

Aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus

Robert Bosch Centrum für Tumorerkrankungen

Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen

**Apoptoseinduktion durch BH3-Mimetika und  
Bortezomib in Sarkomzelllinien**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Münchow, Alina**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 17.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VI
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Neoplasien .....	1
1.2 Sarkome .....	2
1.2.1 Subtypen und Epidemiologie .....	2
1.2.2 Therapie und aktuelle klinische Studien .....	5
1.2.3 Pathogenese und mögliche therapeutische Zielmoleküle .....	7
1.3 Apoptose .....	10
1.3.1 Biologische Bedeutung und Grundlagen .....	10
1.3.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg .....	12
1.3.3 Intrinsischer Apoptosesignalweg .....	13
1.4 Medikamente zur Tumorthherapie .....	18
1.4.1 Bortezomib .....	18
1.4.2 BH3-Mimetika .....	19
1.5 Notwendigkeit der Arbeit und Zielsetzung .....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1 Materialien .....	22
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.2 Chemikalien .....	23
2.1.3 Zellkultur .....	24
2.1.4 Zellviabilität .....	25
2.1.5 Antikörper .....	25
2.1.6 Inhibitoren/Stressoren .....	27
2.1.7 Geräte .....	27
2.1.8 Software .....	29
2.2 Zellbiologische Methoden .....	29
2.2.1 Kultivierung der Sarkomzelllinien .....	29
2.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau .....	30
2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels Annexin V-APC und TMRM Färbung .....	30

2.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	32
2.2.5 Medikamenteninkubation und Ernte der Sarkomzellen für Western Blot Analyse .....	33
2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	34
2.3.1 Generierung von Zelllysaten aus Sarkomzellen.....	34
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Vorbereitung der Proben .....	34
2.3.3 Gelelektrophorese und Western Blot .....	35
2.4 Statistische Auswertung .....	37
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
3.1 Zelltodanalyse von Weichteilsarkomen nach alleiniger bzw. gleichzeitiger Inkubation mit BH3-Mimetika und Bortezomib.....	39
3.1.1 Venetoclax und Bortezomib .....	39
3.1.2 A-1155463 und Bortezomib .....	43
3.1.3 A-1210477 und Bortezomib .....	48
3.2 Wirkung von Venetoclax und Bortezomib auf die Proteinexpression.....	53
3.2.1 Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen unter Venetoclax und/oder Bortezomib Inkubation in SW982/wt, RD und SK-LMS-1 .....	53
3.2.2 Mitochondriale Clusterbildung der MDPs Bax, Bak und Bok.....	55
3.3 Einfluss von MDP <i>knock-outs</i> auf die Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in SW982 .....	58
3.3.1 Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen unter Venetoclax und/oder Bortezomib Inkubation in SW982/wt und MDP <i>knock-out</i> Zelllinien .....	59
3.3.2 Durchflusszytometrischer Zelltodnachweis nach Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib.....	63
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
4.1 Alleinige und simultane Inkubation von Sarkomzelllinien mit BH3- Mimetika und Bortezomib .....	68
4.2 Molekularer Hintergrund der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in Weichteilsarkomen.....	72
4.3 Modell der synergistischen Apoptoseinduktion.....	75
4.3.1 Hypothese: Molekularer Mechanismus der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax&Bortezomib .....	76
4.4 Ausblick.....	78
4.5 Übertragbarkeit in den Sarkompatienten .....	80

<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
<b>7. ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>100</b>
<b>8. VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>101</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>10. LEBENS LAUF .....</b>	<b>103</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg	13
Abb. 2	Bcl-2 Proteinfamilie	14
Abb. 3	Alternative Modelle der <i>BH3-only</i> Protein vermittelten Apoptoseinduktion	16
Abb. 4	Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch Venetoclax und/oder Bortezomib	41
Abb. 5	Signifikant erhöhte Apoptoseinduktion durch simultane Gegenwart von Venetoclax und Bortezomib	42
Abb. 6	Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch A-1155463 und/oder Bortezomib	45
Abb. 7	Apoptoseinduktion durch A-1155463 und/oder Bortezomib	47
Abb. 8	Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch A-1210477 und/oder Bortezomib	50
Abb. 9	Apoptoseinduktion durch A-1210477 und/oder Bortezomib	52
Abb. 10	Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in SW982/wt, RD und SK-LMS-1 nach Inkubation in An- und/oder Abwesenheit von Venetoclax und Bortezomib	54
Abb. 11	Venetoclax&Bortezomib induziert mitochondriale Clusterbildung der MDPs Bax, Bak und Bok	57
Abb. 12	Expression der MDPs in SW982/wt und monoklonaler <i>knock-out</i> Sublinien	58
Abb. 13	Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in SW982/wt und korrespondierender MDP <i>knock-out</i> Zelllinien	62
Abb. 14	Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in SW982/wt und SW982/MDP <i>knock-out</i> Sublinien	66
Abb. 15	Modell der synergistischen Apoptoseinduktion	77

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Häufige Sarkomsubtypen	4
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 3	Verwendete Chemikalien	23
Tabelle 4	Verwendete Zelllinien	24
Tabelle 5	Materialien für die Zellkultur	24
Tabelle 6	Materialien zur Vitalitätsbestimmung	25
Tabelle 7	Verwendete Antikörper	25
Tabelle 8	Verwendete Inhibitoren und Stressoren	27
Tabelle 9	Verwendete Geräte	27
Tabelle 10	Verwendete Software	29
Tabelle 11	Konzentrationen Titrationsexperiment	31
Tabelle 12	Konzentrationen <i>knock-out</i> Versuche	32

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABP	Annexin Bindepuffer
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
Apo-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP / dATP	(Desoxy) Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-w	<i>Bcl-2 like 2 protein</i>
Bcl-x <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
Bid / tBid	<i>(truncated) BH3-interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
Bok	<i>Bcl-2 ovarian killer</i>
BRAF	Isoform von <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> Protein
BRCA2	<i>Breast Cancer gene/protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>

CD95(L)	<i>Cluster of differentiation 95 (Ligand)</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CFA	<i>Colony formation assay</i>
CLL	<i>Chronisch lymphatische Leukämie</i>
COL1A1	<i>Collagen Type 1 Alpha 1</i>
CRISPR/Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DD	<i>Death domain</i>
DFSP	<i>Dermatofibrosarcoma protuberans</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DANN	<i>Desoxy-Ribonucleic acid</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Erg	<i>ETS-related gene</i>
ERK	<i>Extracellular-regulated kinase</i>
Ets	<i>Erythroblast transformation-specific (Transkriptionsfaktor-Familie)</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associating death domain-containing protein</i>
FasL / FasR	<i>First apoptosis signal ligand / receptor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
Fli1	<i>Friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
FSC	<i>Forward scattered light</i>
g	<i>Gramm</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase</i>
GIST	<i>Gastrointestinale Stromatumore</i>

h	Stunden
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
Hdm2	= <i>Mdm2 (mouse double minute 2)</i>
Het.	Heterozygot
Hom.	Homozygot
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IC	<i>Inhibitory concentration</i>
IF	Immunfluoreszenz
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
JUN	= Transkriptionsfaktor
kDa	Kilodalton
KIT	= Rezeptortyrosinkinase
l	Liter
LMS	Leiomyosarkom
M	Molar
mA	Milliampere
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1 protein</i>
MDP	<i>Multi-domain protein</i>
MEK	<i>Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MYC	= Transkriptionsfaktor
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
Noxa	= <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
Nr.	Nummer
ns	nicht signifikant
p.	Referenzsequenz des Proteins wird verwendet

p.0	das Protein wird nicht hergestellt
PAA	Polyacrylamid
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
PDGFRA	<i>Platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha</math></i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIK3CA	Gen, das für eine Untereinheit von PI3K kodiert
PS	Phosphatidylserin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma / rat fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Rb1	<i>Retinoblastoma protein 1</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSC	<i>Side scattered light</i>
SS18	Synovialsarkom Translokation, Chromosom 18
SSX	Synovialsarkom X
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TM	Transmembrandomäne
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tom20	<i>Translocase of the outer membrane 20</i>
TP53	= Tumorsuppressorgen, das für p53 kodiert
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>

V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchmesser
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Neoplasien

Nach kardiovaskulären Erkrankungen machen maligne Neoplasien mit ca. 9,6 Millionen Toten im Jahr 2018 die zweithäufigste Todesursache weltweit aus (American Cancer Society, 2018, World Health Organization, 2021a). Somit ist etwa einer von sechs Todesfällen auf eine maligne Tumorerkrankung zurückzuführen (World Health Organization, 2021a). Ein Zusammenspiel verschiedener genetischer Faktoren (DNA-Reparaturmechanismen, Immunsystem, Hormone, Keimbahnmutationen, Alter) sowie Umweltfaktoren, wie beispielsweise physikalischer (z.B. UV-Strahlung), chemischer (z.B. Tabakrauch) oder biologischer (z.B. Viren) Kanzerogene, führt zur Transformation gesunder Zellen zu Krebszellen mit veränderten Proliferations- und Zelltodeigenschaften. Derart veränderte Zellen können in angrenzende Gewebe invasiv einwachsen bzw. in entfernte Organe über Blut- und Lymphgefäße metastasieren.

Die maligne Entartung kann im gesamten menschlichen Körper geschehen. Besonders häufig sind jedoch in absteigender Häufigkeit Brust, Lunge, Kolorektum, Prostata, Haut (Nicht-Melanome) und Magen betroffen (World Health Organization, 2021b). Die Ursprungszelle ist Grundlage für die Unterscheidung verschiedener Krebstypen. Diese werden wiederum in solide (z.B. Karzinome, Sarkome) und nicht-solide (z.B. Leukämie) wachsende maligne Neoplasien eingeteilt. Am Häufigsten treten Karzinome auf, welche etwa 85% aller malignen Krebserkrankungen ausmachen (National Cancer Institute, 2015b, Cancer Research UK, 2017). Karzinome gehen aus Epithelien hervor, welche als sogenannte Oberflächenepithelien die innere und äußere Körperoberfläche auskleiden bzw. als sogenannte Drüsenepithelien Drüsengewebe bilden. Karzinome betreffen vor allem ältere Menschen. So liegt das mediane Alter bei Diagnose eines kolorektalen Karzinoms bei ca. 68 Jahren und bei Diagnose eines Lungenkarzinoms bei ca. 70 Jahren (National Cancer Institute, 2015a). Zu den soliden Krebserkrankungen zählen auch die seltenen Sarkome, welche mesenchymalen Ursprungs sind (Cancer Research UK, 2017). Sie entstehen

beispielsweise durch Entartung von Bindegewebs-, Muskel-, Fett-, Knochen- oder Knorpelzellen.

## 1.2 Sarkome

### 1.2.1 Subtypen und Epidemiologie

Sarkome sind eine seltene und sehr heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen. Sie machen lediglich 1% aller adulten malignen Tumore aus. Hingegen sind ca. 10%-15% der pädiatrischen Krebsfälle und 8% der malignen Neoplasien in Jugendlichen und jungen Erwachsenen Sarkome (Amankwah et al., 2013, Margaret von Mehren MD, 2018). Die ungewöhnliche Altersverteilung führt zu einer Erhöhung der „verlorenen Lebensjahre“ durch diese Erkrankung. Sarkome sind im Schnitt etwas häufiger in Patienten männlichen Geschlechts zu finden (m:w 1,1-1,5:1) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021, American Cancer Society, 2021a, National Cancer Institute, 2020, Ferrari et al., 2011). Häufige Primärlokalisationen von Sarkomen sind die Extremitäten (43%), innere Organe (19%), Retroperitoneum (15%), der Körperstamm (10%) oder Kopf/Hals (9%) (Margaret von Mehren MD, 2018). Die *American Cancer Society* erwartet für das Jahr 2021 in den USA ca. 13.460 Neudiagnosen von Weichteilsarkomen und 5.350 Todesfälle durch diese Erkrankung (American Cancer Society, 2021a).

Es können grob zwei Gruppen von Sarkomen unterschieden werden. Die Sarkome der Weichteile (*soft-tissue sarcoma*) verursachen dabei mit über 85% die überwiegende Zahl der Fälle, während die Sarkome des Skelettsystems (*bone sarcoma*) weniger als 15% ausmachen (Amankwah et al., 2013, Burningham et al., 2012). Beide Gruppen umfassen viele verschiedene Subtypen. Bisher wurden mehr als 100 histologische Subtypen von Sarkomen beschrieben, welche sich neben dem Ursprungsgewebe auch in ihrer molekularen Pathogenese, dem klinischen Verlauf, der Prognose, der vorrangigen Lokalisation sowie dem medianen Erkrankungsalter unterscheiden (Tabelle 1) (Hoang et al., 2018). Rhabdomyosarkome, die aus Skelettmuskulatur hervorgehen und häufig an den Extremitäten lokalisiert sind (Seattle Cancer Care Alliance, 2020), repräsentieren den häufigsten Sarkomsubtyp in Kindern. Das

medianes Alter bei Diagnose eines Rhabdomyosarkoms liegt bei 15 Jahren (Ferrari et al., 2011). Häufige Subtypen in Jugendlichen und jungen Erwachsenen sind beispielsweise:

- i) Osteosarkome, die aus Knochenzellen hervorgehen, vor allem die Extremitäten betreffen und einen Inzidenzpeak bei 15- bis 19-Jährigen haben (Ottaviani and Jaffe, 2009, Savage and Mirabello, 2011),
- ii) Synovialsarkome, die aus primitiven mesenchymalen Zellen hervorgehen, vorrangig an der unteren Extremität lokalisiert sind und ein mittleres Manifestationsalter von 32 Jahren haben (Bakri et al., 2012), und
- iii) Ewing Sarkome, die ebenfalls aus primitiven Zellen hervorgehen, häufig Becken, Extremitäten, Thoraxwand oder Wirbelsäule betreffen und ein medianes Diagnosealter von 24 Jahren aufweisen (Ferrari et al., 2011, Seattle Cancer Care Alliance, 2020, Jedlicka, 2010).

In Erwachsenen höheren Alters dominieren unter anderem

- i) von Fettgewebe ausgehende Liposarkome, die vorwiegend retroperitoneal lokalisiert sind und ein medianes Diagnosealter von 60 Jahre haben,
- ii) Leiomyosarkome, die aus glatter Muskulatur, vorrangig von abdominalen und pelvinen Organen oder Blutgefäßen, hervorgehen und ein medianes Diagnosealter von 59 Jahren aufweisen, und
- iii) undifferenzierte Sarkome mit einem Manifestationsalter meist zwischen 50-70 Jahren (Amankwah et al., 2013, Ferrari et al., 2011, Seattle Cancer Care Alliance, 2020, orphanet, 2014).

**Tabelle 1 | Häufige Sarkomsubtypen.** Ursprungsgewebe, vorwiegende Lokalisation und Alter der Patienten sind angegeben.

<b>Sarkomsubtyp</b>	<b>Ursprungsgewebe</b>	<b>Vorwiegende Lokalisation</b>	<b>Medianes Diagnosealter / Inzidenzpeak* / mittleres Manifestationsalter** (Jahre)</b>
Rhabdomyosarkom	Skelettmuskulatur	Extremitäten	15
Osteosarkome	Knochenzellen	Extremitäten	15-19*
Ewing Sarkome	Primitive Zellen	Becken, Extremitäten, Thoraxwand, Wirbelsäule	24
Synovialsarkome	Primitive mesenchymale Zellen	Untere Extremität	32**
Leiomyosarkome	Glatte Muskulatur	Abdominelle und pelvine Organe, Blutgefäße	59
Liposarkome	Fettgewebe	Retroperitoneal	60
Undifferenzierte Sarkome	/	/	50-70*

Meist entstehen Sarkome spontan ohne nachweisbare Ursache. Dennoch sind einige Risikofaktoren bekannt, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Sarkoms erhöhen. Hierzu gehören hereditäre Syndrome, wie beispielsweise das Li-Fraumeni-Syndrom oder die Neurofibromatose, ionisierende Strahlung (z.B. im Rahmen einer Radiotherapie oder nuklearer Katastrophe), Einnahme bestimmter Chemotherapeutika (z.B. Cyclophosphamid), virale Infektionen (beispielsweise mit den Gammaherpesviren Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) oder Epstein-Barr-Virus (EBV)) und chronische Entzündungen. Zudem gibt es Hinweise, dass auch Hormone und bestimmte Chemikalien und Umweltgifte (z.B. Dioxin, Vinylchlorid, Chlorphenol) mit der Entstehung von Sarkomen assoziiert sind (Amankwah et al., 2013, Petersen, 2018, Gottlieb, 2002, Münchow, 2019).

### 1.2.2 Therapie und aktuelle klinische Studien

Aufgrund ihrer Heterogenität in molekularer Pathogenese, histologischen Charakteristika, klinischem Verlauf und Prognose sowie ihrer Rarität stellt die Therapie von Sarkomen auch heute noch eine große Herausforderung dar. Noch immer sind die Therapiemöglichkeiten limitiert und die komplette chirurgische Resektion (R0-Resektion) verbleibt die einzige Chance auf Heilung. Eingesetzt werden zudem neoadjuvante und adjuvante Radio- und Chemotherapie im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes. Jedoch führten konventionelle zytotoxische Chemotherapie und Radiotherapie bisher lediglich zu einer geringfügigen Verbesserung der Überlebensrate (Demicco et al., 2012). Die Standardtherapie resektabler Sarkome ist die komplette chirurgische Resektion kombiniert mit adjuvanter Radiotherapie und/oder Chemotherapie. Hierbei wird die medikamentöse Chemotherapie bei lokal begrenzten Weichteilsarkomen international zum Teil noch uneinheitlich bewertet, sodass für einige Sarkomsubtypen in diesem Stadium keine generelle Empfehlung einer adjuvanten Chemotherapie besteht (Schütte et al., 2019). Im Falle lokal fortgeschrittener Sarkome, bei denen entweder keine primäre R0-Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand gewährleistet werden kann oder eine solche Operation zu einer erheblichen Verstümmelung führen würde, werden zusätzlich neoadjuvante Therapiestrategien (z.B. Radiotherapie, Radiochemotherapie) interdisziplinär diskutiert. Metastasierte oder irresektable Sarkome bedürfen einer systemischen Chemotherapie. Als Standard-Erstlinientherapie dient hierfür eine Doxorubicin-Monotherapie oder eine Doxorubicin plus Ifosfamid Kombinationstherapie (Schütte et al., 2019, Zhang and Pollock, 2014). In klinischen Studien zeigte sich ein Vorteil der Kombinationsbehandlung bezüglich des medianen progressionsfreien Überlebens, jedoch führte die Kombination der Medikamente zu einem vermehrten Vorkommen höhergradiger Nebenwirkungen (Grad 3 und 4) und nicht zu einer signifikanten Verbesserung im medianen Gesamtüberleben, welches für Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasierten Weichteilsarkom lediglich 12-19 Monate beträgt (Judson et al., 2014, Bae et al., 2016, Tap et al., 2017). Nachdem in einer Phase 2 Studie das mediane Gesamtüberleben von 14,7 Monate unter Doxorubicin-Therapie auf

26,5 Monate mit Olaratumab plus Doxorubicin angehoben werden konnte (NCT01185964) (Tap et al., 2016), wurde Ende 2016 Olaratumab (Lartruvo) in Kombination mit Doxorubicin für die Erst- und Zweitlinientherapie des fortgeschrittenen Weichteilsarkoms durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) und die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Dieser Effekt konnte in der anschließenden Phase 3 Studie (NCT02451943) jedoch nicht bestätigt werden (Tap et al., 2019), sodass die EMA seit 2019 empfiehlt, keine neuen Behandlungen mit Olaratumab plus Doxorubicin mehr zu beginnen und die EU-Zulassung widerrufen hat (European Medicines Agency, 2019).

Im Gegensatz zur Erstlinientherapie variiert die Zweit- und Drittlinientherapie zwischen den verschiedenen Sarkomsubtypen. Eingesetzt wird beispielsweise eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin plus Docetaxel für Leiomyosarkome und undifferenzierte pleomorphe Sarkome, hochdosiertes Ifosfamid für Synovialsarkome, Trabectedin oder Eribulin für Liposarkome oder Pazopanib für nicht-Liposarkome (Schütte et al., 2019, In et al., 2017, Lopez-Pousa et al., 2016).

Die 5-Jahres-Überlebensrate ist unter anderem abhängig vom Stadium des Sarkoms zum Zeitpunkt der Diagnose. Bei einem auf den Ursprungsort begrenzten lokalisierten Tumor ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit 81% am höchsten (American Cancer Society, 2021b). Aufgrund fehlender Sarkomtypischer Symptome sowie der Rarität und des fehlenden Bewusstseins für diese Krebserkrankung werden Patienten oft verzögert zu einem Spezialisten überwiesen (Schütte et al., 2019, George and Grimer, 2012). Die Erkrankung ist somit häufig bereits fortgeschritten und das Sarkom in nahegelegene Strukturen oder Lymphknoten vorgedrungen. Dies führt zu einer deutlich verringerten 5-Jahres-Überlebensrate von 56%. Metastasen, die vorwiegend in der Lunge aber auch in der Leber und dem Peritoneum auftreten (Margaret von Mehren MD, 2018), reduzieren die 5-Jahres-Überlebensrate auf 15% (American Cancer Society, 2021b). Das *National Cancer Institute* gibt in seiner *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) Datenbank für Weichteilsarkome insgesamt eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 65% an, ein weit geringerer Wert als bei anderen häufigen Krebserkrankungen, beispielsweise der Prostata

mit knapp 98%, der Brust mit 90% oder der Haut (Melanom) mit knapp 93% 5-Jahres-Überleben (American Cancer Society, 2021b, National Cancer Institute, 2020). Das Robert Koch Institut führt für „*Krebs der Weichteilgewebe ohne Mesotheliom*“ (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021) eine noch geringere relative 5-Jahres-Überlebensrate von 54-60% auf und weist darauf hin, dass altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten für diese Erkrankung seit über 20 Jahren in Deutschland nahezu konstant sind. Folglich besteht weiterhin eine dringende Notwendigkeit für die Suche nach effektiveren Therapien. Mögliche therapeutische Zielmoleküle umfassen unter anderem abnormale, in die Sarkomgenese involvierte Proteine oder Proteine, die mit Apoptose oder Überlebenssignalwegen assoziiert sind.

### 1.2.3 Pathogenese und mögliche therapeutische Zielmoleküle

Um neue zielgerichtete Therapien entwickeln zu können, ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden genetischen und molekularen Veränderungen der Sarkome nötig. Analog zu anderen Krebsarten kann sowohl eine Aktivierung oder Überexpression von Onkogenen als auch eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Entstehung von Sarkomen führen. Basierend auf ihren genetischen Alterationen können Sarkome in verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

**Translokations-assoziierte** Sarkome machen ungefähr 20-30% aller Sarkome aus (Demicco et al., 2012). Aus Translokationen hervorgehende Fusionsproteine sind häufig Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsregulatoren. Die chromosomale Translokation t(X;18)(p11;q11) resultiert beispielsweise in einem SS18-SSX Fusionsgen in Synovialsarkomen. Das daraus hervorgehende Fusionsprotein führt als aberranter Transkriptionsregulator zu einer veränderten Genexpression (z.B. von IGF2 oder CD44) (Bakri et al., 2012, Naka et al., 2010, de Bruijn et al., 2006). Ein weiteres Beispiel für Fusionsprotein-getriggerte Malignome ist das Ewing Sarkom. Hier resultiert eine chromosomale Translokation in chimären Transkripten und Proteinen, die aus dem N-terminalen Teil des ubiquitär exprimierten Proteins EWS und dem C-terminalen Teil eines normalerweise streng kontrollierten Transkriptionsfaktors der Ets-Familie (85%

Fli1, 10% Erg) bestehen. EWS-Ets ist ein unphysiologischer und hoch exprimierter Transkriptionsfaktor, der zur Transformation der Zellen führt (Demicco et al., 2012, Jedlicka, 2010, Arvand and Denny, 2001). Eine Translokation kann auch in der Überexpression von Wachstumsfaktoren resultieren: Bei dem *Dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP) wird beispielsweise der Wachstumsfaktor PDGFB unter dem konstitutiv aktiven Promotor des COL1A1 (kodiert für einen Teil des Typ 1 Kollagens) überexprimiert (Demicco et al., 2012, Münchow, 2019).

