chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma patients. In: *European Journal of Cancer* 38 (18), S. 2397–2406. DOI: 10.1016/s0959-8049(02)00491-4.
- van Vranken, Jonathan G.; Na, Un; Winge, Dennis R.; Rutter, Jared (2015): Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 50 (2), S. 168–180. DOI: 10.3109/10409238.2014.990556.

- Villunger, Andreas; Michalak, Ewa M.; Coultas, Leigh; Müllauer, Franziska; Böck, Gunther; Ausserlechner, Michael J. *et al.* (2003): p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. In: *Science (New York, N. Y.)* 302 (5647), S. 1036–1038. DOI: 10.1126/science.1090072.
- Vogler, Meike; Hamali, Hassan A.; Sun, Xiao-Ming; Bampton, Edward T. W.; Dinsdale, David; Snowden, Roger T. *et al.* (2011): BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. In: *Blood* 117 (26), S. 7145–7154. DOI: 10.1182/blood-2011-03-344812.
- Wajant, Harald (2003): Death receptors. In: *Essays in biochemistry* 39, S. 53–71. DOI: 10.1042/bse0390053.
- Wang, C.; Youle, R. J. (2012): Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. In: *Oncogene* 31 (26), S. 3177–3189. DOI: 10.1038/onc.2011.497.
- Wang, Haolan; Guo, Ming; Wei, Hudie; Chen, Yongheng (2021): Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. In: *Journal of hematology & oncology* 14 (1), S. 67. DOI: 10.1186/s13045-021-01079-1.
- Wang, Qiuyan; Mora-Jensen, Helena; Weniger, Marc A.; Perez-Galan, Patricia; Wolford, Chris; Hai, Tsonwin *et al.* (2009): ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7), S. 2200–2205. DOI: 10.1073/pnas.0807611106.
- Wei, Chia-Lin; Wu, Qiang; Vega, Vinsensius B.; Chiu, Kuo Ping; Ng, Patrick; Zhang, Tao *et al.* (2006): A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. In: *Cell* 124 (1), S. 207–219. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.043.
- Weitz, Jürgen; Antonescu, Christina R.; Brennan, Murray F. (2003): Localized extremity soft tissue sarcoma: improved knowledge with unchanged survival over time. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (14), S. 2719–2725. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.026.
- Weller, Sandra; Toenneßen, Astrid; Schaefer, Benjamin; Beigl, Tobias; Muenchow, Alina; Böpple, Kathrin *et al.* (2022): The BCL-2 inhibitor ABT-199/venetoclax synergizes with proteasome inhibition via transactivation of the MCL-1 antagonist NOXA. In: *Cell death discovery* 8 (1), S. 215. DOI: 10.1038/s41420-022-01009-1.



- Westphal, D.; Kluck, R. M.; Dewson, G. (2014): Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. In: *Cell death and differentiation* 21 (2), S. 196–205. DOI: 10.1038/cdd.2013.139.
- Willis, Simon N.; Chen, Lin; Dewson, Grant; Wei, Andrew; Naik, Edwina; Fletcher, Jamie I. *et al.* (2005): Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. In: *Genes & development* 19 (11), S. 1294–1305. DOI: 10.1101/gad.1304105.
- World Health Organization (WHO) (2022). Online verfügbar unter <https://www.who.int/>, zuletzt aktualisiert am 30.12.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2023.
- Wu, Xiaowei; Luo, Qingyu; Liu, Zhihua (2020): Ubiquitination and deubiquitination of MCL1 in cancer: deciphering chemoresistance mechanisms and providing potential therapeutic options. In: *Cell death & disease* 11 (7), S. 556. DOI: 10.1038/s41419-020-02760-y.
- Wu, Y.; Mehew, J. W.; Heckman, C. A.; Arcinas, M.; Boxer, L. M. (2001): Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. In: *Oncogene* 20 (2), S. 240–251. DOI: 10.1038/sj.onc.1204067.
- Wuillème-Toumi, S.; Robillard, N.; Gomez, P.; Moreau, P.; Le Gouill, S.; Avet-Loiseau, H. *et al.* (2005): Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. In: *Leukemia* 19 (7), S. 1248–1252. DOI: 10.1038/sj.leu.2403784.
- Xie, Yuan-Hong; Chen, Ying-Xuan; Fang, Jing-Yuan (2020): Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. In: *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), S. 22. DOI: 10.1038/s41392-020-0116-z.
- Yamaguchi, Hirohito; Wang, Hong-Gang (2004): CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (44), S. 45495–45502. DOI: 10.1074/jbc.M406933200.
- Yin, Ning; Ma, Wenzhe; Pei, Jianfeng; Ouyang, Qi; Tang, Chao; Lai, Luhua (2014): Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. In: *PloS one* 9 (4), e93960. DOI: 10.1371/journal.pone.0093960.
- Youle, Richard J.; Strasser, Andreas (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (1), S. 47–59. DOI: 10.1038/nrm2308.
- Zhang, L.; Yu, J.; Park, B. H.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (2000): Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5493), S. 989–992. DOI: 10.1126/science.290.5493.989.