In **Amplifikations-assoziierten** Sarkomen kann die Transformation der Zelle durch Überexpression von Protoonkogenen oder Inhibitoren von Tumorsuppressorproteinen erfolgen. In Sarkomen wurden Amplifikationen von Hdm2, einem Negativregulator des Tumorsuppressorproteins p53, und CDK4, welches den Zellzyklusregulator und Tumorsuppressor Rb1 inhibiert, bereits vor über 20 Jahren beschrieben (Berner et al., 1996). Eine neuere Studie zeigt zudem eine Korrelation hoher Amplifikationslevel von Hdm2, CDK4 und JUN mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben in Patienten mit dedifferenzierten Liposarkomen (Ricciotti et al., 2017). Zu den amplifizierten Protoonkogenen gehören unter anderem Mitglieder der Myc-Genfamilie. Myc-Amplifikationen wurden bereits in einigen Sarkomen, vor allem strahlungsinduzierten Sarkomen, gefunden (z.B. Angiosarkome) (Udager et al., 2016, Kacker et al., 2013).

Manche Sarkome werden hauptsächlich durch eine einzige aktivierende Genmutation angetrieben. Ein Großteil der Gastrointestinalen Stromatumore (GIST) weist beispielsweise aktivierende Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase KIT (> 80%) auf. Eine Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zeigte dabei sehr hohe Ansprechraten in Patienten mit KIT-Mutationen in Exon 11 (häufigste KIT-Mutation im GIST), was die Abhängigkeit dieser Tumore von dem konstitutiv aktiven KIT-Signalweg verdeutlicht (Heinrich et al., 2003, Corless et al., 2004).

Die größte Gruppe machen aber **Sarkome mit komplexen Karyotypen** aus. Hier kann die Entstehung des Sarkoms nicht auf eine bestimmte Mutation oder ein spezifisches Fusionsprotein zurückgeführt werden. Im Gegenteil

beherbergen diese Sarkome zahlreiche strukturelle und numerische chromosomale Aberrationen, die nach aktueller Auffassung aufgrund genomischer Instabilität entstehen. Diese Aberrationen beinhalten unter anderem die Amplifikation von Chromosomenarmen, wie beispielsweise des kurzen Arms des Chromosoms 5 (5p-Amplifikation) (Adamowicz et al., 2006), oder die Deletion von Chromosomenarmen, die für Tumorsuppressoren wie PTEN, p53 oder Rb1 kodieren (Taylor et al., 2011). Zudem entwickeln Sarkome mit komplexem Karyotyp häufig Mutationen in Proteinen, die mit Proliferation und Überleben assoziiert sind, was entweder zu einem Funktionsverlust (Tumorsuppressoren) oder Überexpression/konstitutiver Aktivierung (Protoonkogene) führt. Häufig sind unter anderem TP53, RAS (H-, K-, N-), BRAF, PTEN, RB1, BRCA2, PIK3CA und KIT mutiert (Movva et al., 2015, Münchow, 2019).

Basierend auf den zugrundeliegenden molekularen und histologischen Charakteristika des Sarkoms werden einige Patienten im Rahmen klinischer Studien mit zielgerichteter, epigenetischer oder Immuntherapie behandelt, um die Wirksamkeit dieser neueren Behandlungsstrategien in Sarkompatienten zu untersuchen und ein verbessertes Überleben zu erzielen. Aktuell werden beispielsweise epigenetische Therapiestrategien mit dem HDAC-Inhibitor Vorinostat (z.B. Phase 1 NCT04308330, Phase 1-2 NCT01879085) und Immuntherapien mit den Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab (anti-PD-1) (z.B. Phase 1-2 NCT03277924, Phase 1-2 NCT03138161, Phase 2 NCT03886311, Phase 2 NCT03219671, Phase 2 NCT03590210), Ipilimumab (anti-CTLA-4) (z.B. Phase 1-2 NCT03138161, Phase 2 NCT03219671) und Pembrolizumab (anti-PD-1) (z.B. Phase 1-2 NCT03123276, Phase 1-2 NCT03338959, Phase 2 NCT03092323) eingesetzt. Die Wirkungsweise zielgerichteter Therapien legt ein Ansprechen vor allem von Sarkomen mit definierten Translokationen oder spezifischen überexprimierten/aktivierten Kinasen nahe. Dennoch waren zielgerichtete Therapien bisher in nur wenigen Fällen effektiv. Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zeigte beispielsweise anti-Tumor Effekte in Patienten mit PDGFB überexprimierenden *Dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP) (Rutkowski et al., 2011) sowie bei Gastrointestinalen Stromatumoren

(GIST) mit aktivierenden KIT-Mutationen in Exon 11, bei denen im Verlauf jedoch häufig sekundäre Resistenzen durch zusätzliche KIT- oder PDGFRA-Mutationen auftreten (Antonescu et al., 2005). Neben dem Fusionsprotein bzw. überexprimierten/aktivierten Protein selbst können auch im Signalweg nachgeschaltete (*downstream* gelegene) Faktoren, deren Expression aufgrund dieser Genveränderungen erhöht ist, als Zielmoleküle der zielgerichteten Therapie dienen. Das Fusionsprotein SS18-SSX in Synovialsarkomen scheint beispielsweise die Expression des Wachstumsfaktors FGF (*fibroblast growth factor*) und des FGF-Rezeptors (FGFR) zu verstärken und so die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK Signalwegs zu bewirken. Präklinische Studien zeigen *in vitro* und *in vivo* eine Reduktion des Sarkomwachstums bei FGFR-Inhibition (Ishibe et al., 2005, Garcia et al., 2012).

Neben den Wachstumssignalwegen können auch Alterationen in Zellüberleben und Stressantworten als Angriffspunkte von Therapien dienen. Der Tumorsuppressor p53 ist häufig durch Mutationen oder Überexpression von Hdm2 inaktiviert und die Einleitung der Apoptose verhindert. Zelltod kann zudem durch eine Dysbalance pro- und anti-apoptotischer Faktoren verhindert werden, beispielsweise durch Überexpression anti-apoptotisch wirkender Proteine der Bcl-2 Familie. Die Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine wird in bis zu 60% der Sarkome gefunden (Demicco et al., 2012). Dieser anti-apoptotische Status vieler Sarkome kann für das Versagen von Therapien verantwortlich sein und damit einen möglichen Angriffspunkt neuer Behandlungsstrategien darstellen (Münchow, 2019).

## **1.3 Apoptose**

### **1.3.1 Biologische Bedeutung und Grundlagen**

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, über den nicht mehr benötigte oder für den Organismus schädliche Zellen entfernt werden. Im Gegensatz zur Nekrose, einem pathologischen Prozess bei dem Zellen anschwellen, platzen und zu einer inflammatorischen Reaktion führen (Rock and Kono, 2008, Akhtar F, 2020), kommt die Apoptose häufig physiologisch vor. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese, der fortwährenden

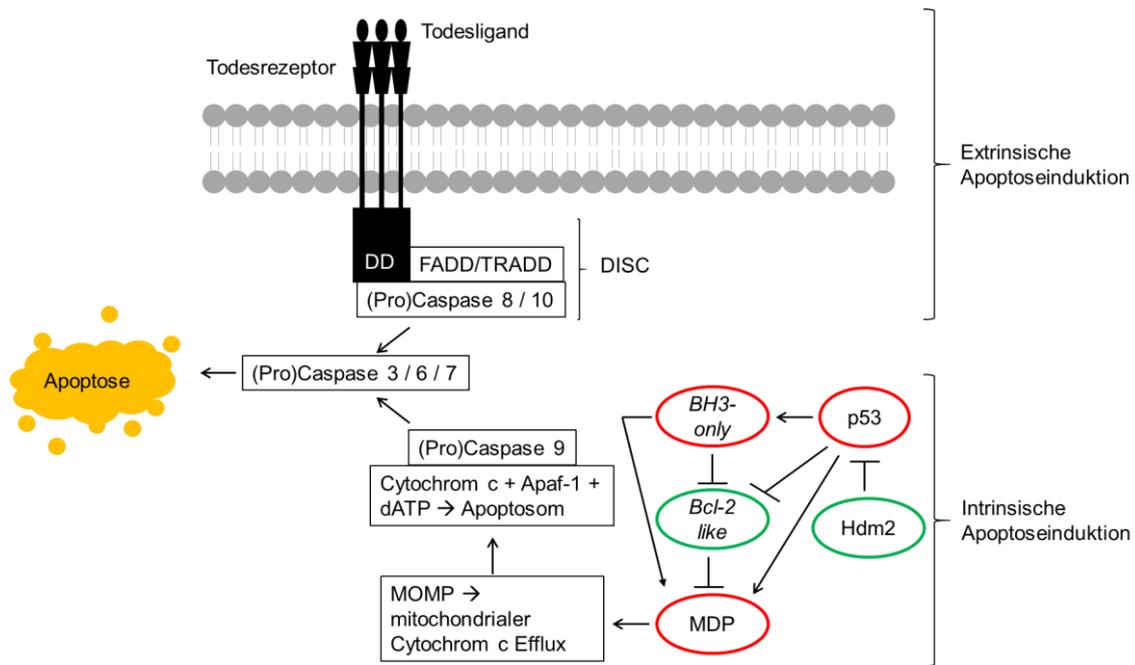
Erneuerung von Geweben sowie der Elimination autoreaktiver Lymphozyten, virus- oder bakterieninfizierter Zellen und Zellen mit irreparablen DNA-Schäden (Akhtar F, 2020). Im Erwachsenen sterben täglich etwa  $10^{11}$  Zellen (Gilbert, 2000). Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Absterben der Zellen kann zu schwerwiegenden Erkrankungen des Organismus führen. Aufgrund verminderter Apoptose können einerseits Autoimmunerkrankungen (Überleben autoreaktiver Immunzellen) andererseits Tumore (Überleben bösartig veränderter Zellen) entstehen (Akhtar F, 2020).

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu typischen morphologischen und molekularen Veränderungen. Dazu zählen das Abrunden und Schrumpfen der Zelle, Verlust der Zell-Zell-Kontakte, Chromatinkondensierung (Karyopyknose), DNA-Fragmentierung (Karyorrhexis), Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche und Zerfall der apoptotischen Zelle in kleinere membranbegrenzte Fragmente, sogenannte *apoptotic bodies*, die von Makrophagen beseitigt werden (Efferozytose). Da die Zellmembranen weitgehend intakt bleiben, erfolgt dieser Prozess meist ohne ausgeprägte Entzündungsreaktion (Akhtar F, 2020, Kroemer et al., 2009, Lüllmann-Rauch, 2009, Pistritto et al., 2016). Die wichtigsten Effektorproteasen der Apoptose sind die Caspasen, eine Gruppe von Cysteinproteasen. Caspasen werden als inaktive Proenzyme exprimiert (Procaspasen). Im Rahmen der Apoptose unterscheidet man die Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9, 10), die durch autokatalytische Spaltung aktiviert werden, von den Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), die von Initiatorcaspasen gespalten und aktiviert werden. Bei der Aktivierung wird die Prodomäne abgespalten und die große und kleine Untereinheit werden voneinander getrennt. Aktive Effektorcaspasen bestehen aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten und spalten eine Vielzahl von Zielmolekülen (Julien and Wells, 2017), z.B. Struktur-/Regulatorproteine, wodurch sie letztendlich den Zelltod mit den typischen Merkmalen der Apoptose herbeiführen (Pistritto et al., 2016, Bao and Shi, 2007, Fulda and Debatin, 2006). Substrate der Caspasen sind beispielsweise Hdm2, PARP, Rb, Bcl-2, Lamin A, Lamin B und Actin (Nicholson, 1999). Für die Aktivierung der Apoptose sind hauptsächlich zwei

Signalwege beschrieben: der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg.

### 1.3.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg

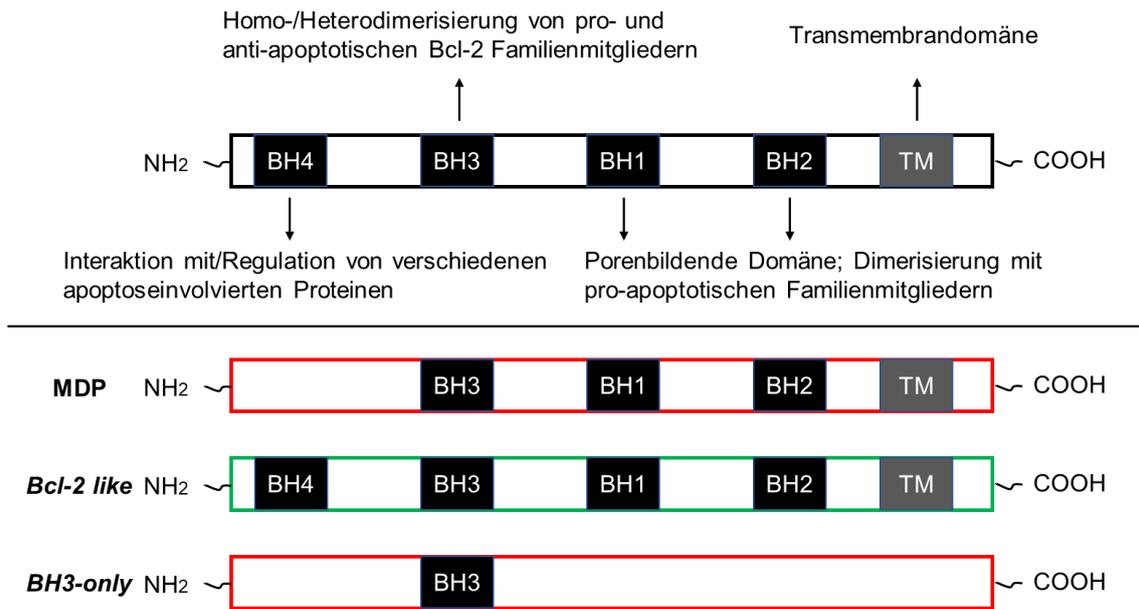
Charakteristisch für die extrinsische Apoptoseinduktion ist die Aktivierung von Todesrezeptoren, die in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind. Die Bindung von Todesliganden, wie FasL/CD95L (*Cluster of differentiation 95 Ligand*), TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) bzw. TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), führt zur Oligomerisierung und Aktivierung der korrespondierenden Todesrezeptoren FasR/CD95/Apo-1 (*apoptosis antigen 1*), TNF $\alpha$  Rezeptor 1 bzw. TRAIL Rezeptor 1-2. Durch eine Konformationsänderung des Rezeptors wird die ca. 80 Aminosäuren lange zytoplasmatische Todesdomäne (*death domain, DD*) exponiert, was die Bildung eines Multiproteinkomplexes erlaubt. Dieser Komplex wird von regulatorischen Faktoren und Adapterproteinen (z.B. *Fas-associating death domain-containing protein* FADD/*Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein* TRADD) gebildet, die wiederum die Initiatorcaspasen Procaspasen 8 und 10 rekrutieren. Der resultierende Proteinkomplex wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet und dieser Komplex reguliert die Aktivierung der Procaspasen 8 und 10 (Pistritto et al., 2016, Galluzzi et al., 2012). Die aktiven Initiatorcaspasen spalten und aktivieren dann die im weiteren Verlauf für die terminalen apoptotischen Veränderungen verantwortlichen Effektorcaspasen (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1 | Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg.** Pro-apoptotische Faktoren sind rot, anti-apoptotische Faktoren grün umrandet. *BH3-only* Proteine umfassen Noxa, Puma, Bim, Bid, Bad; *Bcl-2 like* Proteine umfassen Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w; MDP Proteine umfassen Bax, Bak, Bok. Apaf-1: *apoptotic protease activating factor 1*, DD: Todesdomäne (*death domain*), DISC: *death-inducing signaling complex*, FADD: *Fas-associating death domain-containing protein*, MDP: *multi-domain protein*, MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*, TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein* [modifiziert nach (Münchow, 2019)]

### 1.3.3 Intrinsischer Apoptosesignalweg

Der intrinsische (mitochondriale) Apoptosesignalweg wird infolge irreparabler intrazellulärer Schäden bzw. übermäßigem zellulären Stress initiiert. Beispiele hierfür sind DNA-Schäden, Expression von Onkoproteinen und onkogene Dysregulation, oxidativer Stress, Hypoxie und Entzug von Wachstumsfaktoren oder Überlebenssignalen. Charakteristisch für die intrinsische Apoptoseinduktion ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) (Pedley and Gilmore, 2016). MOMP wird durch pro- und anti-apoptotische Faktoren insbesondere der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) Proteinfamilie streng kontrolliert. Die Bcl-2 Proteinfamilie wird in drei Subgruppen unterteilt, die sich in ihrer Funktion (pro-/anti-apoptotisch) und Struktur bzw. der An- oder Abwesenheit von BH-Domänen (*Bcl-2 homology*) unterscheiden (Abb. 2) (Pedley and Gilmore, 2016, Pistritto et al., 2016).



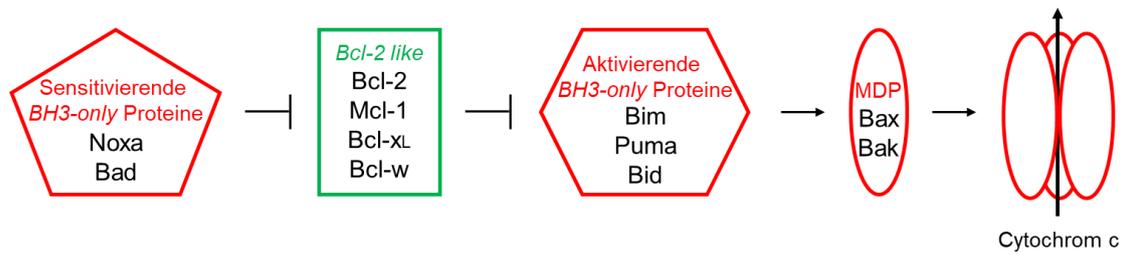
**Abbildung 2 | Bcl-2 Proteinfamilie.** Die Funktionen der verschiedenen BH-Domänen sind angegeben. Es werden drei Subgruppen (MDP, *Bcl-2 like* und *BH3-only*) unterschieden. Dargestellt ist die Zusammensetzung typischer BH-Domänen für repräsentative Proteine der jeweiligen Subgruppe. Rot indiziert pro-apoptotische Proteine, grün anti-apoptotische. MDP: *multi-domain protein* [modifiziert nach (Pistritto et al., 2016)]

Bax und Bak zählen zu den pro-apoptotischen Effektorproteinen (*multi-domain proteins*, MDPs), die nach Aktivierung durch Konformationsänderung und Oligomerisierung Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden und damit den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum bewirken. Die MDPs unterscheiden sich in ihrer Lokalisation in gesunden Zellen und ihrer bevorzugten Bindung anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine. Während Bak im inaktiven Zustand bereits an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, ist Bax überwiegend zytosolisch lokalisiert und transloziert im Verlauf der Apoptose an das Mitochondrium (Westphal et al., 2011, Kale et al., 2018).

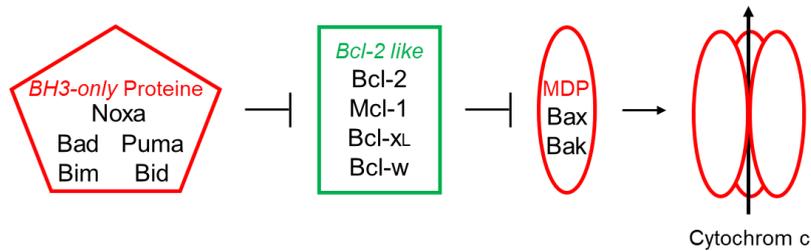
Der pro-apoptotischen Aktivität von Bax und Bak wirken die anti-apoptotisch wirkenden Proteine der *Bcl-2 like* Gruppe (z.B. Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w) entgegen. Bax wird vorwiegend von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w inhibiert, Bak bevorzugt von Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Ku et al., 2011, Fletcher et al., 2008). Die dritte Subgruppe der Bcl-2 Proteinfamilie sind *BH3-only* Proteine. Zu dieser Gruppe gehören die Proteine Bad, Bid, Bik, Bim,

Noxa und Puma. *BH3-only* Proteine wirken als intrazelluläre Stresssensoren mit pro-apoptotischer Funktion. Es gibt unterschiedliche Modelle, wie *BH3-only* Proteine den apoptotischen Zelltod positiv beeinflussen. Eines der Modelle besagt, dass *BH3-only* Proteine einerseits als Aktivatoren andererseits als Sensibilisatoren agieren können (*direct activation model*). Aktivierende *BH3-only* Proteine können direkt transient an Bax und Bak binden und deren Oligomerisierung mit nachfolgender MOMP induzieren. Anti-apoptotische *Bcl-2 like* Proteine verhindern diese Aktivierung der MDPs wiederum durch Bindung der aktivierenden *BH3-only* Proteine. Sensitivierende *BH3-only* Proteine binden an anti-apoptotische *Bcl-2 like* Proteine und setzen hierdurch aktivierende *BH3-only* Proteine aus der inhibierenden Bindung frei, so dass diese wiederum die Aktivierung der MDPs hervorrufen (siehe Abb. 3). In einem alternativen Modell wird eine Oligomerisierung von Bax und Bak durch direkte Bindung an anti-apoptotische Proteine verhindert. Diese Interaktion von MDPs mit anti-apoptotischen *Bcl-2 like* Proteinen kann wiederum durch *BH3-only* Proteine gestört werden, sodass Bax und Bak aus der Bindung verdrängt und damit aktiviert werden (*derepression/displacement model*) (siehe Abb. 3) (Pedley and Gilmore, 2016, Shamas-Din et al., 2011). Beide Theorien beschreiben *BH3-only* Proteine als pro-apoptotische Faktoren mit inhibitorischer Wirkung auf anti-apoptotische Proteine. Dies wird in zahlreichen Publikationen, die z.B. eine Inaktivierung von Mcl-1 durch Noxa zeigen, bestätigt (Nakajima et al., 2014, Gomez-Bougie et al., 2007).

**Modell 1: Direct activation model**



**Modell 2: Derepression/displacement model**



**Abbildung 3 | Alternative Modelle der BH3-only Protein vermittelten Apoptoseinduktion.** Pro-apoptotische Faktoren sind rot dargestellt, anti-apoptotische Faktoren sind grün dargestellt. Pfeile repräsentieren aktivierende und Balken blockierende Wirkung. MDP: *multi-domain protein* [modifiziert nach (Pedley and Gilmore, 2016, Shamas-Din et al., 2011)]

Ein weniger gut untersuchtes MDP ist das Protein *Bcl-2 ovarian killer* (Bok). Wie Bax und Bak kann es durch Oligomerisierung MOMP herbeiführen (Einsele-Scholz et al., 2016, Llambi et al., 2016). Bok ist infolge intrinsischer struktureller Instabilität bzw. Metastabilität und spontaner Konformationsänderung konstitutiv aktiv (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018). Die Regulation der Bok-vermittelten Apoptose ist nicht abschließend geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Obwohl die Interaktion bestimmter anti-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder (z.B. Mcl-1) mit Bok wiederholt gezeigt wurde (Hsu et al., 1997, Stehle et al., 2018) schlagen Llambi et al. (Llambi et al., 2016) die Regulation von Bok durch proteasomalen Abbau vor und beschreiben die Akkumulation von Bok infolge Inhibition des Proteasoms (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018).

Die Balance, Lokalisation und Interaktion der pro- und anti-apoptotischen Proteine bestimmen, wie empfänglich eine Zelle für Apoptose ist. Diese Empfänglichkeit/Prädisposition bezeichnet man als *mitochondrial priming* bzw. *apoptotic priming*. Sind beispielsweise anti-apoptotische Proteine überexprimiert

und vermehrt in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert oder werden vermindert pro-apoptotische Faktoren exprimiert, dann ist die Zelle weniger empfänglich/empfindlich gegenüber apoptosefördernder Stimuli. Im Gegensatz dazu führt eine verminderte Expression anti-apoptotischer Proteine sowie eine erhöhte Expression und mitochondrielle Lokalisation pro-apoptotischer Faktoren zu einer gesteigerten Empfindlichkeit für Apoptosesignale (Pedley and Gilmore, 2016, Potter and Letai, 2016). Krebszellen sind häufig wenig anfällig für bestimmte pro-apoptotische Stimuli. Ursächlich sind z.B. Mutationen oder genetische Alterationen in Genen, die in den intrinsischen Apoptoseweg involviert sind. Ein prototypisches Beispiel ist die Überexpression von Bcl-2 oder anderer anti-apoptotischer Proteine, was in erhöhter Behandlungsresistenz resultiert (Frenzel et al., 2009, Münchow, 2019).

Wenn pro-apoptotische Faktoren überwiegen, dann kommt es zur Oligomerisierung der MDPs mit nachfolgendem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und MOMP. Durch die Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran können Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma austreten. Eines dieser Proteine ist Cytochrom c. Zusammen mit dem zytoplasmatischen Protein Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor 1*) und dATP bildet Cytochrom c eine multimere Plattform, das Apoptosom. Die Rekrutierung der Initiatorcaspase Procaspase 9 bedingt die autokatalytische Aktivierung und aktive Caspase 9 spaltet und aktiviert wiederum die Effektorprocaspase 3 und 7 (Fulda and Debatin, 2006, Bao and Shi, 2007, Kroemer et al., 2007, Srinivasula et al., 1998).

Die Signalkaskaden der extrinsischen und intrinsischen Apoptose sind miteinander verknüpft (*cross-talk*). Zu den Substraten der Initiatorcaspase 8 zählt das *BH3-only* Protein Bid. Das gespaltene Fragment tBid (*truncated Bid*) wirkt als aktives *BH3-only* Protein, transloziert an das Mitochondrium und induziert schlussendlich Cytochrom c Efflux (Galluzzi et al., 2012, Pistritto et al., 2016, Li et al., 1998, Luo et al., 1998). Im Fall der mitochondrial vermittelten intrinsischen Apoptose kann der zelluläre Stresssensor p53 die Transkription der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL Rezeptor 2 positiv regulieren (Johnstone et al., 2002). Auch kann Caspase 6 die Caspase 8 spalten und aktivieren (Cowling

and Downward, 2002). Solche Verbindungen zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg sind selbstverstärkende Rückkopplungsschleifen (*Feedbackloop*) und potenzieren die Caspaseaktivierung und nachfolgend die Apoptose.

#### **1.4 Medikamente zur Tumortherapie**

Die EMA und FDA haben bereits zahlreiche Medikamente für die Behandlung verschiedener Krebsarten zugelassen und weitere werden momentan noch in klinischen Studien getestet. Ziel der Krebsmedikamente ist es, entweder die Krebszellen zu töten oder ihre Proliferation und Ausbreitung zu stoppen. Allerdings bewirkt die Plastizität und Redundanz vieler Signalwege häufig eine Behandlungsresistenz gegenüber Monotherapien durch Regulation kompensatorischer Signalwege (Dent et al., 2009). Daher werden vermehrt synergistisch wirkende Arzneimittelkombinationen aus zwei oder mehr Medikamenten gesucht (Laporte et al., 2017, Radic-Sarikas et al., 2017, Münchow, 2019). Synergismus beschreibt eine überadditive Wirkung, also eine Verstärkung der Effizienz von Medikamenten, wenn sie in Kombination eingenommen werden. Die gewünschte Wirkung wird schon bei Kombination geringerer Medikamentendosen als bei additiver Wirkung erreicht. Vielversprechend sind vor allem Arzneimittelkombinationen, die verschiedene Komponenten desselben Signalweges angreifen (serielle Kombinationen) oder verwandte Signalwege (parallele Kombinationen) manipulieren, z.B. wenn zwei Medikamente Überlebenssignalwege oder anti-apoptotische Proteine angreifen (Yin et al., 2014). Ein Synergismus kann dann beispielsweise auf einer direkten Inhibition des für die Resistenz verantwortlichen Mechanismus oder einer verstärkten Stressapplikation auf die zugrundeliegende Resistenzmaschinerie beruhen (Dent et al., 2009, Yin et al., 2014).

##### **1.4.1 Bortezomib**

Bortezomib (Velcade) ist ein Wirkstoff, der die proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms reversibel inhibiert. Proteasomen sind ubiquitär exprimierte Multiproteinkomplexe mit multikatalytischer Proteaseaktivität. Proteasomen degradieren überflüssige und missgefaltete Proteine und spielen daher eine

wichtige Rolle in der Proteinhomöostase. Die Inhibition dieser zielgerichteten Proteolyse resultiert in Zellzyklusarrest und über die Stabilisierung proapoptischer Faktoren in Apoptose (Rajkumar et al., 2005, Milano et al., 2007). So wird nach Proteasominhibition die Akkumulation des *BH3-only* Proteins Noxa sowie des MDPs Bok beobachtet (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018, Gomez-Bougie et al., 2007, Rizzatti et al., 2008). Bortezomib ist als Monotherapie oder in Kombination mit Doxorubicin, Dexamethason, Melphalan, Prednison, Thalidomid, Rituximab oder Cyclophosphamid für die Therapie von Patienten mit Multiplem Myelom und Mantelzell-Lymphom zugelassen (Ratiopharm, 2019). Die Wirksamkeit von Bortezomib wurde bereits in Sarkompatienten getestet. In einer Phase 2 Studie zeigte eine Bortezomib-Monotherapie lediglich minimale Wirkung bei der Therapie fortgeschrittener Sarkome (NCT00027716) (Maki et al., 2005). Auch in Kombination mit Vorinostat konnte in einer Phase 2 Studie kein Ansprechen bei Patienten mit fortgeschrittenen Weichteilsarkomen erzielt werden (NCT00937495) (Attia et al., 2011). Die Kombinationstherapie Bortezomib&Dacarbazin resultierte in lediglich einem von 12 Sarkompatienten in einem partiellen Ansprechen (Phase 1 NCT00580320) (Poklepovic et al., 2013)

#### 1.4.2 BH3-Mimetika

Eine relativ neue Klasse zielgerichteter Therapeutika sind BH3-Mimetika, welche die Wirkung von *BH3-only* Proteinen imitieren. BH3-Mimetika binden in die hydrophobe Furche anti-apoptotischer *Bcl-2 like* Proteine, die normalerweise die BH3-Domänen pro-apoptotischer Proteine bindet. Die nun blockierte hydrophobe Furche steht nicht mehr für die Inhibition von MDPs bzw. Inaktivierung von Aktivator *BH3-only* Proteinen zur Verfügung, so dass MDPs die äußere Mitochondrienmembran permeabilisieren (Nakajima and Tanaka, 2016, Roberts and Huang, 2017).

Das erste Bcl-2-selektive potente BH3-Mimetikum ist Venetoclax (Venclyxto). Venetoclax ist als Monotherapie oder in Kombination mit Obinutuzumab oder Rituximab für die Behandlung von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) zugelassen (European Medicines Agency, 2020). Bisherige

Untersuchungen weisen auf eine geringe Wirkung bzw. Inaktivität einer Venetoclax-Monotherapie in Ewing Sarkomen, Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen und Synovialsarkomen hin (Oncologic drugs advisory committee, 2016, Barrott et al., 2017). Kürzlich wurde eine synergistische Wirkung von Venetoclax mit dem Mcl-1-Inhibitor S63845 in Synovialsarkomen beschrieben (Fairchild et al., 2020). In weiteren Krebsentitäten, z.B. akute lymphoblastische Leukämie (ALL) (Benito et al., 2015), Multiples Myelom (Touzeau et al., 2014) oder Neuroblastom (Bate-Eya et al., 2016), wurde eine erfolgreiche Apoptoseinduktion durch Venetoclax nachgewiesen. Zahlreiche Studien untersuchen die klinische Effektivität der Mono- oder Kombinationsbehandlung mit Venetoclax bei hämatologischen und soliden Krebserkrankungen (Phase 2 NCT03466294, Phase 1/2 NCT04330820, Phase 2 NCT03552692, Phase 1 NCT04274907, Phase 1 NCT03900884, Phase 1 NCT03672695).

Weitere BH3-Mimetika sind der selektive Mcl-1-Inhibitor A-1210477 und der selektive Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463. Beide Inhibitoren werden bisher ausschließlich präklinisch getestet und sind nicht in klinischer Anwendung. Es liegen kaum präklinischen Daten zu der Verwendung dieser Inhibitoren in Sarkomen vor. Allerdings wurden andere Mcl-1- und Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitoren bereits in Sarkomen getestet. In Rhabdomyosarkomen wurde beispielsweise eine synergistische Wirkung von Vincristin mit dem Mcl-1-Inhibitor S63845 und von Doxorubicin mit S63845 sowie dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1331852 nachgewiesen (Alcon et al., 2020). Eine Studie in Chondrosarkomen zeigte eine Sensitivierung mancher Zelllinien gegenüber Doxorubicin oder Cisplatin durch den Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor WEHI-539 sowie eine Reduktion des Tumorwachstums durch eine Behandlung mit A-1155463 in einem Ratten-Modell (de Jong et al., 2018). Auch in Osteosarkomen konnte WEHI-539 die Wirksamkeit von Doxorubicin erhöhen (Baranski et al., 2015).

### **1.5 Notwendigkeit der Arbeit und Zielsetzung**

Trotz fortlaufender Forschung konnte bisher kein Durchbruch bei der Behandlung von Sarkomen erzielt werden, sodass fortgeschrittene Sarkome nach wie vor mit

einer schlechten Prognose assoziiert sind. Folglich werden dringend neue Behandlungsmöglichkeiten benötigt, um die 5-Jahres-Überlebensrate und das mediane Gesamtüberleben zu verbessern. In Vorarbeiten wurde die synergistische Reduktion vitaler Zellen durch Venetoclax und Bortezomib nachgewiesen (Münchow, 2019, Muenchow et al., 2020). Aufbauend hierauf war Ziel dieser Arbeit, den Mechanismus der synergistischen Wirkung von Venetoclax und Bortezomib sowie die Relevanz spezifischer Bcl-2 Familienproteine für diesen Mechanismus zu untersuchen, um ein näheres Verständnis des Zusammenwirkens dieser Medikamente zu erlangen. Dies könnte die Translation der Medikamentenkombination in die klinische Anwendung erleichtern und zur Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von Sarkompatienten beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- a) Ist die synergistische Apoptoseinduktion spezifisch für Bortezomib und eine Bcl-2-Inhibition oder stellen Kombinationen von Bortezomib mit anderen BH3-Mimetika, die Mcl-1 bzw. Bcl-x<sub>L</sub> inhibieren, präklinisch ebenfalls vielversprechende Ansätze in der Sarkomtherapie dar?
- b) Welche Auswirkung hat eine Inkubation mit Venetoclax, Bortezomib und deren Kombination auf die Akkumulation und mitochondriale Oligomerisierung der MDPs Bax, Bak und Bok in Sarkomzelllinien?
- c) Welche Auswirkung hat die Inkubation mit Venetoclax, Bortezomib und deren Kombination auf die Expression pro- und anti-apoptotisch wirkender Bcl-2 Proteine?
- d) Welchen Einfluss hat der spezifische Verlust der MDPs auf die Wirksamkeit von Venetoclax und Bortezomib? Hierfür sollte einerseits die Proteinexpression pro- und anti-apoptotischer Faktoren andererseits die Effektivität der Apoptoseinduktion in mittels CRISPR/Cas9 generierter Bax, Bak und Bok *knock-out* Zellen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

**Tabelle 2 | Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Lieferant</b>
Amersham Protran 0,1 µm NC	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Cell Culture Dishes, PS, 100x20 mm Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
EVE Cell Counting Slide NanoEnTek	VWR, Darmstadt
5 ml FACS-Röhrchen, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Gelloader Pipette Tips REF 70.1190.100 1-200 µl	Sarstedt AB & Co. KG, Nümbrecht
Menzel-Gläser Deckgläser	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA / Carl Roth, Karlsruhe
Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Precision Pipette Tips, BioClean, Pipette Tips in StableRak 1000 µl, 200 µl, 10/20 µl	Rainin, Gießen
Purple Nitrile* Gloves	Kimtech Science Brand, Kimberly- Clark GmbH, Koblenz
Rotilabo-Spritzenfilter, CA, steril, 0,20 µm Porengröße	Roth, Karlsruhe
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Spritze 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Stripette Disposable Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated costar, Corning, NY, USA
T75, T175 Cell Culture Flasks Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tube 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Vasco Nitril blue	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
6, 12, 96 Well Cell Culture Plate Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

**Tabelle 3 | Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Lieferant</b>
Acrylamide-Solution (40%) Mix 29:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
BD CS&T Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSTFlow	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat $\geq 99\%$ , p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Color Protein Standard Broad Range	New England BioLabs <sup>Inc.</sup> , Frankfurt am Main
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma Life Science, Steinheim
Glycine	Merck, Darmstadt
Hoechst 34580	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
KCl	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Ponceau S solution	Sigma Life Science, Steinheim
2-Propanol 70% (V/V)	Braun, Melsungen
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Roti-Histofix 4% (phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4%)	Roth, Karlsruhe
Roti-Stock 20% SDS	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Tricine	Sigma Life Science, Steinheim
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton x-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
50% Tween-20	Merck, Darmstadt
Whatman Gel Blot Paper	GE Healthcare Life Science, Freiburg

### 2.1.3 Zellkultur

Als Versuchszelllinien dienten drei humane Sarkomzelllinien (Tabelle 4) sowie drei *knock-out* Zelllinien, welche aus SW982/wt per CRISPR/Cas9 generiert wurden.

**Tabelle 4 | Verwendete Zelllinien.** Neben der Art und Herkunft der Sarkome sind auch bekannte genetische Auffälligkeiten und die ATCC Nummer angegeben. (Hom.: Homozygot, Het.: Heterozygot, p.: Referenzsequenz des Proteins wird verwendet, p.0: das Protein wird nicht hergestellt (den Dunnen and Antonarakis, 2000)) \* kein Anspruch auf Vollständigkeit [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020, Münchow, 2019)]

Zelllinie	Ursprung	Karyotyp	Bekannte Mutationen*	ATCC Nr.	Literatur
SW982	Synovialsarkom (Synovium)	hyperdiploid	BRAF p.V600E Het. CDKN2A p.0? Hom.	HTB-93	(ATCC, 2013) (ATCC, 2016c)
RH30/RD	Rhabdomyosarkom (quergestreifter Muskel)	instabil	NRAS p.Q61H Hom. TP53 p.R248W Hom.	CCL-136	(ATCC, 2013) (ATCC, 2016a)
SK-LMS-1	Leiomyosarkom (Vulva)	aneuploid	TP53 p.G245S Het.	HTB-88	(ATCC, 2013) (ATCC, 2016b)

In Tabelle 5 sind die im Rahmen der Zellkultur verwendeten Materialien gelistet.

**Tabelle 5 | Materialien für die Zellkultur**

Zellkultur	Lieferant
Aqua	B. Braun, Melsungen
DMEM (1x) REF 42430-025	Gibco Life Technologies Limited, Paisley, UK
Fetal Bovine Serum	Sigma Life Science, Steinheim
HEPES Pufferan ≥ 99,5%, p.a.	Roth, Karlsruhe
L-Asparagine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

L-Glutamine 200 mM	Biochrom GmbH, Berlin
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Non-essential amino acids (NEA) (100x)	Biochrom GmbH, Berlin
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA
Sodium Pyruvate 100 mM (100x)	Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA
0,05% Trypsin-EDTA (1x)	Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA

#### 2.1.4 Zellviabilität

Tabelle 6 zeigt die für die Bestimmung der Zellviabilität verwendeten Färbemittel.

**Tabelle 6 | Materialien zur Vitalitätsbestimmung**

Zellviabilität	Lieferant
Annexin V APC Lot 490257	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Tetramethylrhodamine methyl ester	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA
Trypan blue stain 0,4% NanoEnTek	VWR, Darmstadt

#### 2.1.5 Antikörper

Im Rahmen des Western Blots und der Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Tabelle 7 gelisteten Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

**Tabelle 7 | Verwendete Antikörper**

Antikörper Anti-	Produkt-Nr.	Herkunft	Verdünnung	Lieferant
Bak, NT, Lot 2776761	06-536	Kaninchen	1:250 (IF)	EMD Millipore Corp, Billerica, MA, USA
Bak Ab, Lot 3	3814S	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Bax (N-terminus), Lot 2383991	ABC11	Kaninchen	1:500 (IF)	Millipore, Temecula, CA, USA
Bax (N-terminus), Lot 2464998	ABC11	Kaninchen	1:500 (IF)	Millipore, Temecula, CA, USA

Bax Ab, Lot 10	2772S	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Bcl-2 (124) mAb, Lot 1	15071S	Maus	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Bcl-x <sub>L</sub> Ab, Lot 7	2762S	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
BD Transduction Laboratories Purified Anti-Tom20, Lot 9204806	612278	Maus	1:250 (IF)	BD Biosciences, Heidelberg
Bok, mAb [EPR15331], Lot GR3198297-5	ab186745	Kaninchen	1:500 (WB) 1:250 (IF)	Abcam, Cambridge, UK
GAPDH (14C10) Lot 10	2118S	Kaninchen	1:5000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Mcl-1 (D35A5) mAb, Lot 4	5453S	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Noxa mAb, Lot 2682543	OP180-100UG	Maus	1:500 (WB) 1:250 (IF)	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H+L), Lot 1984052	A-21441	Huhn	1:500 (IF)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Lot 33	7076S	Pferd	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Lot 28	7074S	Ziege	1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-mouse DyLight 649 115-495-146	/	Ziege	1:250 (IF)	Abcam, Cambridge, UK

## 2.1.6 Inhibitoren/Stressoren

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Inhibitoren/Stressoren verwendet.

<b>Inhibitor/Stressor</b>	<b>Lieferant</b>
DMSO	Merck, Darmstadt
Q-VD-Oph	Selleckchem, München

**Tabelle 8 | Verwendete Inhibitoren und Stressoren**

<b>INN IUPAC</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Zielmolekül</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Katalog-Nr.</b>	<b>Lieferant</b>
Venetoclax Abt-199	Venclexta (US), Venclyxto (EU)	Bcl-2	DMSO	S8048	Selleckchem, München
Bortezomib PS-341	Velcade	Proteasom	DMSO	S1013	Absource Diagnostics GmbH, München
A-1210477	/	Mcl-1	DMSO	S7790	Selleckchem, München
A-1155463	/	Bcl-x <sub>L</sub>	DMSO	S7800	Selleckchem, München

## 2.1.7 Geräte

Tabelle 9 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

**Tabelle 9 | Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Gerätename</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem	Integra Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Autoklav	TOMY SX-700E Varioklav Typ 500	TOMY Digital Biology Co., LTD., Tokyo, Japan H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim bei München
Blotter Brutschrank	Biometra Fastblot B44 Seriennummer: CB150#04-73042 Seriennummer: CB150#12-12677	Biometra GmbH, Göttingen Binder GmbH, Tuttlingen Binder GmbH, Tuttlingen
Durchflusszytometer	BD FACS Lyric	BD Biosciences, Heidelberg
Gelkammer	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

Heizblock	DRI-BLOCK DB-2A	Techne, Staffordshire, UK
Kamera	X Stella raytest LAS 1000 Stella chemiluminescent CCD camera	Medical Systems, Stamford, CT, USA
Magnetrührer	IKA RET basic safety control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop	Leica DM IL LED  Leica TCS SP8	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
pH-Meter	Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Plattenleser	EnSpire Multimode Plate Reader	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA
Pipette	Pipetboy acu  Pipet-Lite XLS	Integra Biosciences GmbH, Biebertal Rainin, Gießen
Rollenmischer	RM5 Assistent 348  RS-TR05	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön Phoenix Instrument, Garbsen
Sterilbank	Sterilbank	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Stromgerät	Electrophoresis Power Supply peqlab EV231 Power PAC 1000  Power PAC 200	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Ultraschallgerät	Bioruptor UCD-200	Diagenode Inc. USA, Denville, NJ, USA
Vortexer	LSE Vortex Mixer  Reax top	Corning Inc., Corning, NY, USA Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waagen	XS4002S DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Wippschüttler	GFL 3013 GFL 3014	GFL, Burgwedel GFL, Burgwedel
Wasseraufbereitung	Milli-Q Integral 10	Millipore, Temecula, CA, USA
Wasserbad	ED Einhängethermostat Lauda 012T	Julabo GmbH, Seelbach Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen

Zellzähler	EVE Automatic Cell Counter NanoEnTek	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D Centrifuge 5417C Rotina 35R	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Corning LSE Mini Microcentrifuge 6766/C1501EU	Corning Incorporated costar, Corning, NY, USA

### 2.1.8 Software

Für die Auswertung und Darstellung der Daten sowie das Zusammenstellen dieser Arbeit wurden folgende Softwareprogramme verwendet (Tabelle 10).

**Tabelle 10 | Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Anbieter</b>
Adobe Photoshop CS6	Adobe Inc., California, USA
Advanced Image Data Analyzer Version 4.50.010, Dec. 22, 2010	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
BD FACSuite Research Software	BD Biosciences, California, USA
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, Inc., California, USA
Leica Application Suite X 3.5.5.19976	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
Microsoft Excel 2016	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Powerpoint 2016	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Washington, USA
X Stella Software Version 2.1.3.271, Dec. 6 2012	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Sarkomzelllinien

Alle Sarkomzelllinien wurden in DMEM + 10% FCS + 5% AddR bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin-EDTA von der Plastikoberfläche abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit supplementiertem DMEM gestoppt und der gewünschte Teil der Zellen (meist 1/3-1/10) wurde in eine neue Kulturflasche überführt. Anschließend wurde mit

DMEM + 10% FCS + 5% AddR auf ein Endvolumen von 20 ml (T75 Kulturflasche) bzw. 30 ml (T175 Kulturflasche) aufgefüllt.

	<b>Zusammensetzung</b>
AddR	100 ml Penicillin/Streptomycin (1,72 g/l) 100 ml 5 mM 2-Mercaptoethanol (0,862 mM) 100 ml 1 M Hepespuffer pH 7,29 (0,172 M) 100 ml 100 mM Natriumpyruvat (17,24 mM) 100 ml 200 mM L-Glutamin (34,48 mM) 60 ml 100x Non-essential amino acids 20 ml Asparagin (10 mg/ml) (2,6 mM) → Steril filtrieren → 29 ml AddR-Stammlösung auf 500 ml Medium
1 M Hepespuffer pH 7,29	238,3 g HEPES ad 1000 ml Aqua dest. → steril filtrieren → pH mit NaOH einstellen
5 mM 2-Mercaptoethanol	350 µl 2-Mercaptoethanol 1000 ml PBS

### 2.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau

Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Membranintegrität toter und lebender Zellen. Bei lebenden Zellen verhindert die intakte Zellmembran das Eindringen des anionischen Diazofarbstoffes Trypanblau, weshalb vitale Zellen ungefärbt bleiben. Im Gegensatz dazu verlieren tote Zellen ihre Membranintegrität, woraufhin Trypanblau im Zytosol akkumuliert und die Zelle blau anfärbt. Für die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 mit 0,4% Trypanblau gemischt. Hiervon wurden 10 µl in eine EVE Zählkammer überführt und mit dem EVE automatisierten Zellzähler analysiert.