Zyryanova, Alisa F.; Weis, Félix; Faille, Alexandre; Alard, Akeel Abo; Crespillo-Casado, Ana; Sekine, Yusuke *et al.* (2018): Binding of ISRIB reveals a regulatory site in the nucleotide exchange factor eIF2B. In: *Science (New York, N.Y.)* 359 (6383), S. 1533–1536. DOI: 10.1126/science.aar5129.

## 10. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) und dem Robert-Bosch-Zentrum für Tumorerkrankungen (RBCT) unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Hans-Georg Kopp und Herrn PD Dr. Frank Essmann durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe bzw. unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die in Abbildung 9 dargestellten Messwerte enthalten Daten aus der Promotionsarbeit von Frau Dr. Alina Münchow (Promotionsarbeit Münchow A. 2021). Die in Abbildung 23 ermittelten Daten wurden von Herrn Dr. Bernhard F. Gillisen erhoben und bereits veröffentlicht (Weller *et al.* 2022). Die in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellten Versuche sind von Frau Astrid Toennießen generierten Daten und veröffentlicht (Weller *et al.* 2022).

## 11. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Muenchow, Alina; Weller, Sandra; Hinterleitner, Clemens; Malenke, Elke; Bugl, Stefanie; Wirths, Stefan *et al.* (2020): The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. In: *Cell death & disease* 11 (8), S. 701. DOI: 10.1038/s41419-020-02910-2.

Weller, Sandra; Toenneßen, Astrid; Schaefer, Benjamin; Beigl, Tobias; Muenchow, Alina; Böpple, Kathrin *et al.* (2022): The BCL-2 inhibitor ABT-199/venetoclax synergizes with proteasome inhibition via transactivation of the MCL-1 antagonist NOXA. In: *Cell Death Discovery* 8, S. 215. DOI: 10.1038/s41420-022-01009-1.

### 11.1 Abstracts

Weller *et al.*: Double impact of ABT-199 by directly blocking anti-apoptotic BCL-2 and inhibiting MCL-1 via transactivation of NOXA. Meeting: AACR Annual Meeting, 08. – 13. April 2022; New Orleans, LA, USA

Weller *et al.*: Impact of proteasome inhibitor specificity and efficacy on apoptosis induction by combination with ABT-199. Meeting: AACR Virtual Annual Meeting, 09. – 14. April 2021, USA

Weller *et al.*: ABT-199 and Bortezomib Synergistically Induce Apoptosis in Soft Tissue Sarcomas. Meeting: AACR Virtual Annual Meeting, 27. – 28. April 2020, USA

Weller *et al.*: ABT-199 and Bortezomib Synergistically Induce Apoptosis in Soft-Tissue Sarcomas. Meeting: AACR Virtual Annual Meeting, 19. – 21. Februar 2020; München, DE

## 12. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Essmann für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP) und dem Robert-Bosch-Zentrum für Tumorerkrankungen (RBCT) in Stuttgart meine Doktorarbeit in einem sehr interessanten Projekt anzufertigen, sowie für die Übernahme der Erstkorrektur. Die hilfreichen Anregungen, zahlreichen Diskussionen und konstruktiven Vorschläge haben erheblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Doron Rapaport, der die Erst-Begutachtung dieser Arbeit übernahm.