### 2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels Annexin V-APC und TMRM Färbung

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Analyse mehrerer tausend Zellen pro Sekunde im Hinblick auf Zellgröße (*forward scattered light*, FSC) und Granularität (*side scattered light*, SSC). Unter Zuhilfenahme spezifischer Färbungen können des Weiteren Informationen über zelluläre Vorgänge wie Zelltod, Zellzyklus und

Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde der Zelltod mittels Durchflusszytometrie genauer analysiert. Die hierbei verwendete Annexin V-APC Färbung dient der Detektion von Phosphatidylserin (PS). Dieses wird im Rahmen der Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert, woraufhin das Protein Annexin V mit hoher Affinität an das Phospholipid binden kann. Durch die Konjugation von Annexin V an den Fluorophor Allophycocyanin (APC) ist ein durchflusszytometrischer Nachweis PS-exponierender Zellen möglich. Allerdings erlauben die im Verlauf des nekrotischen Zelltodes entstehenden Membrandefekte die Penetration von Annexin V-APC in die Zelle, sodass auch nekrotische Zellen positiv erscheinen. Die Färbung mit Annexin V-APC erlaubt also nicht die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Aus diesem Grund wurde zusätzlich das mitochondriale Membranpotential mit Hilfe des Farbstoffs Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) untersucht. TMRM ist ein zellmembrangängiger Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, der sich aufgrund seiner positiven Ladung in intakten, negativ geladenen Mitochondrien ansammelt. Kommt es im Rahmen der intrinsischen Apoptose zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, akkumuliert der Farbstoff nicht mehr im Mitochondrium. Dieser Verlust der Anreicherung von TMRM ist ein Indiz für die intrinsische Apoptose.

Während für das Titrationsexperiment (3.1)  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät wurden, waren es für die *knock-out* Versuche  $0,7 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 12-Well Platte (3.3.2). Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe der Wirkstoffe in den unten angegebenen Konzentrationen (Tabelle 11 und 12).

**Tabelle 11 | Konzentrationen Titrationsexperiment**

<b>BH3-Mimetika</b>	1,5 $\mu$ M	6 $\mu$ M	15 $\mu$ M	30 $\mu$ M
<b>Bortezomib</b>	0,5 nM	2 nM	5 nM	10 nM

**Tabelle 12 | Konzentrationen *knock-out* Versuche**

<b>Venetoclax</b>	15 $\mu$ M
<b>Bortezomib</b>	5 nM

Die verwendeten Wirkstoffe wurden in DMSO gelöst, das in höheren Konzentrationen selbst zytotoxisch wirkt. Um die toxische Wirkung von DMSO auszuschließen, wurden jeweils Kontrollexperimente mit entsprechenden Mengen DMSO durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin-EDTA geerntet und vollständig (auch die toten Zellen im Medium) in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 1800 rpm, RT) wurden die Zellpellets in je 500  $\mu$ l 1x PBS + 2% FCS + 50 nM TMRM resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (5 min, 1800 rpm, RT). Es erfolgte eine Verdünnung von Annexin V-APC in 1x Annexin Bindepuffer (ABP) (1:50 für Titrationsexperiment, 1:100 für *knock-out* Versuche), in welcher die Zellen anschließend resuspendiert wurden. Einer weiteren Inkubation von 15 min im Dunkeln schloss sich die durchflusszytometrische Analyse am BD FACS Lyric an.

	<b>Zusammensetzung</b>
10x Annexin Bindepuffer	81,82 g NaCl (1,4 M) 2,77 g CaCl <sub>2</sub> (25 mM) 100 ml 1 M HEPES pH 7,4 (100 mM) ad 1 l H <sub>2</sub> O - milliQ
1 M Hepespuffer pH 7,4	238,3 g HEPES ad 1000 ml H <sub>2</sub> O - milliQ → steril filtrieren → pH mit NaOH einstellen

#### 2.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann die Lokalisation und Oligomerisierung von Bax, Bak und Bok analysiert werden. Hierfür wurden je 50.000 Zellen/Well (12-Well Platte) auf Deckgläsern ( $\varnothing$ : 15 mm) ausgesät und am nächsten Tag mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib bzw. einem

entsprechenden Volumen DMSO (DMSO-Kontrolle) für 24 h inkubiert. Zusätzlich wurde der pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph (10  $\mu$ M) zugegeben, um die Apoptose *downstream* der mitochondrialen Apoptoseinduktion zu unterbinden und eine vermehrte Zelladhärenz nach 24 h zu gewährleisten.

Die Zellen wurden mit 4% phosphatgepufferter Formaldehydlösung für 30 min (4°C) fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und 30 min bei 4°C mit Immunfluoreszenzpuffer permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit Primärantikörper (1:250, Tabelle 7) in Immunfluoreszenzpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für mindestens 6 h mit Sekundärantikörper (Huhn anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 (1:500) bzw. Ziege anti-Maus DyLight 649 (1:250)) in PBS bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dem PBS des anschließenden Waschschriffs wurde 100 ng/ml Hoechst 34580 für die Zellkernfärbung beigeetzt. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden die Deckgläser mit Eindeckelmedium auf Objektträgern fixiert. Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop angefertigt.

	Zusammensetzung
Immunfluoreszenzpuffer	2 g BSA (4%) 500 $\mu$ l 5% Saponin (0,05%) ad 50 ml 1x PBS → filtrieren durch Spritzenfilter mit 0,2 $\mu$ m Porengröße

#### 2.2.5 Medikamenteninkubation und Ernte der Sarkomzellen für Western Blot Analyse

1,7x10<sup>6</sup> Zellen der Zelllinie SK-LMS-1, 1x10<sup>6</sup> Zellen der Zelllinie RD und 2x10<sup>6</sup> Zellen der Zelllinie SW982 wurden pro Petrischale ( $\varnothing$ : 100 mm) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib bzw. einer entsprechenden Menge DMSO sowie 10  $\mu$ M Q-VD-Oph für 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und zentrifugiert (5 min, 1400 rpm, RT). Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

### 2.3.1 Generierung von Zelllysaten aus Sarkomzellen

Die in 2.2.5 generierten Zellpellets wurden in Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (1x Protease Inhibitor Cocktail, 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail) auf Eis resuspendiert. Zum vollständigen Zellaufschluss wurden die Lösungen mit 200 W in 6 Zyklen á 24 s sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt und der Überstand als proteinhaltiges Zelllysate weiterverwendet.

	<b>Zusammensetzung</b>
Lysepuffer	3,94 g Tris-HCl pH 7,6 (50 mM) 7,3 g NaCl (250 mM) 0,5 ml Triton x-100 (0,1%) 0,73 g EDTA (5 mM) ad 500 ml Aqua dest. → pH mit NaOH einstellen

### 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Vorbereitung der Proben

Die relativen Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit in 96-Well Platten durch Absorptionsmessung bestimmt. Je 200 µl des BCA-Arbeitsreagenz (Lösung A:Lösung B 50:1) wurde 1 µl der Zelllysate zugegeben. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte in Duplikaten. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm mithilfe eines Plattenlesers (EnSpire Multimode Plate Reader, Perkin Elmer) ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde relativ zu einer BSA-Standardkurve errechnet.

Zur weiteren Verwendung wurden Arbeitslösungen mit einer Proteinkonzentration von 3 µg/µl durch Verdünnen mit 5x Protein-Ladepuffer hergestellt, 5 min auf 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

	<b>Zusammensetzung</b>
5x Protein Ladepuffer	10 g SDS (10%) 30,6 ml 1 M Tris Puffer pH 6,8 (0,306 M) 25 ml 2-Mercaptoethanol (25%) 100 mg Bromphenolblau (0,1%) ad 75 ml H <sub>2</sub> O - milliQ + 25 ml Glycerol (25%)
1 M Tris Puffer pH 6,8	12,1 g Tris-Base 50 ml H <sub>2</sub> O - milliQ → pH 6,8 mit HCl einstellen ad 100 ml H <sub>2</sub> O - milliQ

### 2.3.3 Gelelektrophorese und Western Blot

Proteine können entsprechend ihrer scheinbaren Größe mittels SDS-Polyacrylamid-(PAA)-Gelelektrophorese getrennt werden. SDS denaturiert und überdeckt die Eigenladung der Proteine und vermittelt eine zur Länge der Peptidkette proportionale negative Ladung. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die SDS-Proteinkomplexe in Richtung Anode (+) und werden dabei entsprechend ihrer Größe unterschiedlich stark durch das Polyacrylamid-Gel zurückgehalten. Kleinere Proteine durchlaufen die Gelmatrix schneller als größere.

Die Geldaschen der PAA-Gele wurden mehrmals gründlich mit 1x Elektrophoresepuffer gespült. Je 30 µg Protein pro Probe wurden zur elektrophoretischen Trennung in die Taschen gefüllt. Zur relativen Größenbestimmung der Proteine diente ein Proteinmarker mit Proteinen bekannter Größe. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 100 V für 30 min und anschließend bei 160 V für ca. 2 h.

Nach der Trennung erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Trägermembran nach der SemiDry Methode. Hierfür wurden eine 0,1 µm Nitrozellulosemembran, Filterpapier und das Gel in Transferpuffer equilibriert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel wandern die Proteine wegen der negativen Ladung des gebundenen Dodecylsulfates aus dem Gel in Richtung Anode (+). Dazu wurde die Nitrozellulosemembran auf drei an der Anode befindliche Filterpapiere gelegt. Darauf wurden das Gel und weitere drei Filterpapiere platziert. Nach jeder Lage Filterpapier diente ein Handroller

zum Ausstreichen von Luftblasen, um einen gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Der Transfer erfolgte bei konstanten 40 mA pro Gel für 1,5 h (Biometra Fastblot B44).

Die Blot-Membranen wurden mit 1x TBST gewaschen und mit Ponceau S gefärbt, um den Erfolg des Blot-Vorgangs zu überprüfen. Um offene Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen anschließend für 1 h mit 5% Magermilch in 1x TBST bei RT inkubiert. Die Membranen wurden erneut mit 1x TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit Primärantikörpern inkubiert. Verwendete Antikörperverdünnungen und -herkunft sind in Tabelle 7 aufgelistet. Mit Ausnahme von anti-GAPDH waren alle Antikörper in 5% BSA in 1x TBST verdünnt. Die anti-GAPDH Verdünnung erfolgte mit 5% Magermilch in 1x TBST.

Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x 10 min mit 1x TBST gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit Sekundärantikörper (1:2000 in 5% Magermilch in 1x TBST) inkubiert. Die Sekundärantikörper waren an Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Daher konnte nach erneutem 3x 10-minütigem Waschen der Membranen das Signal mittels einer ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence* Lösung) in einem digitalen Geldokumentationssystem (LAS-1000) detektiert werden. Als Kontrolle für die gleiche Proteinmengen je Probe wurde bei jedem Western Blot das *Housekeeping* Protein Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen.

Sollte ein weiteres Protein ähnlicher Größe auf der Membran detektiert werden, wurde die Membran nach erfolgter Detektion 10 min mit 1x TBST gewaschen und anschließend 10 min bei RT mit *Stripping*-Buffer inkubiert. Nach erneutem 10-minütigen Waschen wurde die Membran 1 h bei RT mit 5% Magermilch in 1x TBST geblockt und wurde dann für die Detektion weiterer Proteine verwendet.

	<b>Zusammensetzung</b>
10% APS	1 g APS ad 10 ml H <sub>2</sub> O - milliQ
Elektrophoresepuffer (10x)	30,3 g Tris-Base (250 mM) 45 g Tricine (250 mM) 25 ml 20% SDS (0,5%) ad 1 l H <sub>2</sub> O - milliQ
Sammelgel	660 µl Acrylamid 29:1, 40% 760 µl 2,5 M Tris-HCl, pH 8,8 3,42 ml H <sub>2</sub> O - milliQ 5 µl TEMED 450 µl APS, 10%
20% SDS	100 g SDS ad 500 ml H <sub>2</sub> O - milliQ
10x TBS pH 7,4	400 g NaCl (1,369 M) 10 g KCl (0,027 M) 16,93 g Tris-Base 175 g Tris-HCl ] (0,25 M Tris) ad 5000 ml H <sub>2</sub> O - milliQ
1x TBST	500 ml 10x TBS 4500 ml H <sub>2</sub> O - VE 10 ml 50% Tween20 (0,1% Tween)
Transferpuffer (Semi-dry)	29 g Tris-Base (48 mM Tris) 14,6 g Glycine (39 mM) 9,25 ml 20% SDS (0,037%) 1 l Ethanol (20%) ad 5000 ml H <sub>2</sub> O - milliQ
Trenngel	4 ml Acrylamid 29:1, 40% 5 ml 2,5 M Tris-HCl, pH 8,8 890 µl H <sub>2</sub> O - milliQ 6 µl TEMED 300 µl APS, 10%
2,5 M Tris-HCl, pH 8,8	60,57 g Tris-Base 150 ml H <sub>2</sub> O - milliQ → pH 8,8 mit HCl einstellen ad 200 ml H <sub>2</sub> O - milliQ
50% Tween20	250 ml Tween20 250 ml H <sub>2</sub> O - milliQ

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism5. Verwendet wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test. Statistische Signifikanz wurde definiert ab p-Werten < 0,05 (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001). P-Werte ≥ 0,05 wurden als nicht signifikant (ns) gewertet. Dargestellt sind jeweils

die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Messwerte außerhalb der vierfachen durchschnittlichen Standardabweichung wurden als Ausreißer gewertet und das Experiment ein weiteres Mal wiederholt. Die mittlere Standardabweichung der Titrationsexperimente (Kapitel 3.1) betrug 4,47% für Annexin V-APC und 4,18% für TMRM. Eliminiert wurden somit Ausreißer die zu Standardabweichungen >18% bei Annexin V-APC (2 Messwerte) sowie > 17% bei TMRM (2 Messwerte) führten. Die mittlere Standardabweichung der Apoptosemessungen in SW982/wt und SW982/MDP-ko (Kapitel 3.3.2) betrug 5,95% für Annexin V-APC und 7,34% für TMRM.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zelltodanalyse von Weichteilsarkomen nach alleiniger bzw. gleichzeitiger Inkubation mit BH3-Mimetika und Bortezomib

Die in unseren Vorarbeiten festgestellte synergistische Reduktion vitaler Zellen durch gleichzeitige Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib sollte hier im Sinne einer effektiven Apoptoseinduktion zunächst mittels Durchflusszytometrie verifiziert und die Übertragbarkeit auf eine Kombination anderer BH3-Mimetika und Bortezomib analysiert werden.

##### 3.1.1 Venetoclax und Bortezomib

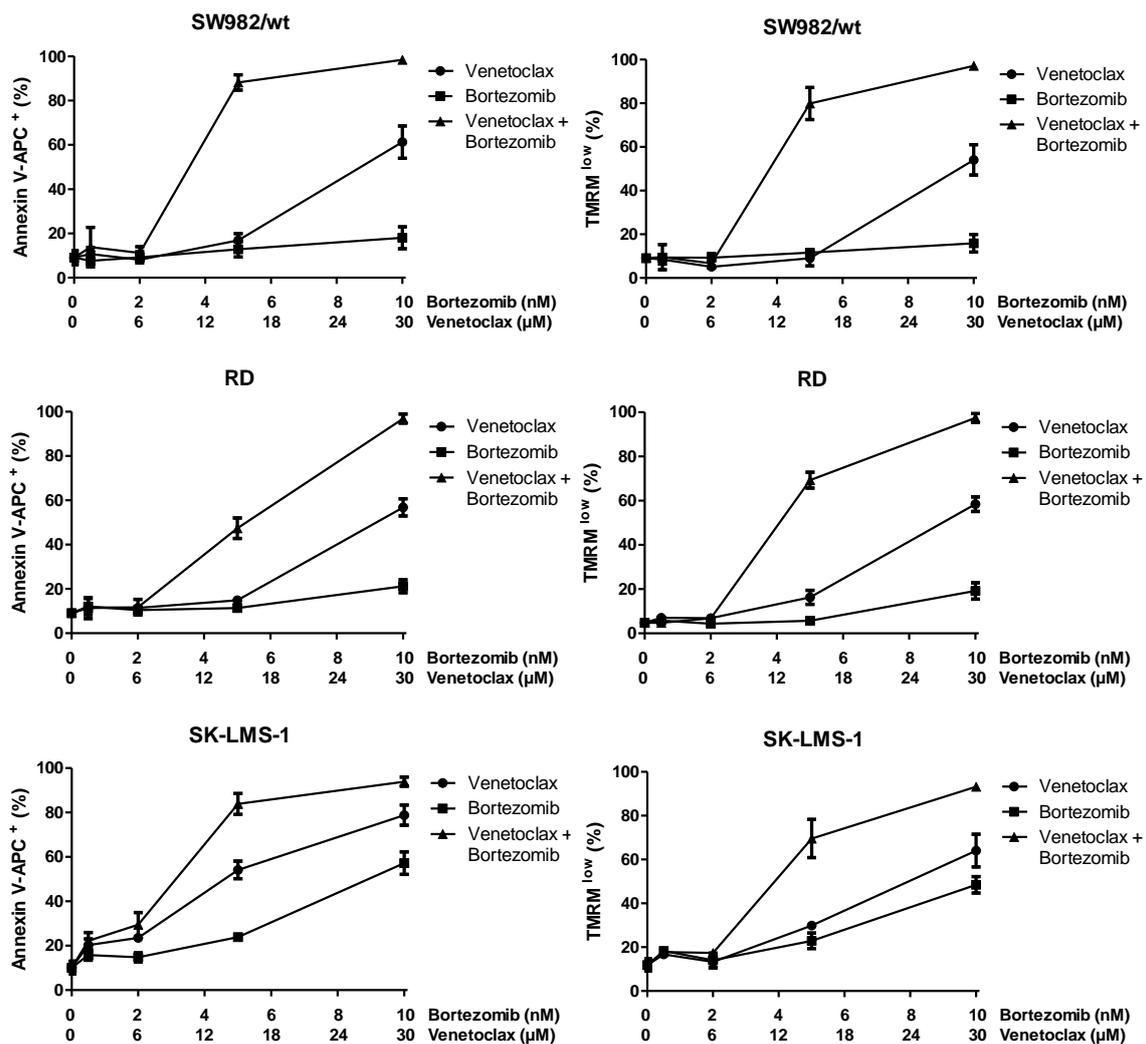
Es wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen von Venetoclax und Bortezomib bzw. entsprechenden Mengen an DMSO inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Annexin V-APC und TMRM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Eine Dosierung bis 6  $\mu\text{M}$  Venetoclax und 2 nM Bortezomib bewirkte in SW982/wt (Synovialsarkom) und RD (Rhabdomyosarkom) weder bei alleiniger noch kombinierter Inkubation im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Zelltozahlen (Abb. 4). Die Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax resultierte in 17% (SW982/wt) bzw. 15% (RD) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen. Nach einer alleinigen Inkubation mit 5 nM Bortezomib lag der Anteil von Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bei 13% (SW982/wt) bzw. 11% (RD). Diese Werte sind vergleichbar mit den 9% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen des Kontrollansatzes beider Zelllinien. Eine Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax resultierte zudem in einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (TMRM<sup>low</sup>) in 9% der SW982/wt Zellen sowie in 16% der Zellen der Zelllinie RD. Nach Inkubation mit 5 nM Bortezomib zeigten sich 12% (SW982/wt) bzw. 6% (RD) TMRM<sup>low</sup>. Auch diese Werte sind vergleichbar mit der Kontrolle (9% SW982/wt, 5% RD). Im Gegensatz zur jeweiligen alleinigen Inkubation resultierte die Kombination von 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax und 5 nM Bortezomib bei der Zelllinie SW982/wt in 88% Annexin V-APC<sup>+</sup> und 80% TMRM<sup>low</sup> Zellen, was einer signifikant erhöhten Apoptoseinduktion entspricht ( $p < 0,001$ ). Auch bei der

Zelllinie RD konnte die gleichzeitige Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax und 5 nM Bortezomib einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,001$ ) avitaler Zellen erzielen. So waren  $\sim 50\%$  der RD Zellen Annexin V-APC<sup>+</sup>, während  $\sim 70\%$  einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als Zeichen der frühen Apoptose zeigten (Abb. 4 & 5).

Die Zelllinie SK-LMS-1 (Leiomyosarkom) reagierte bereits auf eine alleinige Inkubation mit Venetoclax bzw. Bortezomib sensitiver als die Zelllinien SW982/wt und RD. Dennoch zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der alleinigen Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax und der Kombination von Venetoclax mit 5 nM Bortezomib (Abb. 5) (54% vs. 84% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen ( $p = 0,0011$ ); 30% vs. 70% TMRM<sup>low</sup> ( $p = 0,0015$ )). Inkubation mit 5 nM Bortezomib resultierte in 24% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,001$ ) und 23% ( $p = 0,001$ ) der SK-LMS-1 Zellen zeigten einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.

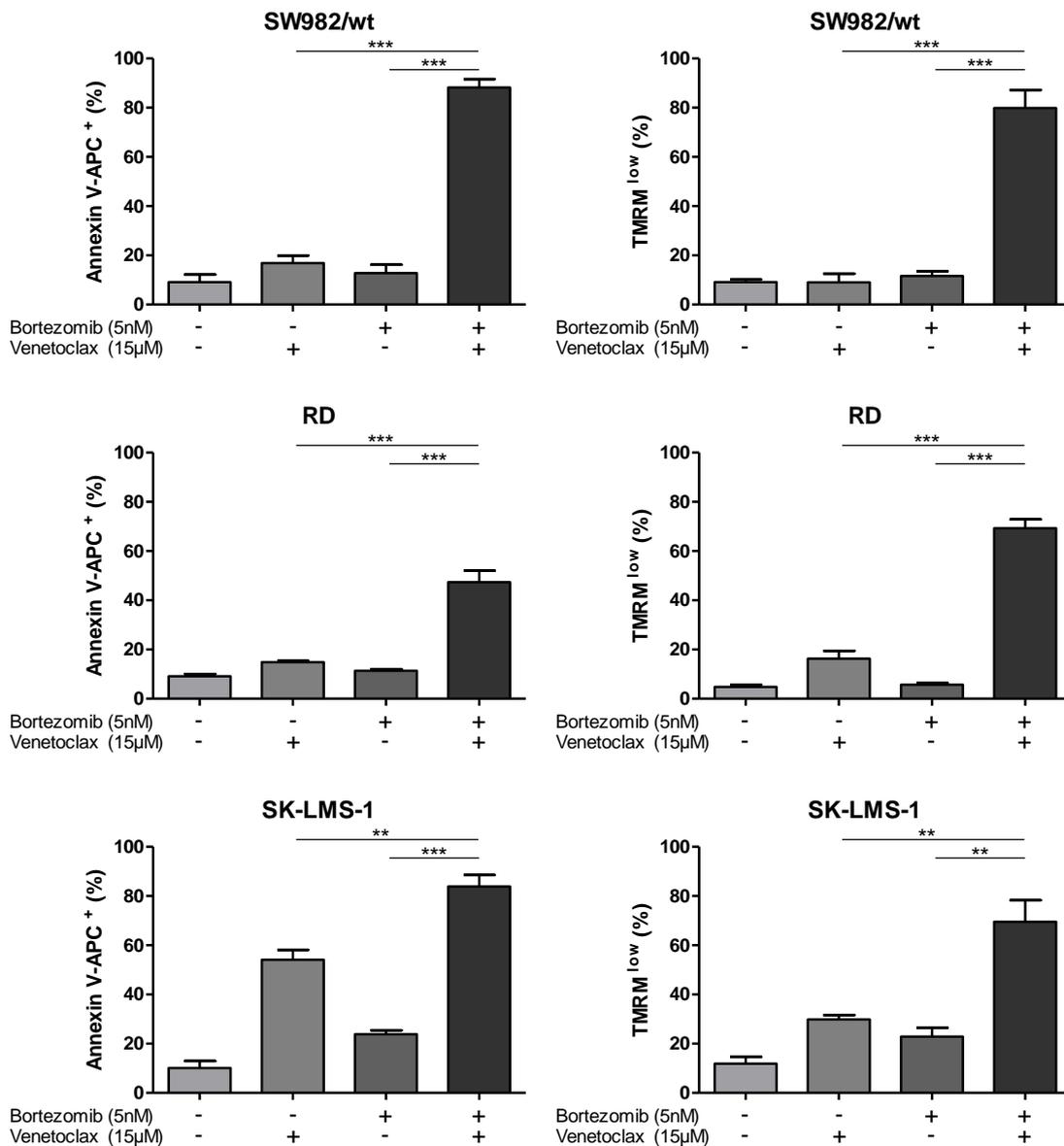
Eine Dosierung von 30  $\mu\text{M}$  Venetoclax führte zu einer im Vergleich zur Kontrolle erhöhten Zelltodinduktion – der Anteil avitaler Zellen betrug 50-60% in SW982/wt und RD. Hingegen konnte die Behandlung mit 10 nM Bortezomib in SW982/wt und RD maximal knapp 20% Zelltod erzielen (Abb. 4). In SK-LMS-1 resultierte die alleinige Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Venetoclax in  $\sim 79\%$  Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und mit 10 nM Bortezomib in  $\sim 57\%$  Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen. Alle drei Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 waren nach einer gleichzeitigen Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Venetoclax und 10 nM Bortezomib zu annähernd 100% Annexin V-APC<sup>+</sup> bzw. TMRM<sup>low</sup> (Abb. 4).



**Abbildung 4 | Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch Venetoclax und/oder Bortezomib.**  $1,5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinien SW982/wt (Synovialsarkom), RD (Rhabdomyosarkom) und SK-LMS-1 (Leiomyosarkom) wurden pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von Venetoclax und/oder Bortezomib inkubiert. Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch mithilfe einer Annexin V-APC- und TMRM-Färbung analysiert. Die Gegenwart beider Wirkstoffe erzielte ab Konzentrationen von 15 μM Venetoclax und 5 nM Bortezomib eine deutlich effektivere Zelltodinduktion als die jeweiligen alleinigen Inkubationen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten ( $n = 3$ ).

Da 30 μM Venetoclax und 10 nM Bortezomib bereits bei alleiniger Inkubation in mindestens einer der getesteten Zelllinien über 55% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen induzierten, sind diese Konzentrationen für die Betrachtung des Synergismus ungeeignet. Deutlich geeigneter sind hingegen die Konzentrationen 15 μM Venetoclax und 5 nM Bortezomib. Die direkte Gegenüberstellung der FACS-Messwerte zeigt eindeutig, dass der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen

nach alleiniger Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib in SW982/wt und RD auf Höhe der Kontrollansätze liegt, wohingegen eine Inkubation in Gegenwart beider Wirkstoffe in allen drei Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 in einer im Vergleich zur alleinigen Inkubation signifikant erhöhten Zahl Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen resultierte (Abb. 5).



**Abbildung 5 | Signifikant erhöhte Apoptoseinduktion durch simultane Gegenwart von Venetoclax und Bortezomib.** Die dargestellten Ergebnisse entsprechen den Werten aus Abb. 4 in anderer Darstellungsform (n = 3). Eine gleichzeitige Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax und 5 nM Bortezomib erzielte signifikant erhöhte Zelltodzahlen im Vergleich zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD (t-Test: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

Im Vergleich zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib zeigten alle Zelllinien eine signifikant erhöhte Zelltodinduktion (Annexin V-APC<sup>+</sup>) nach simultaner Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  Venetoclax und 5 nM Bortezomib (Venetoclax&Bortezomib). In ähnlicher Weise führte die Gegenwart beider Wirkstoffe bei einem signifikant größeren Anteil der Zellen zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (TMRM<sup>low</sup>).

### 3.1.2 A-1155463 und Bortezomib

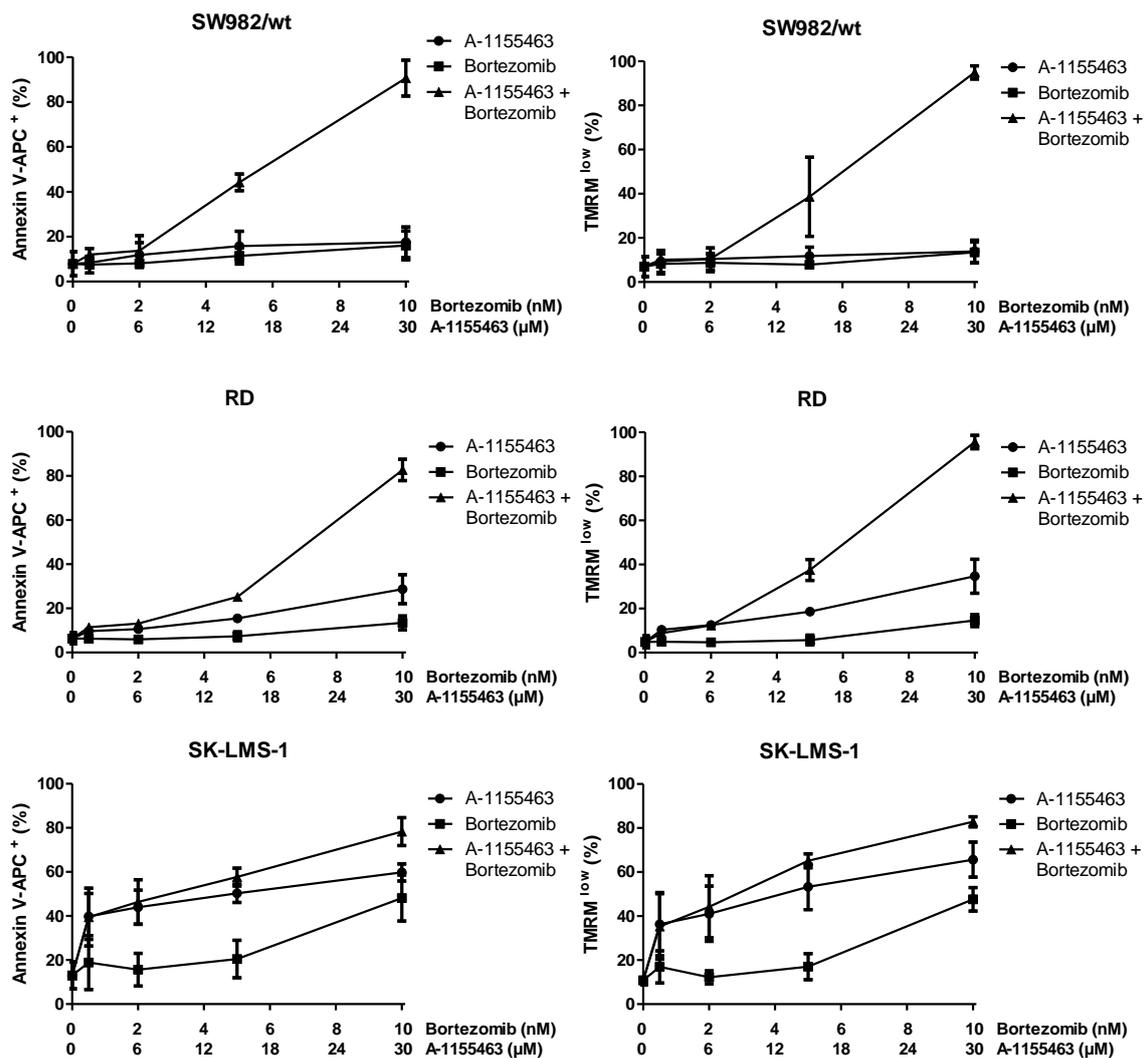
Um zu analysieren, ob auch andere BH3-Mimetika synergistisch mit Bortezomib Apoptose induzieren, wurde der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463 in einem analogen Experiment verwendet. Die Konzentrationen von A-1155463 entsprachen denen von Venetoclax und die Bortezomibkonzentrationen waren identisch wie in Kapitel 3.1.1.

Der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen war bei Dosierungen bis 6  $\mu\text{M}$  A-1155463 und 2 nM Bortezomib in SW982/wt und RD sowohl bei alleiniger als auch kombinierter Inkubation der beiden Wirkstoffe vergleichbar mit der Zelltodrate in Kontrollansätzen (< 14%). Die simultane Inkubation mit A-1155463 und Bortezomib induzierte in SW982/wt und RD deutlich weniger Zelltod als Venetoclax&Bortezomib. Erst die kombinierte Präsenz der höchsten verwendeten Dosierungen von 30  $\mu\text{M}$  A-1155463 und 10 nM Bortezomib resultierte in einer Apoptoseinduktion von über 45% (Abb. 6). Eine gleichzeitige Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  A-1155463 und 5 nM Bortezomib (A-1155463&Bortezomib) resultierte in 44% (SW982/wt) bzw. 25% (RD) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und in 39% (SW982/wt) bzw. 38% (RD) in einer mitochondrialen Depolarisation (TMRM<sup>low</sup>, low  $\Delta\Psi_m$ ) (Abb. 6 & 7). Trotz dieses im Vergleich zu Venetoclax&Bortezomib geringeren Anteils avitaler Zellen war die durch A-1155463&Bortezomib hervorgerufene Apoptoseinduktion im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  A-1155463 mit 16% (SW982/wt,  $p = 0,0012$ ) bzw. 15% (RD,  $p = 0,0012$ ) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und 12% (SW982/wt,  $p = 0,03$ ) bzw. 19% (RD,  $p = 0,0025$ ) TMRM<sup>low</sup> Zellen signifikant erhöht. In Gegenwart von 5 nM Bortezomib lag der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bei 11% (SW982/wt,  $p < 0,001$ ) bzw. 7% (RD,  $p < 0,001$ ), der Anteil TMRM<sup>low</sup> Zellen bei 8% (SW982/wt,  $p = 0,0165$ ) bzw.

6% (RD,  $p < 0,001$ ). Die simultane Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  A-1155463 und 5 nM Bortezomib zeigte also ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu der alleinigen Inkubation mit 5 nM Bortezomib (Abb. 7A).

Bei der Zelllinie SK-LMS-1 resultierte die Inkubation mit A-1155463 bereits bei einer Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  in 40% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und in 36% TMRM<sup>low</sup> Zellen (Abb. 6). Die Zelltodinduktion wurde dabei durch Zugabe von 0,5 nM Bortezomib nicht signifikant gesteigert. Die Zelllinie SK-LMS-1 zeigte zudem nach alleiniger Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  A-1155463 50% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und 53% der Zellen wiesen einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auf. Die Inkubation mit A-1155463 & Bortezomib resultierte in 58% ( $p = 0,0917$ ) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und in 65% ( $p = 0,1281$ ) TMRM<sup>low</sup> Zellen, was im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  A-1155463 keinem signifikanten Unterschied entsprach (Abb. 7A).

Die Zelllinien SW982/wt und RD sind gegenüber der Zelltodinduktion durch den Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463 weniger empfindlich als gegenüber Venetoclax (Abb. 6). Eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  A-1155463 resultierte in marginaler Steigerung der Zelltodrate (Annexin V-APC<sup>+</sup>: 18% in SW982/wt, 29% in RD) bzw. des Anteils von TMRM<sup>low</sup> Zellen (14% in SW982/wt, 35% in RD). Hingegen reagierten SK-LMS-1 Zellen mit 60% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und 66% TMRM<sup>low</sup> Zellen bei einer Dosierung von 30  $\mu\text{M}$  A-1155463 deutlich sensitiver auf eine Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibition als SW982/wt und RD. Die Messwerte nach einer Inkubation mit 10 nM Bortezomib lagen bei SW982/wt und RD zwischen 10-20% Zelltod sowie bei SK-LMS-1 bei 48% und waren damit vergleichbar mit der vorherigen Versuchsreihe in Kapitel 3.1.1. Die simultane Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  A-1155463 und 10 nM Bortezomib resultierte in allen drei Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 in über 75% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und in über 80% der Zellen in einer mitochondrialen Depolarisation (Abb. 6).

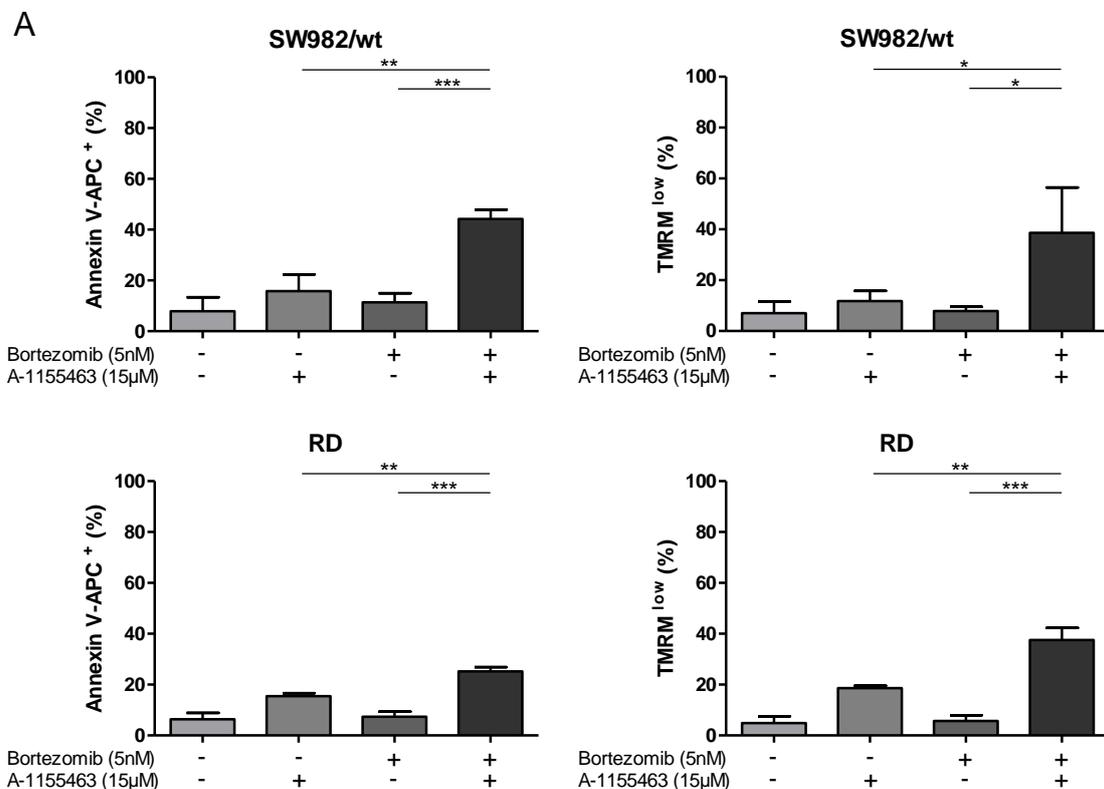


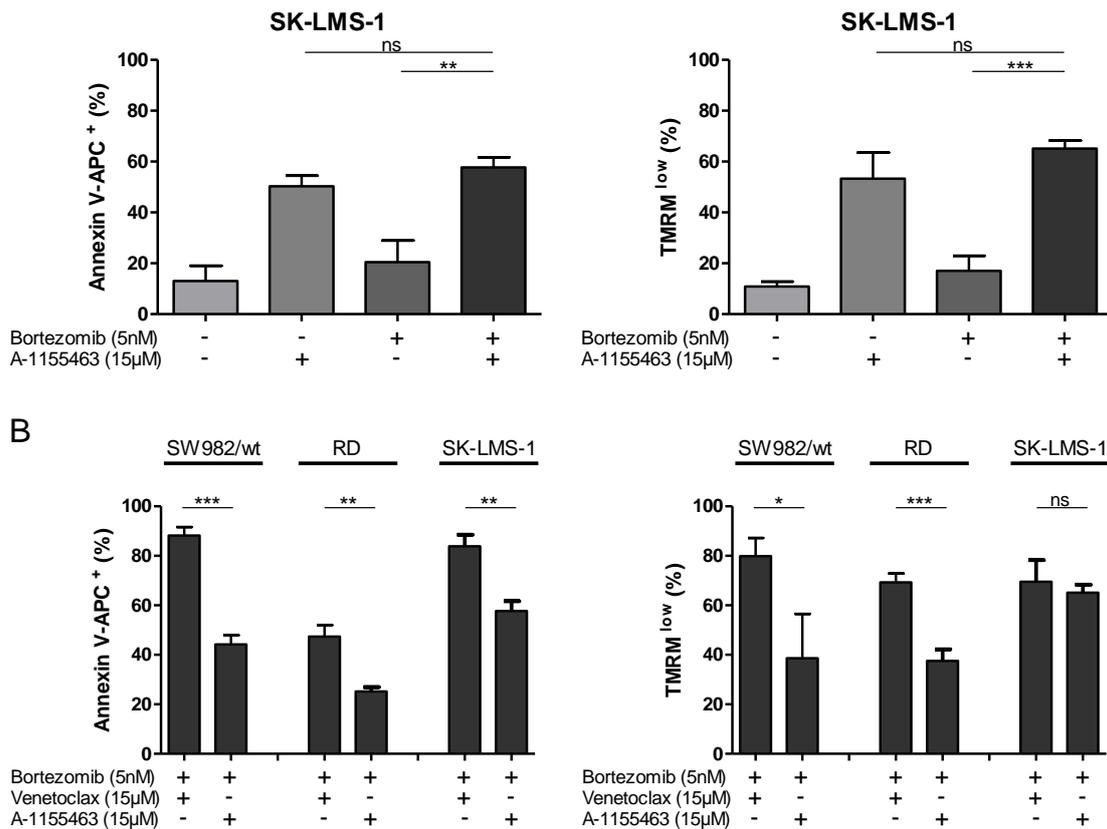
**Abbildung 6 | Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch A-1155463 und/oder Bortezomib.**  $1,5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 wurden pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von A-1155463 (Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor) und/oder Bortezomib inkubiert. Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch mithilfe einer Annexin V-APC- und TMRM-Färbung analysiert. Lediglich die simultane Behandlung mit den höchsten verwendeten Dosierungen (30 µM A-1155463 + 10 nM Bortezomib) konnte in SW982/wt und RD über 45% Zelltod induzieren. Während in SW982/wt und RD die gleichzeitige Inkubation mit A-1155463 und Bortezomib in hohen Konzentrationen stärker Zelltod induzierte als die jeweiligen alleinigen Inkubationen, erzielte die alleinige Gegenwart des Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitors in SK-LMS-1 bereits ähnliche Zelltodraten wie die Kombination der Wirkstoffe. Dargestellt sind Messungen (Mittelwert ± SD) aus drei bzw. vier unabhängigen Experimenten (n = 3 für RD und SK-LMS-1, n = 4 für SW982/wt).

Analog zu Kapitel 3.1.1 werden auch hier die Messwerte der Inkubationen mit 15 µM A-1155463 und 5 nM Bortezomib aus Abbildung 6 gesondert in Form von Säulendiagrammen dargestellt (Abb. 7A). Zudem erfolgte ein Vergleich der

Effektivität bezüglich der Zelltodinduktion zwischen Venetoclax&Bortezomib und A-1155463&Bortezomib (Abb. 7B).

Der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen in Gegenwart von A-1155463&Bortezomib lag im Vergleich zu einer Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib bei 44% vs. 88% (SW982/wt,  $p < 0,001$ ), 25% vs. 47% (RD,  $p = 0,0014$ ) bzw. 58% vs. 84% (SK-LMS-1,  $p = 0,0019$ ) und war damit in allen Zelllinien signifikant geringer. Auch der Anteil mitochondrial depolarisierter Zellen war nach A-1155463&Bortezomib Inkubation mit 39% vs. 80% ( $p = 0,0210$ ) in SW982/wt und 38% vs. 69% ( $p < 0,001$ ) in RD signifikant geringer als nach Venetoclax&Bortezomib Inkubation. In SK-LMS-1 konnte für 65% vs. 70% ( $p = 0,4543$ ) TMRM<sup>low</sup> Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit A-1155463&Bortezomib und der durch Venetoclax&Bortezomib hervorgerufenen Apoptose festgestellt werden (Abb. 7B). Simultane Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibition durch 15  $\mu$ M A-1155463 und Proteasominhibition durch 5 nM Bortezomib führte zu geringerer Zelltodinduktion als eine Venetoclax&Bortezomib Inkubation bei gleicher Dosierung.





**Abbildung 7 | Apoptoseinduktion durch A-1155463 und/oder Bortezomib.** (A) Dargestellt sind die Daten aus Abb. 6 (n = 3 für RD und SK-LMS-1, n = 4 für SW982/wt). Obwohl die simultane Inkubation mit 15 µM A-1155463 und 5 nM Bortezomib in SW982/wt und RD lediglich weniger als 45% avitale Zellen erreichte, entsprach dies einer signifikanten Erhöhung der Apoptoseinduktion im Vergleich zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen. In SK-LMS-1 resultierte die Kombination von A-1155463 und Bortezomib im Vergleich zu einer alleinigen A-1155463 Inkubation hingegen in keinem signifikanten Unterschied. (B) Direkter Vergleich der Zelltodinduktion durch Venetoclax&Bortezomib und A-1155463&Bortezomib. Die Werte der dargestellten Inkubationen wurden aus Abb. 5 und Abb. 7A übernommen und gegenübergestellt. Eine Kombination von Bortezomib mit einem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor erzielte signifikant weniger Zelltod als eine Kombination von Bortezomib mit einem Bcl-2-Inhibitor. Gezeigt ist der Mittelwert ± SD (t-Test: ns = nicht signifikant bei p > 0,05; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001) [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

Die simultane Inkubation mit 15 µM A-1155463 und 5 nM Bortezomib bewirkte in den Zelllinien SW982/wt und RD signifikant höhere Zelltodraten als die jeweilige Gegenwart nur eines Wirkstoffes. Jedoch resultierte die A-1155463&Bortezomib Inkubation mit weniger als 45% Zelltodinduktion in beiden Zelllinien in einem deutlich geringeren Anteil avitaler Zellen als eine Venetoclax&Bortezomib Inkubation der gleichen Dosierung. Die Zelllinie SK-LMS-1 zeigte bei Inkubation mit 15 µM A-1155463 in An- und Abwesenheit von 5 nM Bortezomib einen vergleichbaren Anteil avitaler Zellen.