Ein besonderer Dank geht an meine Arbeitskollegen/innen Dr. Kathrin Böpple, Tobias Beigl, Dr. Meng Dong, Benjamin Schäfer und Kerstin Willecke für die tolle Zusammenarbeit, für die Hilfestellung bei Fragen und für die aufbauenden Worte.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab und Herrn Prof. Dr. Steven Johnsen für die Möglichkeit, am IKP und RBCT in Stuttgart meine Dissertation anzufertigen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinem Mann Dennis Weller, und meinen Freunden für das verständnisvolle Zuhören und die moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

## 13. Anhang

### 13.1 Laborgeräte

Tabelle 17: Allgemein verwendete Laborgeräte

Laborgerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug - GAP.125.300.085	Asecos GmbH, Gründau, DE
Autoklaven:	
TOMY SX-700E	TOMY Digital Biology Co., LTD., Tokyo, JPN
Varioklav Typ 500	H + P Labortechnik GmbH,
Brutschränke - Binder 09-10521	Oberschleißheim bei München, DE
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren:	
Binder BC150 #04-73042	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Binder CB150 E3	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
HERAcell 150 Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dispenser HandyStep electronic 1 µL - 50 mL	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, DE
Einfrierbox 5100 Cryo 1 °C Freezing container	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, New York, USA
Eismaschine - WESSAMAT perfect ice Flake-Line	WESSAMAT Eismaschinenfabrik GmbH, Kaiserslautern, DE
Flüssigstickstofftank - Cryotherm APOLLO	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg, DE
Gefrier- und Kühlschränke:	
Bosch KK20-90	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, DE
Bosch KK-79	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, DE
Bosch KS-110	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, DE
Liebherr Logger 16-S3 KK-114	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, DE
Liebherr MEDline KK100	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, DE
Medilab KS-86	EWALD Innovationstechnik GmbH, Rodenberg, DE
Gelkammer Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Glaswaren - Erlenmeyerkolben, Flaschen, Messzylinder, Bechergläser, Trichter	VWR International GmbH, Erlangen, DE
Heizblock Techne Dri-Block DB-2A	Techne LTD. Duxford Cambridge, U.K.
Heizblock und Schüttelinkubator: Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Hellfeldmikroskope:	
Leica DMIL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
OLYPMUS CKX41	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
Magnetrührer - IKA RET basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Minifugen - Corning LSE Mini Microcentrifuge 6766/C1501EU	Corning Incorporatedcostar, Corning, New York, USA
Netzteile für Gelelektrophorese:	
Electrophoresis Power Supply PEQLAB EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Power PAC 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
Power PAC 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
pH-Meter - Lab 850	Schott Instruments, Mainz, DE
PCR Thermocycler:	
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
ProFlex PCR System 10A, 250VAC	Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA
Veriti 96-Well Thermal Cycler 9902	Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfen - Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Rollenmischer:	
RM5 Assistent 348	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, DE
RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen, DE
Schüttelinkubator Innova 42 Ink Shaker	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Schüttler Mixing Block MB-102	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
Sterilbänke:	
HERAsafe KS 12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UVF 6.18 S	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Stickstofftanks:	
Cryotherm BIOSAFE	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg, DE
Tiefkühlagerschränke (-20 °C):	
BOSCH economic GSL3517 TK20-17	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, DE
Bosch Logger 16-S4 TK20-125	
Tiefkühlagerschränke (-80 °C):	
CryoCube F F740bi TK80-107	Eppendorf AG, Hamburg, DE
SANYO VIPTM Series	EWALD Innovationstechnik GmbH, Rodenberg, DE
U725 Innova TK80.112	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
Trockenschrank - Memmert	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
Vakuumabsaugpumpen:	
VACUSAFE 158310	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
VACUSIP	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH

Vortexer:	
Analog Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Corning LSETM 6776	Corning Incorporated costar, Corning, New York, USA
Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
VF2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen im Breisgau, DE
Waagen:	
Kern GS4100-2	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
XS4002S DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
Wasseraufbereitung - Milli-Q Integral 10	Millipore, Temecula, CA, USA
Wasserbad:	
ED Einhängethermostat	Labortechnik, Burgwedel, DE
Lauda 012T	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus, Hanau, DE
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Hettich Universal 32 Typ 1605	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Hettich Universal 320 R Typ 1406	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
OPTIMATM L-100 XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Sorvall Superspeed RC2-B	Hormuth Vetter GmbH, Heidelberg, DE

## 13.2 Verbrauchsmaterialien

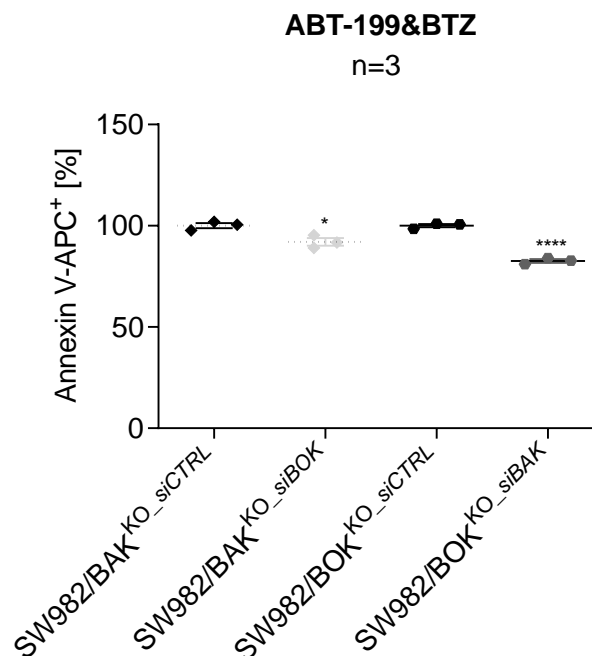
**Tabelle 18: Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Platte, weiß, Flachboden	Thermo Fisher Scientific Nunc, Roskilde, DNK
Combitips advanced (0,1 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Einmalimpfösen (10 µL)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einmalinjektionskanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalspritzen (5- 10- und 50 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einweg Latex Untersuchungshandschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Petrischalen (Ø 10 cm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Petrischalen für die Zellkultur (Ø 10 cm)	Greiner Bio One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen mit Filter (10/20 µL, 200 µL und 1000 µL)	Rainin, Gießen, DE



Pipettierreservoir	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße FACS (5 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Rotilabo-Spritzenfilter, CA, steril, 0,20 µm Porengröße	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Serologische Pipetten (5-, 10-, 25- und 50 mL)	Corning Incorporated costar, Corning, New York, USA
Whatman-Papier	GE Healthcare Life Science, Freiburg, DE
Wippschüttler GFL 3013	GFL, Burgwedel, DE
Zellkulturflaschen (25-, 75-, 175 cm <sup>3</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96-Well; Flachboden)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellreaktor-Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96-Well; Flachboden)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellreaktor-Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellschaber (25 mm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