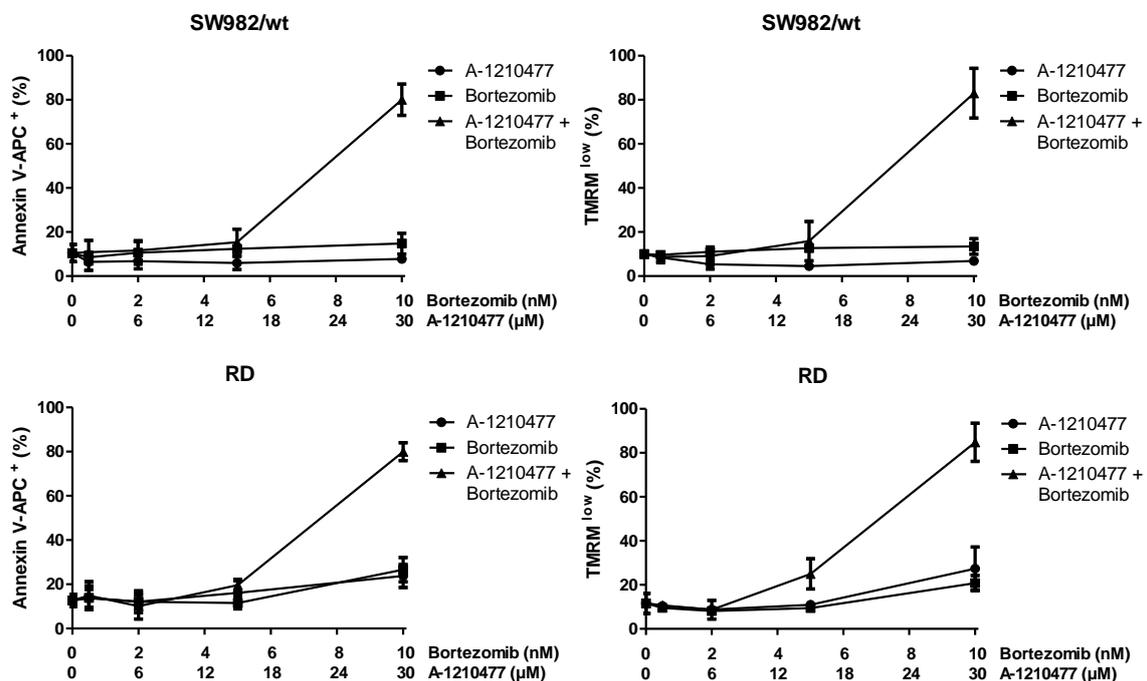
### 3.1.3 A-1210477 und Bortezomib

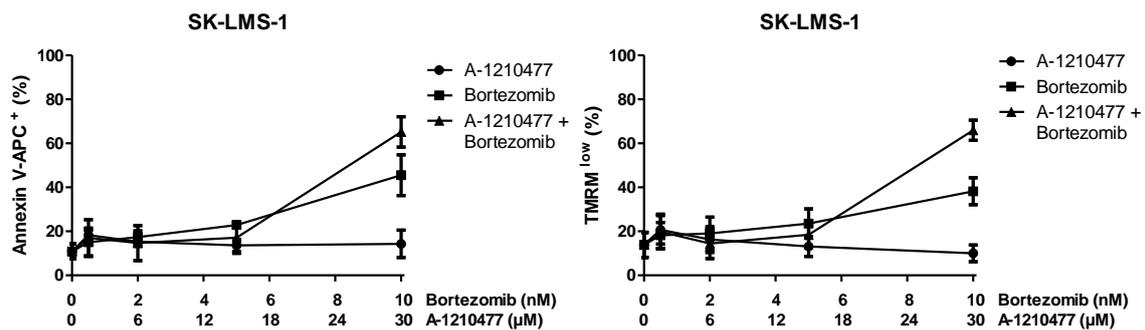
Neben dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor wurde die Wirkung eines weiteren BH3-Mimetikums, des Mcl-1-Inhibitors A-1210477, in analogen Experimenten analysiert. Erneut entsprachen die eingesetzten Konzentrationen von A-1210477 denen von Venetoclax und die Bortezomibkonzentrationen blieben identisch wie in Kapitel 3.1.1

Der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen zeigte sich bei Dosierungen bis 6 µM A-1210477 und 2 nM Bortezomib in SW982/wt, RD und SK-LMS-1 sowohl bei alleiniger als auch kombinierter Inkubation der beiden Wirkstoffe vergleichbar zu den Kontrollansätzen ohne A-1210477 und Bortezomib (Abb. 8). Die simultane Applikation von 15 µM Mcl-1-Inhibitor und 5 nM Bortezomib (A-1210477&Bortezomib) resultierte in 15% (SW982/wt), 20% (RD) bzw. 17% (SK-LMS-1) der Zellen in einer Exposition von Phosphatidylserin (Annexin V-APC<sup>+</sup>). Somit resultierte kein signifikanter Unterschied in der Zelltodinduktion zwischen der kombinierten A-1210477&Bortezomib Inkubation und einer alleinigen Bortezomib Inkubation mit 12% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen (p = 0,3564) in SW982/wt und 23% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen (p = 0,2430) in SK-LMS-1 bzw. einer alleinigen A-1210477 Inkubation mit 16% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen (p = 0,3788) in RD und 14% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen (p = 0,4689) in SK-LMS-1. Die Gegenwart beider Wirkstoffe bewirkte zudem in 16% (SW982/wt), 25% (RD) bzw. 18% (SK-LMS-1) einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 8 & 9A). Dies ist vergleichbar zu einer alleinigen Bortezomib Inkubation mit 13% TMRM<sup>low</sup> Zellen (p = 0,5081) in SW982/wt sowie zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen in SK-LMS-1 (A-1210477: 13% TMRM<sup>low</sup> (p = 0,2833), Bortezomib: 24% TMRM<sup>low</sup> (p = 0,3801)) (Abb. 9A).

Ähnlich zu A-1155463 führte eine alleinige Inkubation mit dem Mcl-1-Inhibitor auch in hohen Konzentrationen von 30 µM nur in unter 30% der Zellen zur Apoptoseinduktion (Abb. 8). Interessanterweise zeigte sich auch die Zelllinie SK-LMS-1 relativ resistent gegenüber einer alleinigen A-1210477 Inkubation. Sogar die höchste eingesetzte Dosierung von 30 µM A-1210477 resultierte in SW982/wt mit 8% Annexin V-APC<sup>+</sup> und 7% TMRM<sup>low</sup> Zellen sowie in SK-LMS-1

mit 14% Annexin V-APC<sup>+</sup> und 10% TMRM<sup>low</sup> Zellen in vergleichbaren Zelltodraten wie die Kontrollansätze mit 10% (SW982/wt) bzw. 11% (SK-LMS-1) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und 10% (SW982/wt) bzw. 14% (SK-LMS-1) TMRM<sup>low</sup> Zellen. In der Zelllinie RD lag nach Inkubation mit 30  $\mu$ M A-1210477 der Anteil Phosphatidylserin-exponierender Zellen bei 24% und der Anteil mitochondrial depolarisierter Zellen lag bei 27%. Die Messwerte nach einer Inkubation mit 10 nM Bortezomib lagen bei 15% (SW982/wt), 27% (RD) und 46% (SK-LMS-1) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen, der Anteil an TMRM<sup>low</sup> Zellen betrug 13% (SW982/wt), 21% (RD) und 38% (SK-LMS-1). Die Werte waren damit vergleichbar mit den vorherigen Versuchsreihen in Kapitel 3.1.1 und Kapitel 3.1.2. Die Kombination von A-1210477 mit Bortezomib bewirkte bei Konzentrationen von 30  $\mu$ M A-1210477 und 10 nM Bortezomib einen höheren Anteil von > 25% avitaler Zellen in den Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 und resultierte in 80% (SW982/wt), 80% (RD) und 65% (SK-LMS-1) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und in 83% (SW982/wt), 85% (RD) und 66% (SK-LMS-1) TMRM<sup>low</sup> Zellen (Abb. 8).



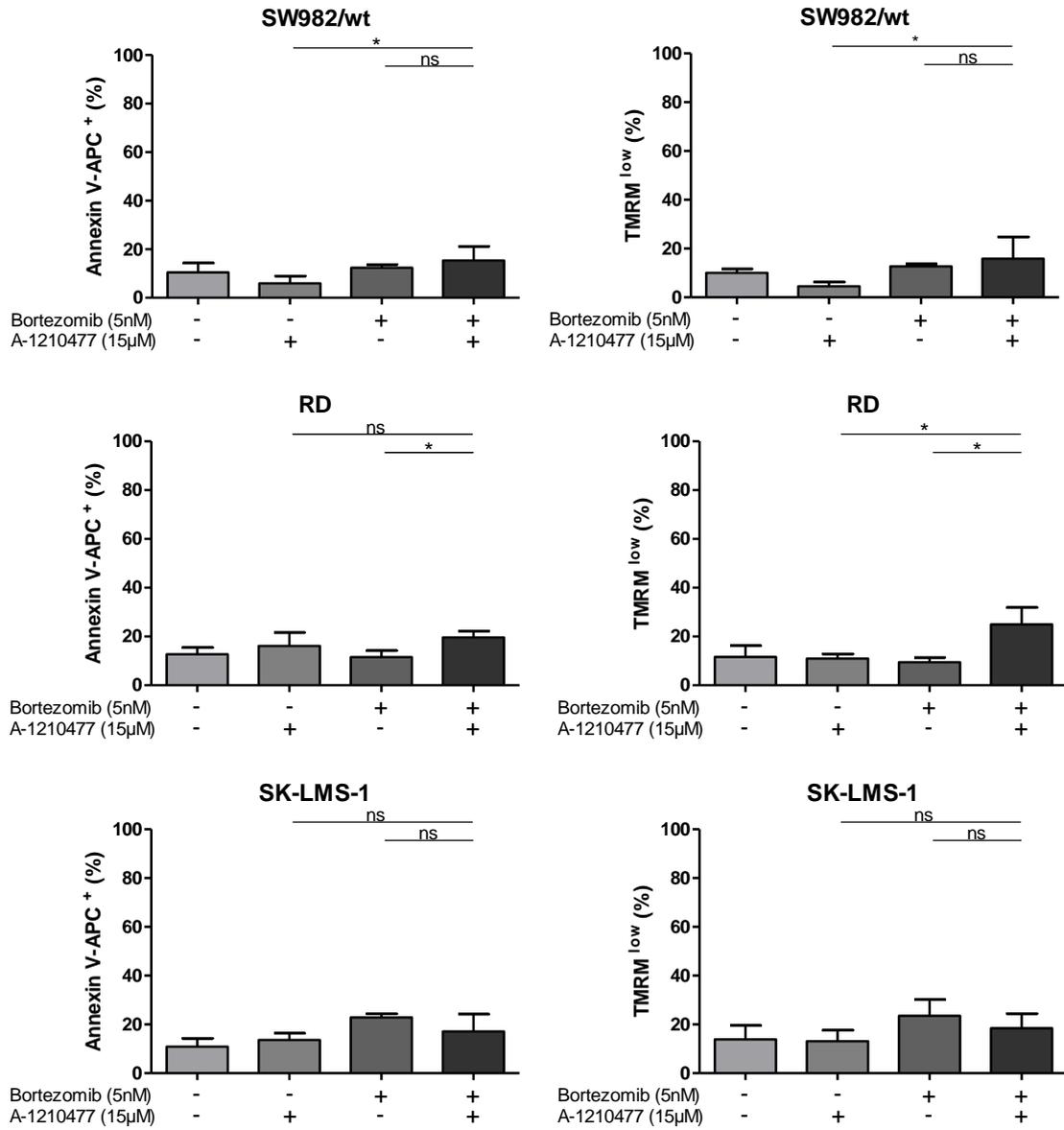


**Abbildung 8 | Konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch A-1210477 und/oder Bortezomib.**  $1,5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 wurden pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von A-1210477 (Mcl-1-Inhibitor) und/oder Bortezomib inkubiert. Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch mithilfe einer Annexin V-APC- und TMRM-Färbung analysiert. Lediglich die simultane Inkubation mit den höchsten verwendeten Dosierungen (30 µM A-1210477 + 10 nM Bortezomib) führte in mehr als 20% der Zellen zu einer Phosphatidylserinexposition und in mehr als 25% der Zellen zu einer mitochondrialen Depolarisation. Dargestellt sind Messungen (Mittelwert  $\pm$  SD) aus drei bzw. vier unabhängigen Experimenten ( $n = 3$  für RD und SK-LMS-1,  $n = 4$  für SW982/wt).

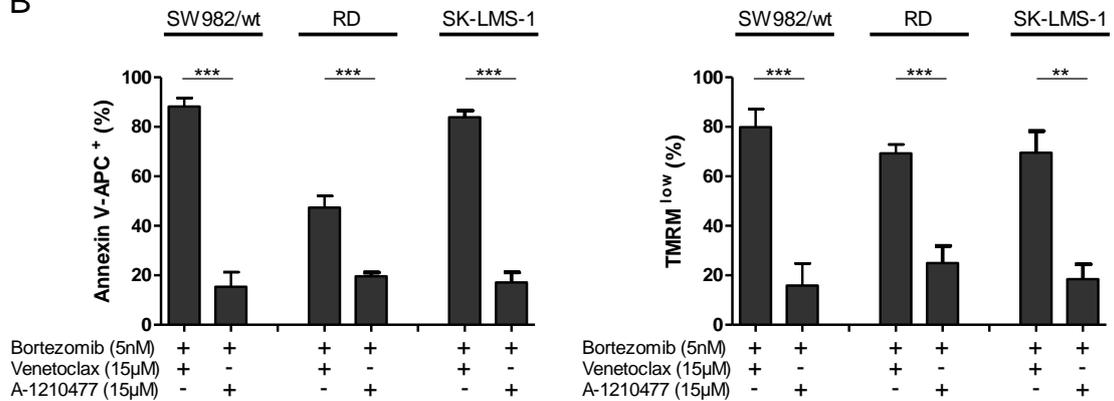
Die direkte Gegenüberstellung der FACS-Messwerte zeigte, dass im Vergleich zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen und der Kontrolle eine simultane Inkubation mit 15 µM A-1210477 und 5 nM Bortezomib nur in einem gering erhöhten Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup> Zellen resultierte (Abb. 9A). Der Zelltod (Annexin V-APC<sup>+</sup>, TMRM<sup>low</sup>) lag bei gleichzeitiger Inkubation mit 15 µM A-1210477 und 5 nM Bortezomib in allen Zelllinien unter 25%. Es erfolgte ein direkter Vergleich der Effektivität in der Zelltodinduktion zwischen Venetoclax&Bortezomib und A-1210477&Bortezomib (Abb. 9B).

Eine Kombination von 15 µM A-1210477 und 5 nM Bortezomib führte bei gleicher Dosierung in einem signifikant geringeren Anteil der Zellen zu einer Exposition von Phosphatidylserin bzw. einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als Venetoclax&Bortezomib (Abb. 9B). Eine Inkubation mit A-1210477&Bortezomib induzierte im Vergleich zu Venetoclax&Bortezomib lediglich 15% vs. 88% (SW982/wt,  $p < 0,001$ ), 20% vs. 47% (RD,  $p < 0,001$ ) und 17% vs. 84% (SK-LMS-1,  $p < 0,001$ ) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen. Der Anteil TMRM<sup>low</sup> Zellen lag in Gegenwart von A-1210477&Bortezomib im Vergleich zu Venetoclax&Bortezomib bei 16% vs. 80% (SW982/wt,  $p < 0,001$ ), 25% vs. 69% (RD,  $p < 0,001$ ) und 18% vs. 70% (SK-LMS-1,  $p = 0,0011$ ).

A



B



### **Abbildung 9 | Apoptoseinduktion durch A-1210477 und/oder Bortezomib.**

(A) Dargestellt sind die Daten aus Abb. 8 ( $n = 3$  für RD und SK-LMS-1,  $n = 4$  für SW982/wt). Bei maximal 25% Apoptoseinduktion durch die simultane Inkubation mit  $15 \mu\text{M}$  A-1210477 und  $5 \text{ nM}$  Bortezomib konnte in allen drei Zelllinien zu mindestens einer der alleinigen Inkubationen kein signifikanter Unterschied in der Zelltodrate mehr festgestellt werden. (B) Direkter Vergleich der Zelltodinduktion durch Venetoclax&Bortezomib und A-1210477&Bortezomib. Die Werte der dargestellten Inkubationen wurden aus Abb. 5 und Abb. 9A übernommen und gegenübergestellt. Eine Kombination von Bortezomib mit einem Mcl-1-Inhibitor erzielte in allen getesteten Zelllinien signifikant weniger Zelltod als eine Kombination von Bortezomib mit einem Bcl-2-Inhibitor. Gezeigt ist wieder der Mittelwert  $\pm$  SD (t-Test: ns = nicht signifikant bei  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

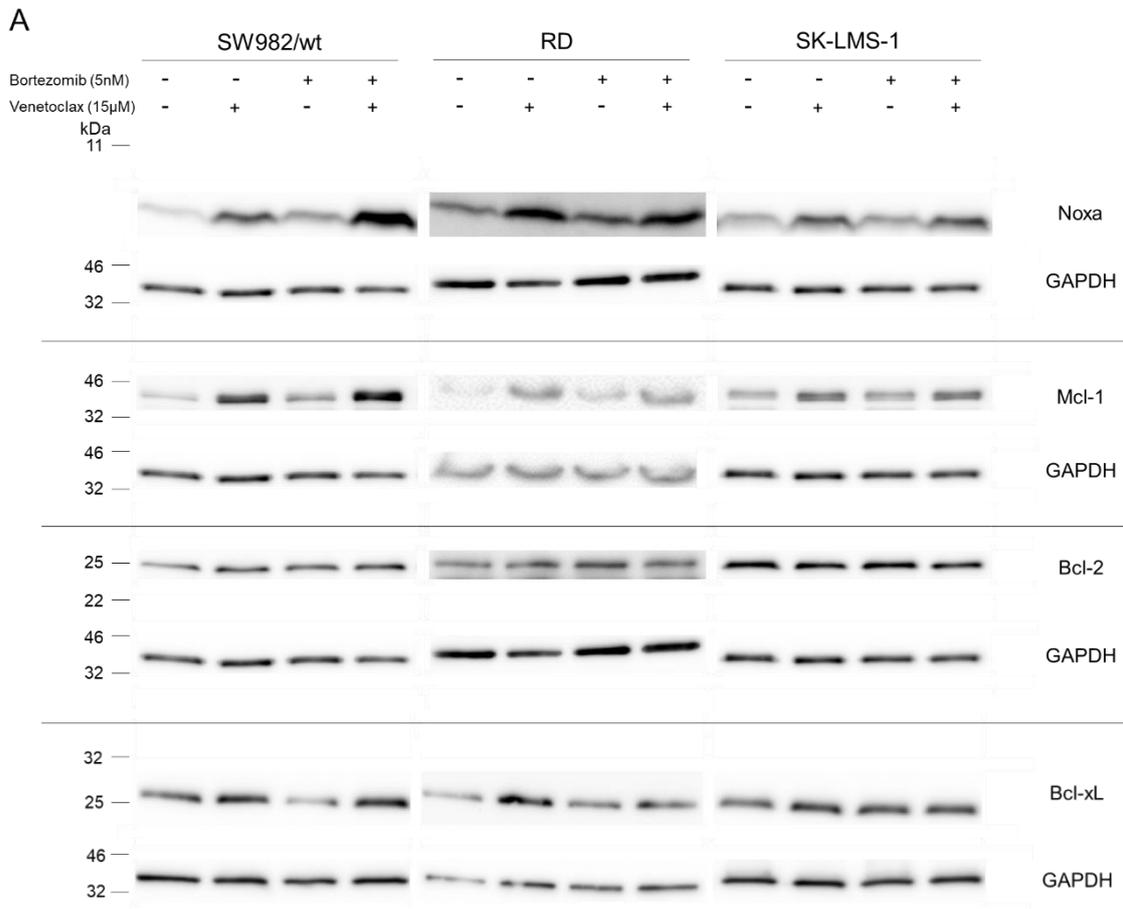
Zusammenfassend induzierte in jeder der getesteten Zelllinie (SW982/wt, RD und SK-LMS-1) die alleinigen Inkubationen mit  $15 \mu\text{M}$  A-1210477 bzw.  $5 \text{ nM}$  Bortezomib ähnliche Zelltodraten wie A-1210477&Bortezomib. Eine simultane Inkubation konnte somit in dieser Dosierung keine signifikant erhöhte Apoptoseinduktion erreichen. A-1210477&Bortezomib bewirkte bei gleicher Konzentration eine deutlich geringere Zelltodinduktion als Venetoclax&Bortezomib und führte in weniger als 25% der Zellen zu detektierbaren Apoptosezeichen (Exposition von Phosphatidylserin bzw. mitochondriale Depolarisation).

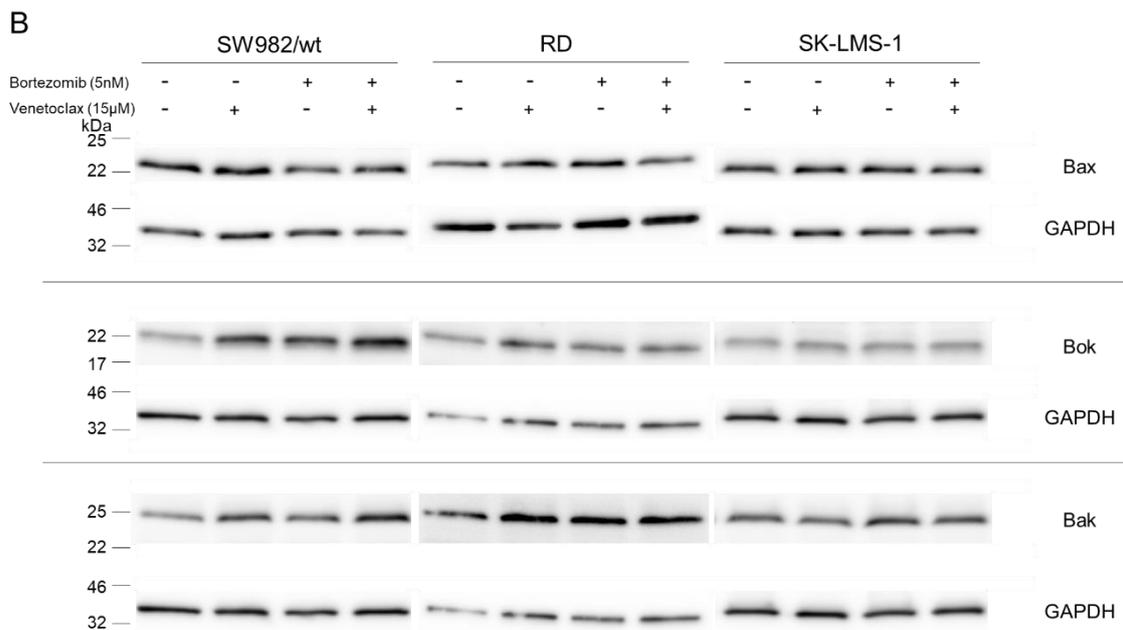
Bei gleicher Dosierung bewirkte die Kombination von Bortezomib mit dem Bcl-2-Inhibitor (Venetoclax) die höchsten Zelltodraten (Venetoclax&Bortezomib:  $> 80\%$  Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen in SW982/wt und SK-LMS-1,  $\sim 70\%$  TMRM<sup>low</sup> Zellen in RD), während die Kombination mit dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor (A-1155463) geringere Zelltodraten (A-1155463&Bortezomib:  $< 45\%$  avitale Zellen in SW982/wt und RD,  $\sim 60\%$  avitale Zellen in SK-LMS-1) und mit dem Mcl-1-Inhibitor (A-1210477) einen vernachlässigbaren Anteil apoptotischer Zellen (A-1210477&Bortezomib:  $< 25\%$  avitale Zellen in SW982/wt, RD und SK-LMS-1) induzierte. Dies zeigt deutlich, dass Bcl-2 eine zentrale Rolle bei der synergistischen Apoptoseinduktion von Venetoclax und Bortezomib spielt.

### 3.2 Wirkung von Venetoclax und Bortezomib auf die Proteinexpression

#### 3.2.1 Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen unter Venetoclax und/oder Bortezomib Inkubation in SW982/wt, RD und SK-LMS-1

Um den Mechanismus der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib näher zu analysieren, wurde die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden  $1,7 \times 10^6$  Zellen der Zelllinie SK-LMS-1,  $1 \times 10^6$  Zellen der Zelllinie RD und  $2 \times 10^6$  Zellen der Zelllinie SW982/wt pro Petrischale ( $\varnothing$ : 100 mm) ausgesät und mit  $15 \mu\text{M}$  Venetoclax und/oder  $5 \text{ nM}$  Bortezomib sowie  $10 \mu\text{M}$  Q-VD-Oph für 8 h inkubiert. Nach der Zellyse wurden die löslichen Proteine entsprechend ihrer scheinbaren Größe mithilfe einer Gelelektrophorese getrennt und die Expression ausgewählter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde als Ladekontrolle GAPDH nachgewiesen.