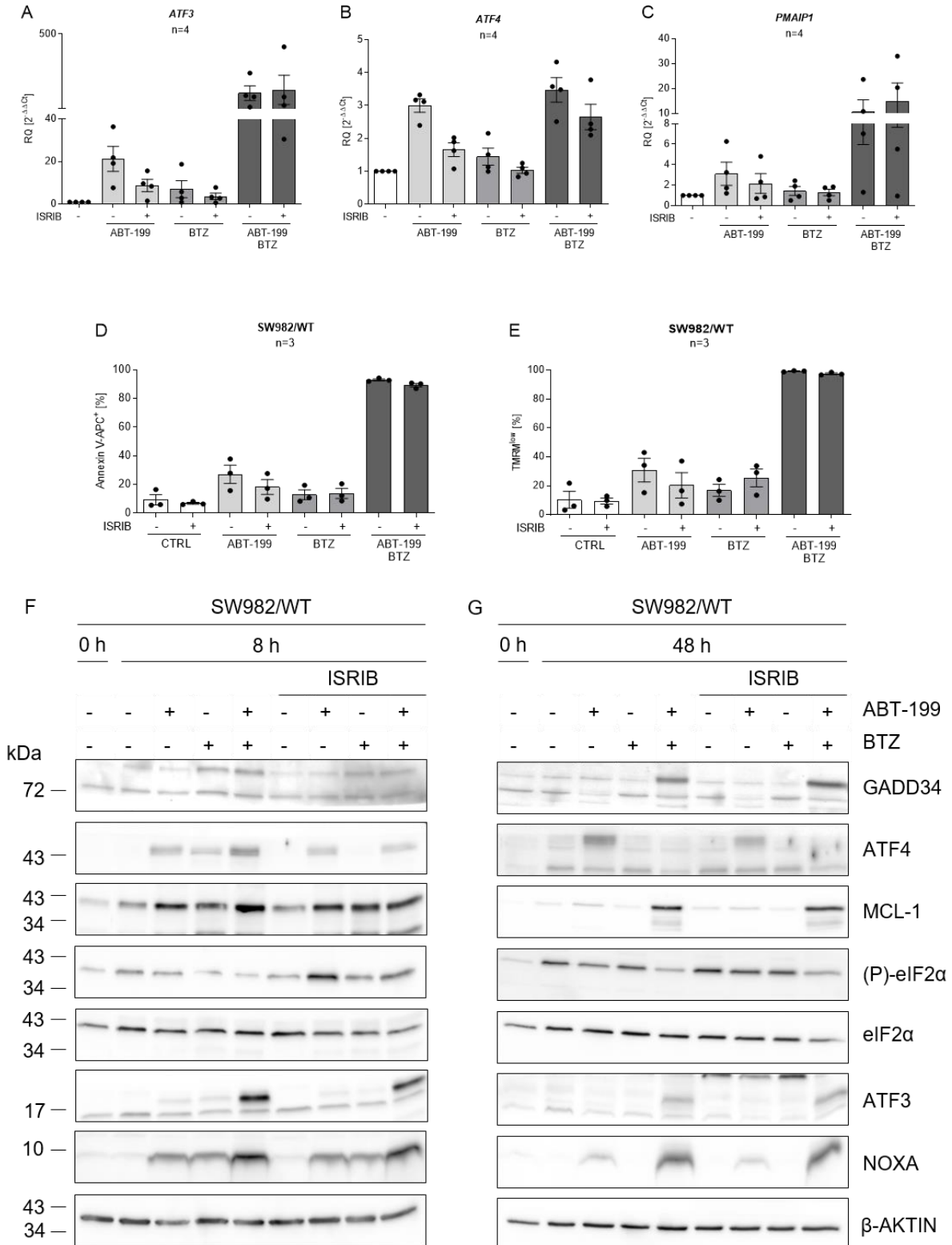
### 13.3 Rolle der Effektorproteine BAK und BOK



**Abbildung 42: Knock-Down von BOK in SW982/BAK<sup>KO</sup> bzw. Knock-Down von BAK in SW982/BOK<sup>KO</sup> zeigte keinen ersichtlichen Einfluss auf die Zelltod-Induktion.** Nach erfolgreicher Transfektion von BAK oder BOK am Vortag wurden die SW982/BAK<sup>KO</sup> bzw. SW982/BOK<sup>KO</sup> mit 15 µM ABT-199 und 5 nM BTZ für weitere 24 h inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometer die Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bestimmt. siBOK führte in den SW982/BAK<sup>KO</sup>-Zellen zu einer Zelltod-Reduktion um ~5%, während es bei siBAK in den

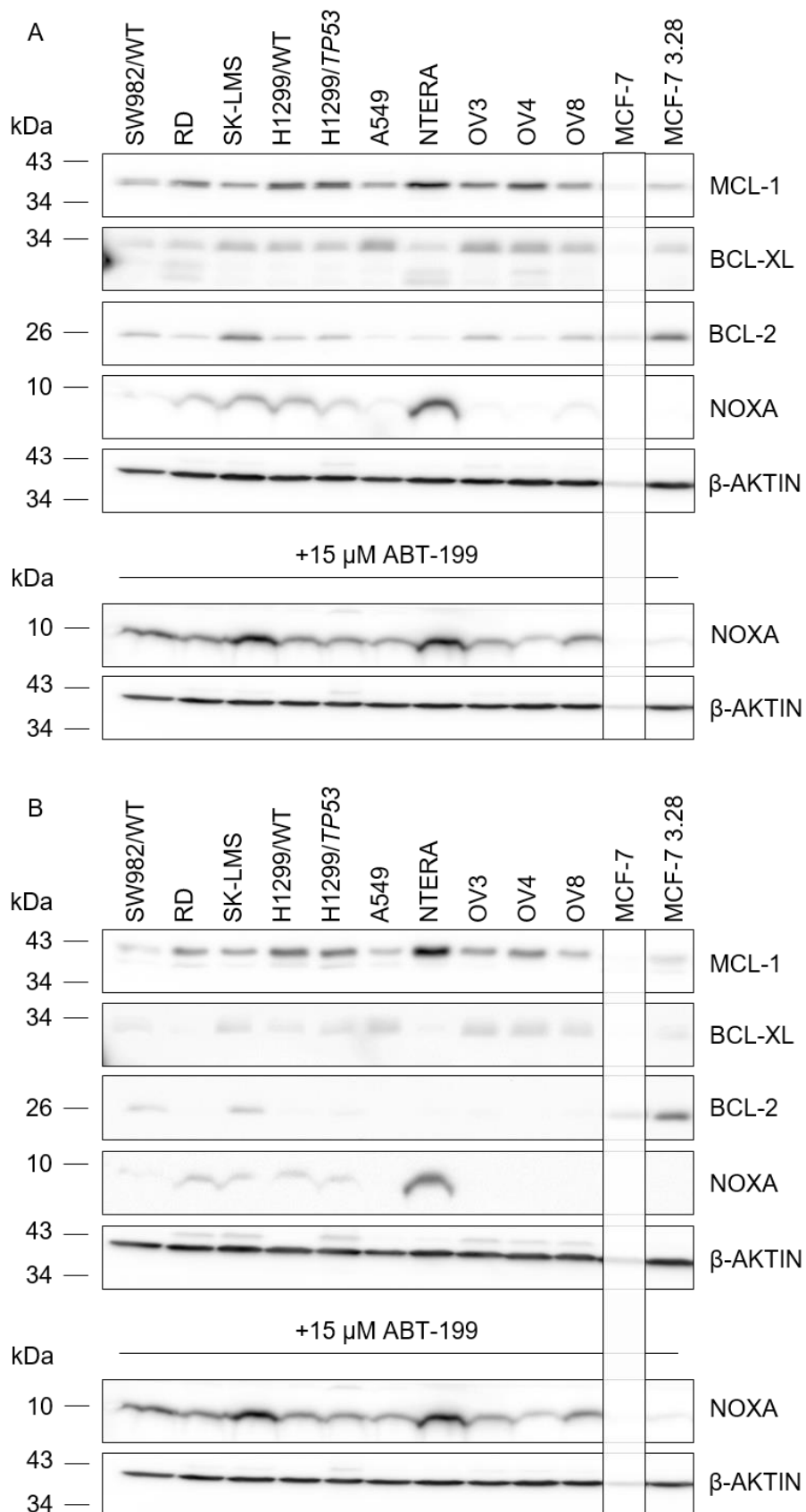
SW982/BOK<sup>KO</sup>-Zellen zu ~16% reduzierter Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen kam. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD; n=3.