**Abbildung 10 | Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in SW982/wt, RD und SK-LMS-1 nach Inkubation in An- und/oder Abwesenheit von Venetoclax und Bortezomib.**  $1,7 \times 10^6$  (SK-LMS-1),  $1 \times 10^6$  (RD) bzw.  $2 \times 10^6$  (SW982/wt) Zellen/Petrischale ( $\varnothing$ : 100 mm) wurden mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib für 8 h inkubiert. Dem Kulturmedium wurden 10  $\mu$ M Q-VD-Oph zugegeben. Je 30  $\mu$ g Protein wurden im Western Blot analysiert. kDa: Kilodalton. (A) Die alleinige und simultane Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib führte zu erhöhten Mcl-1- und Noxa-Spiegeln. Die Expression von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> blieb nahezu unbeeinflusst. (B) In SW982/wt erzielte die alleinige und simultane Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib eine Akkumulation von Bok. Zudem konnte eine erhöhte Expression von Bak nach Venetoclax&Bortezomib Inkubation festgestellt werden. Bax-Level blieben hingegen in allen Zelllinien unabhängig von der Präsenz der Wirkstoffe relativ konstant [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

Die relative Bandenintensität von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> blieb über die verschiedenen Wirkstoffinkubationen nahezu konstant. Es wurden keine einheitlichen Änderungen der Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Proteinexpression über alle getesteten Zelllinien festgestellt. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib sowie die simultane Gegenwart von Venetoclax&Bortezomib in den Zelllinien SW982/wt, RD und SK-LMS-1 zu einer erhöhten Expression des *BH3-only* Proteins Noxa und seines Gegenspielers Mcl-1 (Abb. 10A).

In den Zelllinien SK-LMS-1 und RD bewirkte weder eine alleinige noch eine simultane Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib eine eindeutige Änderung der relativen Bandenintensitäten der Effektorproteine (MDPs) Bax, Bak und Bok

(Abb. 10B). Hingegen führte in SW982/wt Zellen sowohl die Gegenwart der einzelnen Wirkstoffe als auch eine Venetoclax&Bortezomib Inkubation zu einer deutlichen Erhöhung der Bok-Spiegel. Auch die relative Bandenintensität von Bak scheint nach der simultanen Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib in SW982/wt erhöht (Abb. 10B).

Zusammenfassend führte eine simultane Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax und 5 nM Bortezomib in allen getesteten Zelllinien zu einer erhöhten Expression von Mcl-1 und Noxa. Die Gegenwart beider Wirkstoffe erzielte zudem erhöhte Bok- und Bak-Level in SW982/wt.

### 3.2.2 Mitochondriale Clusterbildung der MDPs Bax, Bak und Bok

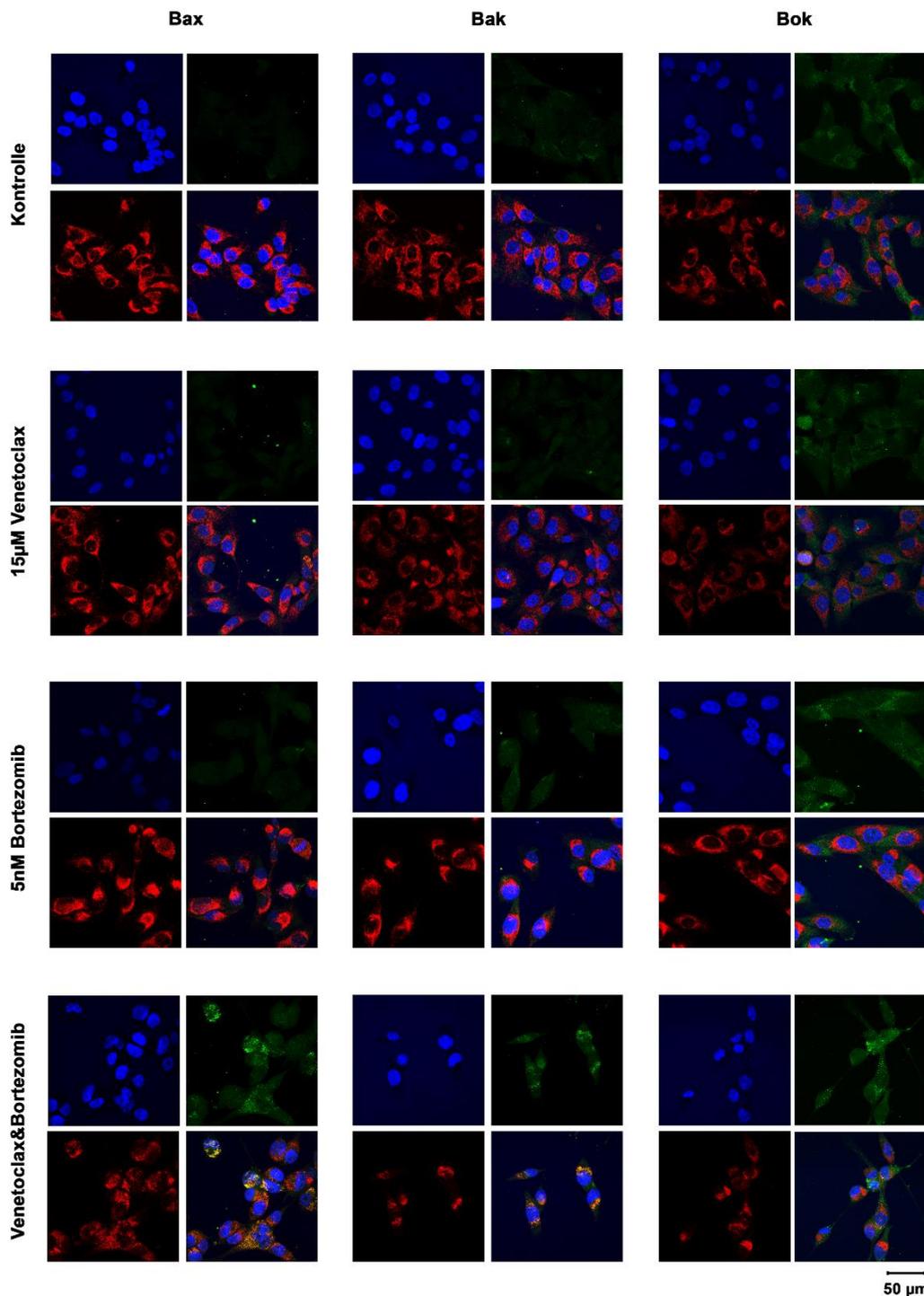
Im vorherigen Abschnitt wurde die Expression der MDPs Bax, Bak und Bok betrachtet. Während Bok als aktives Protein gebildet und seine Aktivität über die Instabilität und den Abbau reguliert wird sagt die Expression von Bax und Bak nichts über deren Aktivitätszustand aus. Die aktiven Konformere von Bax und Bak oligomerisieren an der äußeren Mitochondrienmembran. Daher wurde die Oligomerisierung von Bax und Bak am Mitochondrium mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. 50.000 Zellen/Well wurden für 24 h mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib inkubiert. Der zugesetzte pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph (10  $\mu$ M) verhinderte das Ablösen der Zellen durch Apoptoseinduktion. Nach Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern erfolgte die Färbung mithilfe fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper und Hoechst 34580. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop Leica TCS SP8 angefertigt.

Tom20 ist ein Bestandteil des Translokase-Proteinkomplexes der äußeren Membran des Mitochondriums (*translocase of the outer membrane*, Tom) und diente der Visualisierung der Mitochondrien (rot) (Abb. 11). Bax, Bak bzw. Bok sind in grün dargestellt. Die Zellkerne sind mittels Hoechst 34580 blau gefärbt. In den Kontrollzellen (DMSO-Kontrolle) waren wie erwartet weder Bax- oder Bak-Oligomere noch eine Bok-Clusterbildung sichtbar. Auch die alleinige Inkubation mit Venetoclax oder Bortezomib resultierte nicht in der Clusterbildung der MDPs. Hingegen war bei simultaner Gegenwart von Venetoclax und Bortezomib die

Bax- und Bak-Oligomerisierung am Mitochondrium deutlich erkennbar (Abb. 11). In den dargestellten 2D-Bildern überlagert sich zum Teil die rote Farbe der Mitochondrien mit der grünen Farbe der MDPs, was die stellenweise gelbe Farbe erklärt. Zusätzlich führte die Inkubation mit Venetoclax & Bortezomib zu einer Clusterbildung von Bok in SW982/wt (Abb. 11).

Zusammenfassend resultierte ausschließlich eine simultane Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax und 5 nM Bortezomib in einer mitochondrialen Bax- und Bak-Oligomerisierung sowie in Bok-Clustern. Die Gegenwart lediglich eines Wirkstoffes erzielte keine Clusterbildung der MDPs.

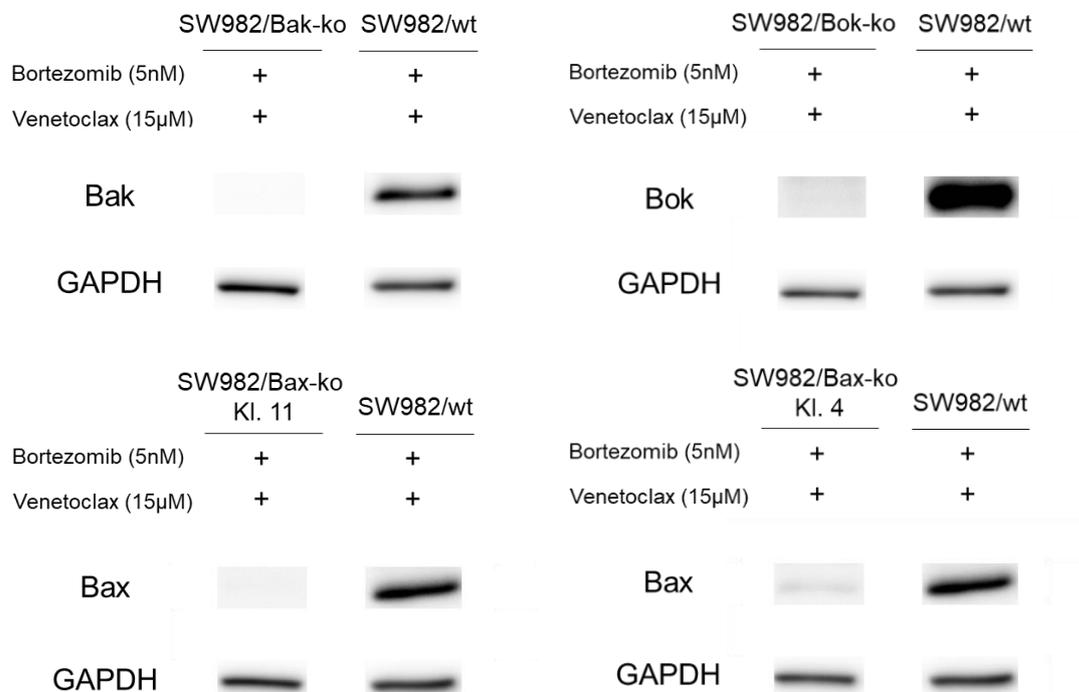
SW982/wt



**Abbildung 11 | Venetoclax&Bortezomib induziert mitochondriale Clusterbildung der MDPs Bax, Bak und Bok.** 50.000 SW982/wt Zellen wurden mit 15 µM Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib (+10 µM Q-VD-Oph) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Ausschließlich die simultane Inkubation (Venetoclax&Bortezomib) resultierte in mitochondrialer Oligomerisierung von Bax und Bak sowie der Bildung von Bok-Clustern. Blau (Zellkerne): Hoechst 34580, rot (Mitochondrium): Tom20, grün (MDP): Bax, Bak bzw. Bok [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

### 3.3 Einfluss von MDP *knock-outs* auf die Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in SW982

Bisherige Experimente zeigten eine Beschränkung der synergistischen Zelltodinduktion auf die Kombination von Bortezomib mit der Bcl-2-Inhibition (Kapitel 3.1) sowie eine deutliche Aktivierung und mitochondriale Oligomerisierung von Bax nach Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib (Kapitel 3.2.2), was auf eine zentrale Rolle der Bcl-2/Bax-Achse in der Zelltodinduktion hinweisen könnte. Zudem führte die gleichzeitige Gegenwart beider Wirkstoffe zur Aktivierung von Bak und Akkumulation von Bok (Kapitel 3.2). Um den jeweiligen Einfluss der MDPs Bax, Bak und Bok weitergehend zu analysieren, wurden Bax, Bak und Bok *knock-out* Zellen der Zelllinie SW982 mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode hergestellt. Für die weiteren Experimente wurden die erzeugten klonalen Zelllinien SW982/Bax-ko Klon 4, SW982/Bax-ko Klon 11, SW982/Bak-ko und SW982/Bok-ko verwendet (Abb. 12), in denen die Expression der übrigen MDPs bzw. der Bcl-2 Familienproteine im Vergleich zur Wildtypzelllinie weitgehend unverändert war.



**Abbildung 12 | Expression der MDPs in SW982/wt und monoklonaler *knock-out* Sublinien.**  $2 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien SW982/wt, SW982/Bak-ko, SW982/Bok-ko, SW982/Bax-ko Klon 11 und SW982/Bax-ko Klon 4 wurden pro Petrischale ( $\varnothing$ : 100 mm) ausgesät und mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib (+ 10  $\mu$ M Q-VD-Oph) für

8 h inkubiert. Je 30 µg Protein wurden mittels Western Blot analysiert. In den *knock-out* Zelllinien konnte jeweils Bok (SW982/Bok-ko), Bak (SW982/Bak-ko) bzw. Bax (SW982/Bax-ko Klon 11) nicht nachgewiesen werden. In SW982/Bax-ko Klon 4 erschien nach einer langen Belichtungszeit eine Bax-Bande, die jedoch deutlich schwächer war als in SW982/wt.

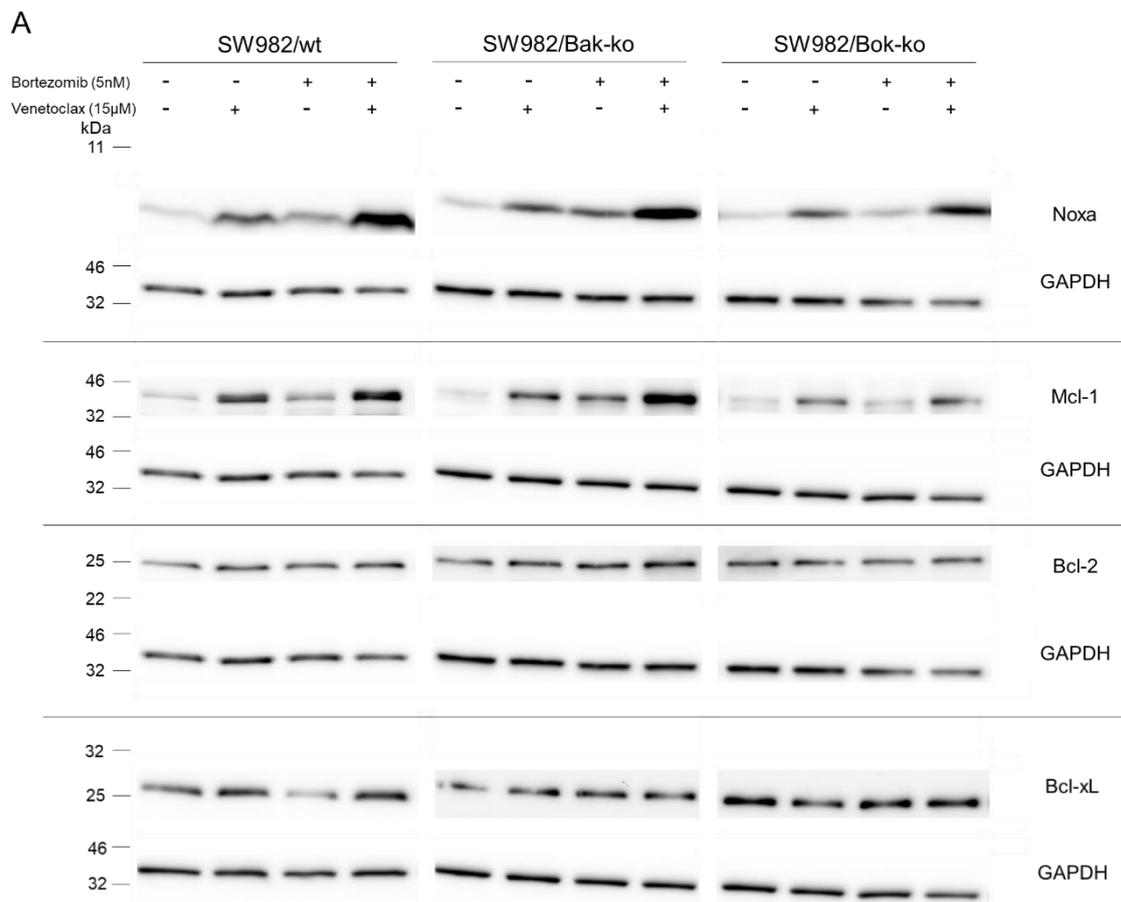
### 3.3.1 Expression von pro- und anti-apoptischen Proteinen unter Venetoclax und/oder Bortezomib Inkubation in SW982/wt und MDP *knock-out* Zelllinien

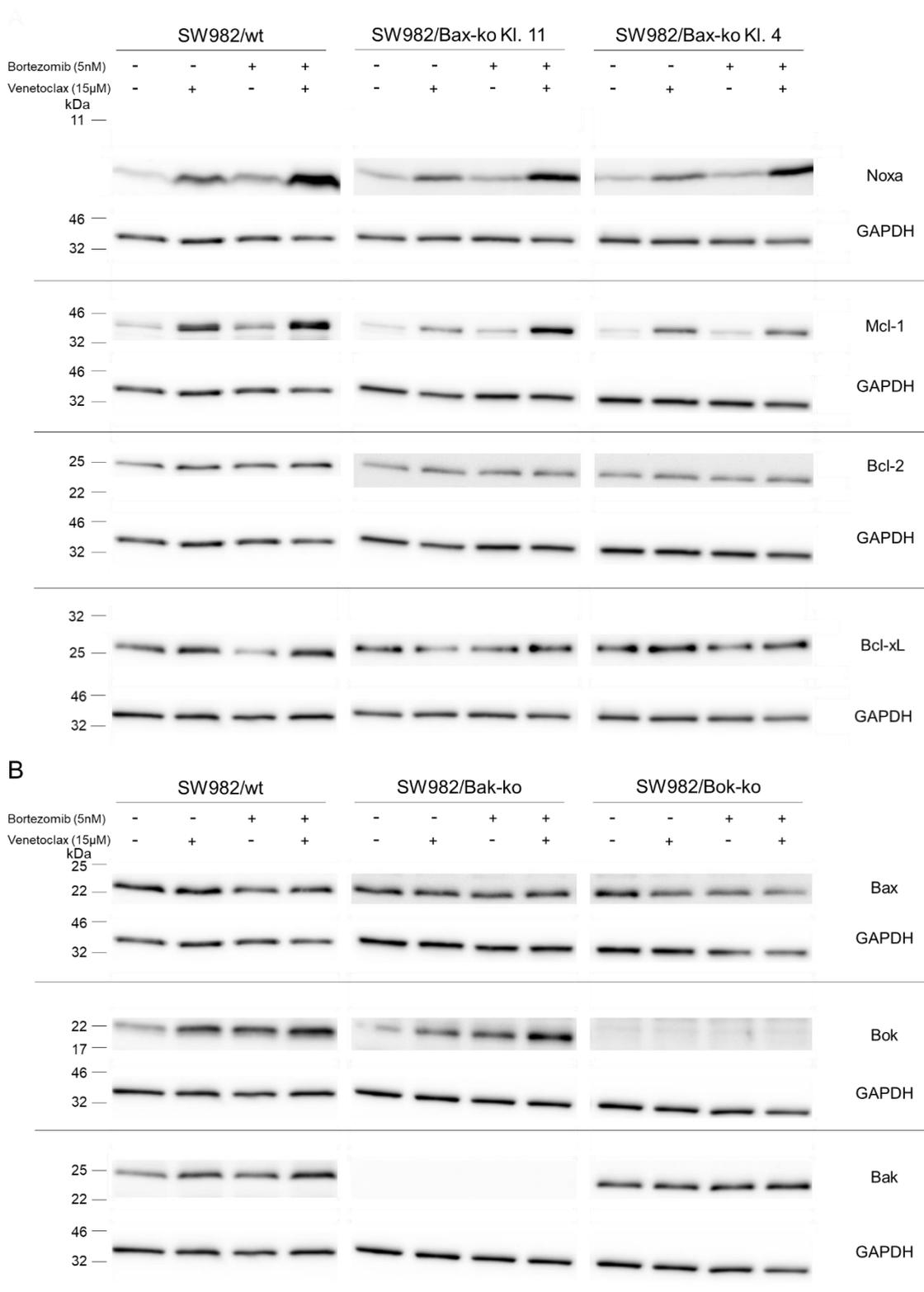
Um etwaige Unterschiede in der Regulation der Expression von pro- und anti-apoptischen Proteinen als Reaktion auf die Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib festzustellen, wurden  $2 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien SW982/wt, SW982/Bak-ko, SW982/Bok-ko, SW982/Bax-ko Klon 11 und SW982/Bax-ko Klon 4 pro Petrischale (Ø: 100 mm) ausgesät und mit 15 µM Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib für 8 h inkubiert. Je 30 µg Protein wurden mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde als Ladekontrolle GAPDH nachgewiesen.

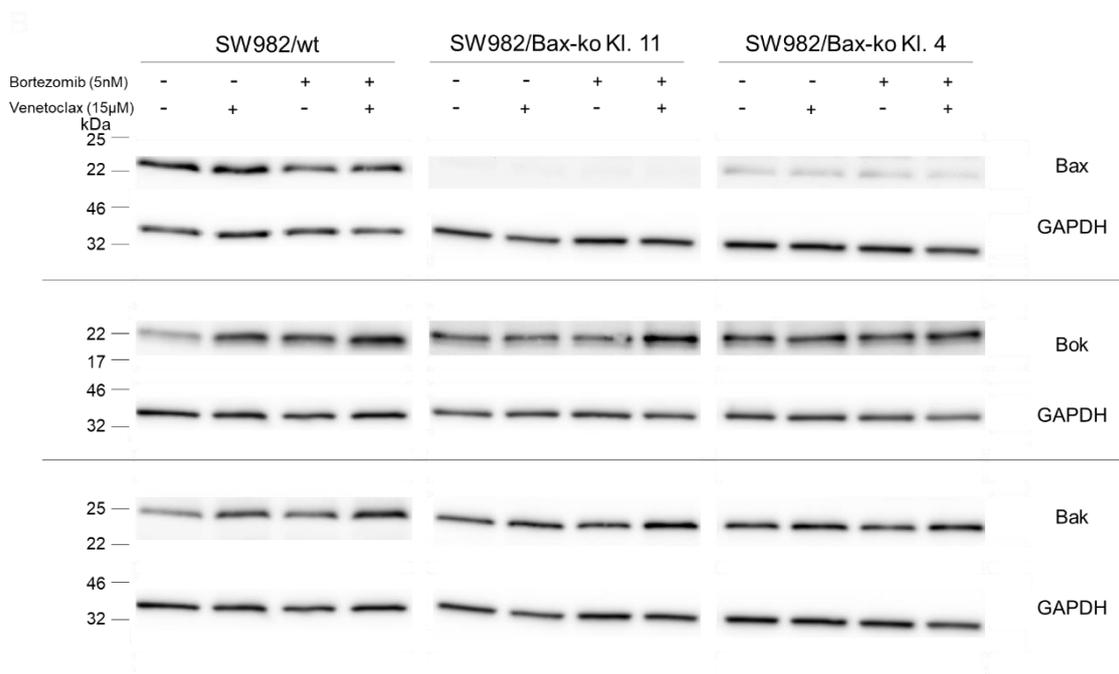
Wie in SW982/wt hatte die Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib auch in den *knock-out* Zelllinien (nahezu) keinen Einfluss auf die relative Bandenintensität der Bcl-2 Familienproteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (Abb. 13A). Zudem verhielt sich die Regulation des *BH3-only* Proteins Noxa und Mcl-1 in den *knock-out* Zellen wie in der Wildtypzelllinie. Auch hier führte eine alleinige Inkubation mit Venetoclax oder Bortezomib zu einer erhöhten Expression von Noxa und Mcl-1. Besonders eindrücklich war dies im Bak-ko zu sehen. Die stärkste relative Bandenintensität von Noxa und Mcl-1 resultierte jedoch in allen getesteten Zelllinien nach Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib. Für Mcl-1 muss dabei in den Zelllinien SW982/Bok-ko und SW982/Bax-ko Klon 4 berücksichtigt werden, dass leicht geringere Proteinmengen (GAPDH-Bande) eingesetzt wurden.