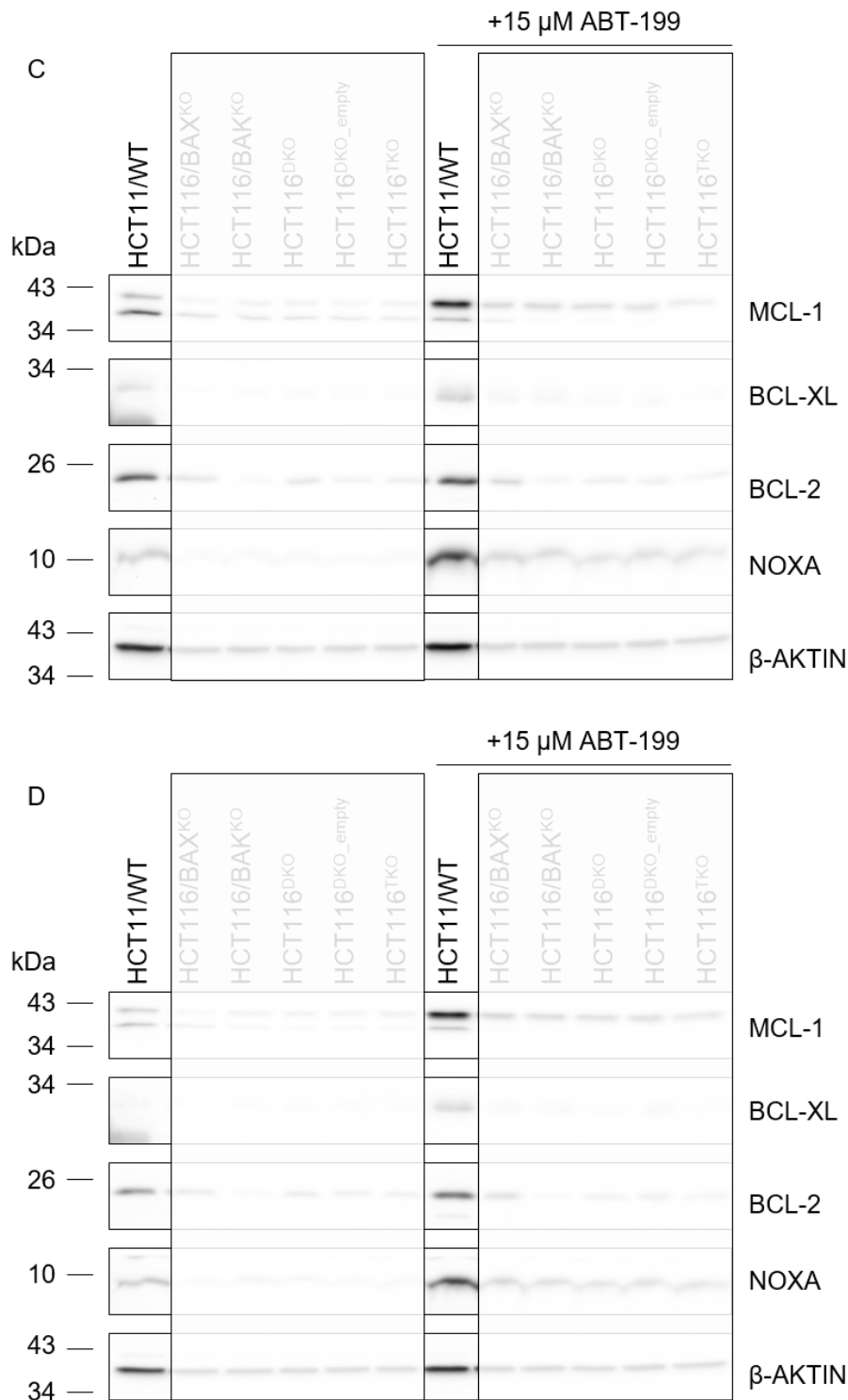
### 13.4 Der ISR-Inhibitor ISRIB hemmt die durch die ABT-199&BTZ-aktivierte ISR nicht



**Abbildung 43: Der ISR-Inhibitor ISRIB zeigt keine effiziente Abschwächung der ISR und der damit einhergehenden Zelltod-Induktion.** A-C) SW982/WT-Zellen wurden mit 15  $\mu$ M ABT-199 und/oder 5 nM BTZ (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) in Co-Applikation mit 200 nM ISRIB für 8 h inkubiert. Die Expression von *ATF3*, *ATF4* und *PMAIP1* wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die geringe Reduktion der durch ABT-199 hervorgerufenen Induktion an *ATF3* und *ATF4* bei Anwesenheit von ISRIB zeigte einen limitierten Effekt des Inhibitors ISRIB bei der transkriptionellen Induktion von *ATF3&ATF4* und *PMAIP1*. Die ABT-199&BTZ-vermittelte Induktion von *ATF3*, *ATF4* und *PMAIP1* wurde durch ISRIB nicht verlangsamt. D und E) Für die Rolle von ISRIB bei der Zelltod-Induktion wurden SW982/WT mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM BTZ für 24 h inkubiert und der Zelltod mittels Durchflusszytometrie über eine Annexin V-APC und TMRM-Färbung bestimmt. Auch hier konnte ISRIB den Zelltod nicht beeinflussen, was die Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>-Werte mit über 90% bestätigten. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD von vier (A-C) bzw. drei (D und E) unabhängigen Experimenten. F und G) Für die Beeinflussung von ISRIB auf die Proteinexpression wurden SW982/WT-Zellen für 8 h und 48 h mit 15  $\mu$ M ABT-199  $\pm$  5 nM BTZ (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) in Anwesenheit von 200 nM ISRIB inkubiert und geerntet. In Übereinstimmung mit Literaturdaten ergab die Proteinexpressions-Analyse eine Akkumulation von (P)-eIF2 $\alpha$  in Anwesenheit von ISRIB bei Inkubation mit ABT-199&BTZ, die mit abgeschwächter Translation von ATF4 einherging. Die erhöhte (P)-eIF2 $\alpha$ -Expression wurde nach 48 h durch die Aktivität der Dephosphatase GADD34 wieder gesenkt. Überraschenderweise konnte der ISRIB-Inhibitor die ISR und die damit einhergehende Induktion von ATF3, ATF4 und NOXA nicht abschwächen. ISRIB zeigte ein limitiertes Wirkungs- und Zeitfenster auf die ISR und somit auf die Expression von induziertem ATF3, ATF4 und NOXA. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Western Blot Analysen, wobei  $\beta$ -AKTIN als Ladekontrolle diente.

### 13.5 Detektion verschiedener basaler BCL-2-Protein-Expressionen in 12 Krebs-Zelllinien





**Abbildung 44: Die Proteinexpressionen von MCL-1, BCL-xL, BCL-2 und NOXA zeigen Unterschiede in den verschiedenen Krebs-Zelllinien.** Für die Bestimmung der basalen Proteinexpressionen wurden die 12 Zelllinien (SW982/WT, RD, SK-LMS, H1299/WT, H1299/*TP53*, A549, NTERA, OV3, OV4, OV8, MCF-7.3.28 und HCT116/WT) mit bzw. ohne 15  $\mu$ M ABT-199 (+10  $\mu$ M Q-VD-OPh) für 8 h inkubiert und mittels Western Blot analysiert. Sowohl die basalen Proteinexpressionslevel von MCL-1, BCL-xL, BCL-2 und NOXA als auch die NOXA-Expression in Anwesenheit von ABT-199 wurden zur Korrelationsanalyse mittels Spearman's herangezogen. A und B) Dargestellt sind zwei unabhängige Western Blot Analysen der 11 Krebs-Zelllinien, wobei  $\beta$ -AKTIN als Ladekontrolle diente. C und D)

Dargestellt sind zwei unabhängige Western Blot Analysen der HCT116/WT Krebs-Zelllinie, wobei  $\beta$ -AKTIN als Ladekontrolle diente. Die mit einem Kasten überdeckten Western Blot *Lanes* sind Proben von Zelllinien, die nicht zur Spearman-Korrelations-Analyse herangezogen wurden.