Abbildung 12 und 13B zeigen den erfolgreichen *knock-out* des jeweiligen MDPs. Selbst nach langer Belichtungszeit konnte kein Bak (SW982/Bak-ko), Bok (SW982/Bok-ko) bzw. Bax (SW982/Bax-ko Klon 11) nachgewiesen werden. SW982/Bax-ko Klon 4 zeigte nach Überbelichtung minimale Proteinexpression von Bax, die jedoch deutlich geringer als in SW982/wt ausfiel.

Unter Berücksichtigung der relativen GAPDH-Bandenintensitäten konnte, wie in SW982/wt, eine Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib weder in SW982/Bak-ko noch in SW982/Bok-ko im Vergleich zur Kontrolle veränderte Bax-Spiegel induzieren (Abb. 13B). Analog zur Wildtypzelllinie akkumulierte Bok in Gegenwart von Venetoclax und/oder Bortezomib in SW982/Bak-ko. Die simultane Inkubation mit beiden Wirkstoffen führte auch bei einem Bak-ko zu einer erhöhten relativen Bandenintensität von Bok. Zudem konnte Venetoclax&Bortezomib die Expression von Bak in SW982/Bok-ko und in SW982/Bax-ko minimal erhöhen (beachte GAPDH-Bandenintensität).







**Abbildung 13 | Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in SW982/wt und korrespondierender MDP *knock-out* Zelllinien.**  $2 \times 10^6$  Zellen/Petrischale ( $\varnothing$ : 100 mm) der Zelllinien SW982/wt, SW982/Bak-ko, SW982/Bok-ko, SW982/Bax-ko Klon 11 und SW982/Bax-ko Klon 4 wurden mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib (+ 10  $\mu$ M Q-VD-Oph) für 8 h inkubiert. Je 30  $\mu$ g Protein wurden im Western Blot analysiert. kDa: Kilodalton. (A) Während die Gegenwart lediglich eines Wirkstoffes bereits die relativen Bandenintensitäten von Noxa und Mcl-1 erhöhten, bewirkte die simultane Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib in allen Zelllinien die stärksten Bandenintensitäten. Wie in SW982/wt blieben die Bcl-x<sub>L</sub>- und Bcl-2-Spiegel über die Inkubationen hinweg weitgehend konstant. (B) Die *knock-outs* der jeweiligen MDPs (SW982/Bak-ko, SW982/Bok-ko, SW982/Bax-ko Klon 11) waren erfolgreich. In SW982/Bax-ko Klon 4 zeigte sich noch eine minimale Bax-Bande nach langer Belichtungszeit. Eine Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib führte in allen Bok-exprimierenden Zelllinien zu einer Akkumulation des Proteins [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

Zusammenfassend wurden im Vergleich zur Wildtypzelllinie keine deutlichen Unterschiede in der Regulation der Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine infolge der Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib festgestellt. Analog zu SW982/wt führte eine Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib auch in allen MDP *knock-out* Zelllinien zu einer deutlichen Akkumulation von Noxa, Mcl-1 und Bok. Die Gegenwart beider Wirkstoffe resultierte ebenfalls in einer leichten Erhöhung der Bak-Expression, während die relativen Bandenintensitäten von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax von einer Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib (nahezu) unbeeinflusst blieben.

### 3.3.2 Durchflusszytometrischer Zelltodnachweis nach Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib

SW982/wt, SW982/Bok-ko, SW982/Bak-ko und SW982/Bax-ko (Klon 4 und 11) wurden mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Annexin V-APC- und TMRM-Färbung und durchflusszytometrische Analyse (Annexin V-APC<sup>+</sup>, TMRM<sup>low</sup>).

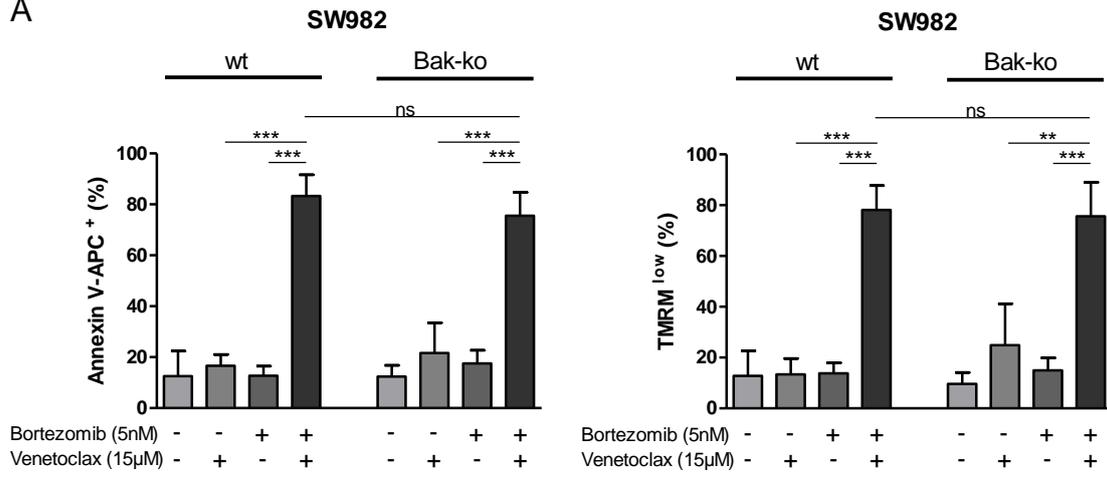
Die Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib resultierte, wie bereits in Kapitel 3.1.1 gezeigt, in keiner im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhten Apoptoseinduktion in SW982/wt. Der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen mit 17% (Venetoclax) bzw. 13% (Bortezomib) sowie TMRM<sup>low</sup> Zellen mit 13% (Venetoclax) und 14% (Bortezomib) lag dabei auf Höhe der Kontrollansätze (13% Annexin V-APC<sup>+</sup> und TMRM<sup>low</sup>). Wie erwartet konnte die Gegenwart lediglich eines Wirkstoffes auch in keiner der MDP *knock-out* Zelllinien massiv Zelltod induzieren (Abb. 14). So waren nach alleiniger Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax 22% (SW982/Bak-ko), 21% (SW982/Bok-ko), 9% (SW982/Bax-ko Klon 11) bzw. 10% (SW982/Bax-ko Klon 4) der Zellen Annexin V-APC<sup>+</sup> und 25% (SW982/Bak-ko), 23% (SW982/Bok-ko), 9% (SW982/Bax-ko Klon 11) bzw. 10% (SW982/Bax-ko Klon 4) der Zellen zeigten eine mitochondriale Depolarisation (TMRM<sup>low</sup>). Nach Inkubation mit 5 nM Bortezomib lag der Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen bei 18% (SW982/Bak-ko), 14% (SW982/Bok-ko), 9% (SW982/Bax-ko Klon 11) bzw. 10% (SW982/Bax-ko Klon 4), der Anteil TMRM<sup>low</sup> Zellen bei 15% (SW982/Bak-ko), 14% (SW982/Bok-ko), 16% (SW982/Bax-ko Klon 11) bzw. 10% (SW982/Bax-ko Klon 4). Damit zeigten weniger als 25% der Zellen aller *knock-out* Zelllinien Apoptosezeichen.

Eine simultane Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax und 5 nM Bortezomib erzielte in 76% der SW982/Bak-ko Zellen eine Exposition von Phosphatidylserin und einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Diese Werte sind mit der durch Venetoclax&Bortezomib hervorgerufenen Zelltodinduktion in SW982/wt mit 83% ( $p = 0,1611$ ) Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen und 78% ( $p = 0,7016$ ) TMRM<sup>low</sup> Zellen vergleichbar, ein Bak-ko konnte also die Zelltodinduktion nicht signifikant verringern (Abb. 14A). Analog induzierte die simultane Inkubation trotz eines Bok

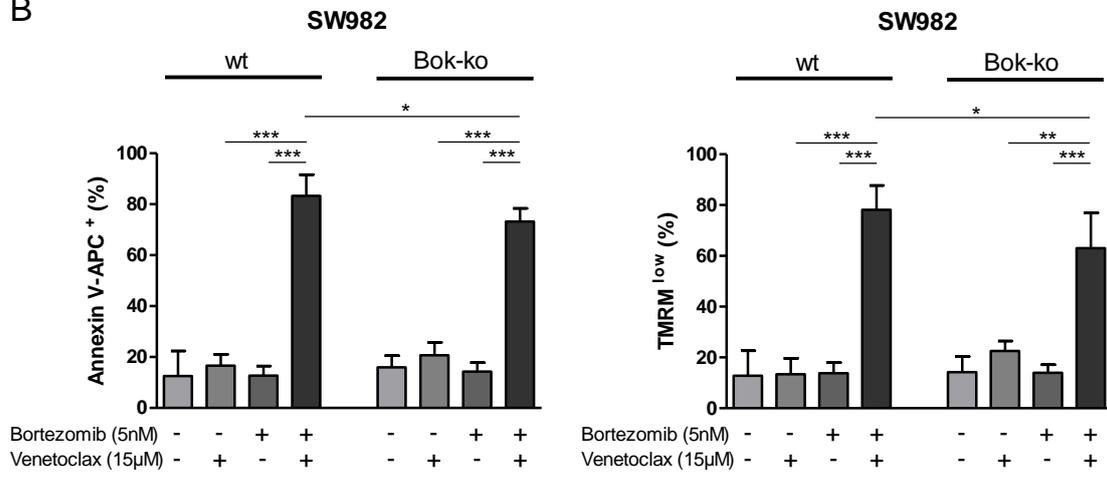
*knock-outs* mit 73% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen in ähnlichem Maße Zelltod. Die Reduktion des Zelltodes von 83% in SW982/wt auf 73% in SW982/Bok-ko war jedoch bereits signifikant ( $p = 0,0497$ ) (Abb. 14B). Die Reduktion des durch Venetoclax&Bortezomib Inkubation induzierten TMRM<sup>low</sup> Zellanteils bei SW982/Bok-ko im Vergleich zu SW982/wt war wiederum mit einem p-Wert von 0,0411 signifikant. Dennoch wiesen 63% und damit ein Großteil der SW982/Bok-ko Zellen einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials im Sinne der beginnenden Apoptose auf.

Im Gegensatz dazu resultierte ein *knock-out* des MDPs Bax in einem im Vergleich zu SW982/wt deutlich verringertem Zelltod nach Venetoclax&Bortezomib Inkubation. In Gegenwart beider Wirkstoffe waren lediglich 32% der SW982/Bax-ko Klon 11 bzw. 44% der SW982/Bax-ko Klon 4 Zellen Annexin V-APC<sup>+</sup>, was im Vergleich zu SW982/wt mit 83% Zelltod einer hoch signifikanten Reduktion entspricht ( $p < 0,001$ ) (Abb. 14C). Auch der Anteil an TMRM<sup>low</sup> Zellen sank im Vergleich zu SW982/wt mit 78% durch einen Bax-ko signifikant auf 43% (SW982/Bax-ko Klon 11) bzw. 49% (SW982/Bax-ko Klon 4) ( $p < 0,001$ ). Zudem wurde bei SW982/Bax-ko Klon 11 zwischen einer alleinigen Bortezomib Inkubation und der zusätzlichen Addition von Venetoclax kein signifikanter Unterschied in der mitochondrial depolarisierten Zellzahl gefunden ( $p = 0,0502$ ). Mit einem Anteil Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen von 32% nach Venetoclax&Bortezomib Inkubation im Vergleich zu 9% ( $p = 0,0232$ ) in Gegenwart von 15  $\mu$ M Venetoclax und 9% ( $p = 0,0268$ ) in Gegenwart von 5 nM Bortezomib sowie einem Anteil an TMRM<sup>low</sup> Zellen von 43% nach Venetoclax&Bortezomib vs. 9% nach alleiniger Venetoclax Inkubation ( $p = 0,0255$ ) erhielten auch die übrigen Gegenüberstellungen bei SW982/Bax-ko Klon 11 im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien nur noch einen Signifikanzstern (Abb. 14C).

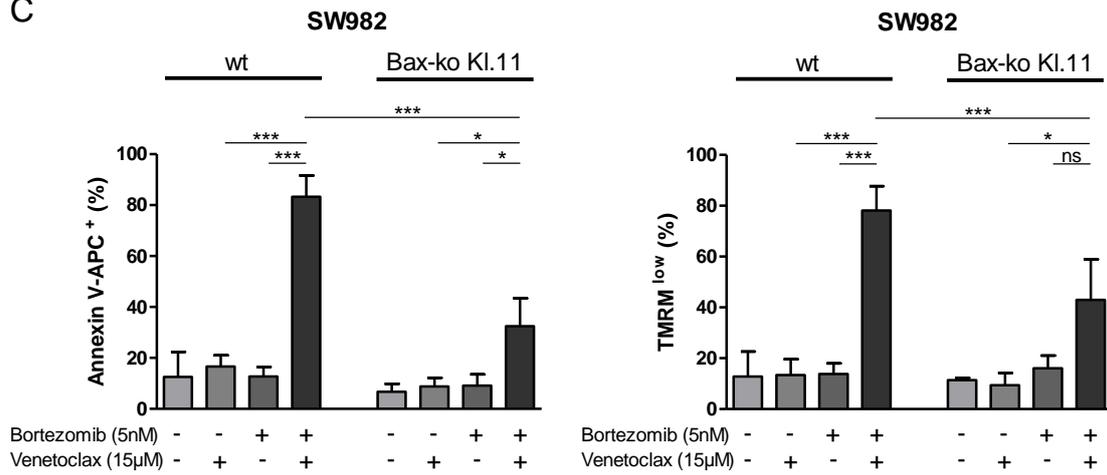
A

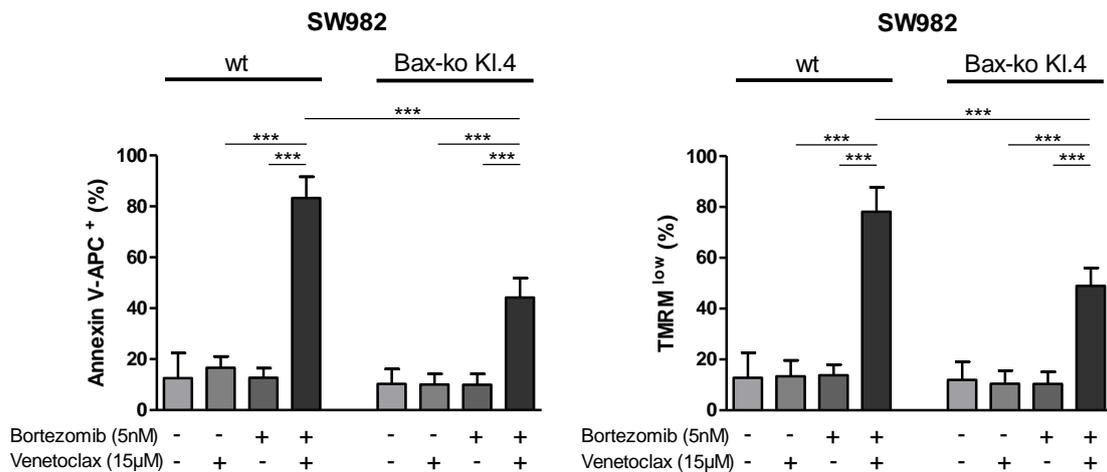


B



C





**Abbildung 14 | Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in SW982/wt und SW982/MDP *knock-out* Sublinien.**  $0,7 \times 10^5$  Zellen/Well (12-Well Platte) wurden mit  $15 \mu\text{M}$  Venetoclax und/oder  $5 \text{ nM}$  Bortezomib für 24 h inkubiert. Nach der Annexin V-APC- und TMRM-Färbung erfolgte die durchflusszytometrische Analyse am BD FACS Lyric. In SW982/wt, SW982/Bak-ko und SW982/Bok-ko waren die durch Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib induzierten Zelltodraten ähnlich hoch. Lediglich ein Bax-ko reduzierte die Zahl der apoptotischen Zellen auf unter 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (t-Test: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) aus 9 (SW982/wt;  $n = 9$ ), 4 (SW982/Bak-ko, SW982/Bok-ko, SW982/Bax-ko Kl. 4;  $n = 4$ ) bzw. 3 (SW982/Bax-ko Kl. 11;  $n = 3$ ) unabhängigen Experimenten [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

Zusammenfassend war lediglich bei einem *knock-out* des MDPs Bax die Zelltodinduktion durch simultane Inkubation mit  $15 \mu\text{M}$  Venetoclax und  $5 \text{ nM}$  Bortezomib auf unter 50% reduziert. In SW982/Bak-ko und SW982/Bok-ko induzierte Venetoclax&Bortezomib in vergleichbarem Umfang Zelltod wie in SW982/wt.

## 4. Diskussion

Sarkome repräsentieren eine seltene Krebserkrankung mit hoher Behandlungsresistenz und lediglich eingeschränktem Nutzen der verfügbaren Therapien für die Patienten. In Deutschland sind seit über 20 Jahren Erkrankungs- und Sterberaten weitgehend konstant, sodass die Behandlung von Sarkompatienten nach wie vor eine große Herausforderung darstellt (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021, Demicco et al., 2012, Zhang and Pollock, 2014, Judson et al., 2014, Bae et al., 2016, Laporte et al., 2017, Radic-Sarikas et al., 2017). Eine Behandlungsresistenz gegenüber Monotherapien kann aufgrund der Plastizität und Redundanz vieler Signalwege beispielsweise durch Regulation kompensatorischer Signalwege vermittelt werden (Dent et al., 2009, Yin et al., 2014). Die simultane Inhibition verwandter Signalwege (parallele Kombination) oder verschiedener Komponenten desselben Signalweges (serielle Kombination) kann somit einerseits das Risiko zur Entwicklung von Behandlungsresistenzen reduzieren, andererseits können Arzneimittelkombinationen potenziell synergistische Effekte erzielen (Laporte et al., 2017, Radic-Sarikas et al., 2017, Alcon et al., 2020, de Jong et al., 2018, Baranski et al., 2015). Daher werden, wie in der vorliegenden Arbeit, vermehrt synergistisch wirkende Arzneimittelkombinationen aus zwei oder mehr Medikamenten gesucht und charakterisiert.

Der Proteasominhibitor Bortezomib wurde bereits auf seine Wirksamkeit in Sarkompatienten getestet und zeigte in einer Phase 2 Studie als Monotherapie fortgeschrittener Sarkome lediglich eine minimale Wirkung (NCT00027716) (Maki et al., 2005). Somit ist der Wirkstoff für die Behandlung von Sarkomen eher in Kombination mit weiteren Medikamenten interessant. Trotz vielversprechender präklinischer *in vitro* Ergebnisse (Laporte et al., 2017) konnte Bortezomib in einer Phase 2 Studie auch in Kombination mit dem HDAC-Inhibitor Vorinostat kein Ansprechen in Patienten mit fortgeschrittenen Weichteilsarkomen erzielen (NCT00937495) (Attia et al., 2011). Pandit *et al.* (Pandit and Gartel, 2011) zeigte, dass eine Überexpression von Bcl-2 die Bortezomib-induzierte Apoptose

inhibiert, was eine Behandlungsresistenz verursachen kann. Bcl-2 stellt somit ein interessantes Zielmolekül für Kombinationstherapien mit Bortezomib dar.

Die synergistische Reduktion vitaler Zellen durch eine gleichzeitige Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib wurde erstmalig in unseren Vorarbeiten nachgewiesen (Münchow, 2019, Muenchow et al., 2020). Die nachfolgend verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren wurden an den durchschnittlichen IC50-Konzentrationen orientiert festgelegt. Dafür wurden die ermittelten IC50-Werte von Venetoclax und Bortezomib, also die Medikamentenkonzentrationen, die nach 48 h Inkubation die Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduzierten, über alle getesteten Sarkomzelllinien (n = 13) gemittelt und daran angelehnt die Wirkstoffkonzentrationen für die weiterführenden Experimente dieser Arbeit auf 15 µM Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib festgelegt (Münchow, 2019, Muenchow et al., 2020).

#### **4.1 Alleinige und simultane Inkubation von Sarkomzelllinien mit BH3-Mimetika und Bortezomib**

Die starke Apoptoseinduktion durch gleichzeitige Inkubation mit 15 µM Venetoclax und 5 nM Bortezomib (Münchow, 2019, Muenchow et al., 2020) wurde in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Dabei lag der Anteil apoptotischer Zellen in den Zelllinien SW982/wt und RD nach alleiniger Wirkstoffinkubation unter 18% und war damit vergleichbar zu den Kontrollansätzen, während die simultane Inkubation beider Wirkstoffe zu einer signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöhten Zelltodinduktion führte. Auch in SK-LMS-1 konnte die Kombination von 15 µM Venetoclax und 5 nM Bortezomib einen im Vergleich zu den alleinigen Inkubationen signifikant erhöhten Zelltod induzieren, jedoch resultierte die alleinige Inkubation mit 15 µM Venetoclax bereits in knapp 50% Annexin V-APC<sup>+</sup> Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Zelllinie SK-LMS-1 sensitiver auf Venetoclax reagiert als SW982/wt und RD, eine Kombination mit 5 nM Bortezomib aber dennoch die Zelltodinduktion signifikant erhöht.

Neuere Studien der letzten 5 Jahren zeigen zudem mögliche synergistische Effekte einer Kombination von Mcl-1- bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitoren mit Zytostatika wie Vincristin oder Doxorubicin und machten damit auf weitere anti-apoptotisch

wirkende Proteine der *Bcl-2 like* Gruppe als mögliche therapeutische Zielmoleküle aufmerksam. Der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1331852 zeigte beispielsweise in Kombination mit Doxorubicin eine synergistische Wirkung in Rhabdomyosarkomen (Alcon et al., 2020). In Chondrosarkomen und Osteosarkomen erzielte der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor WEHI-539 eine Sensitivierung mancher Zelllinien gegenüber Doxorubicin oder Cisplatin und der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463 führte bei Chondrosarkomen zu einer Reduktion des Tumorwachstums in einem Ratten-Modell (de Jong et al., 2018) (Baranski et al., 2015). Nachdem in Synovialsarkomen die Kombination von Venetoclax mit Doxorubicin lediglich einen minimalen Synergismus zeigte und der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor BXI-72 einen IC<sub>50</sub>-Wert von < 750 nM aufwies, schlussfolgerte Barrott et al., dass Bcl-x<sub>L</sub> eher ein vielversprechendes therapeutisches Zielmolekül darstellt als Bcl-2 (Barrott et al., 2017). Nachfolgend sollte analysiert werden, ob die synergistische Wirkung von Venetoclax und Bortezomib auf eine Kombination des Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitors A-1155463 und Bortezomib übertragbar ist. Die von Barrott et al. (Barrott et al., 2017) postulierte stärkere Wirksamkeit einer Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibition im Vergleich zu einer Bcl-2-Inhibition konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden (Abb. 4 - 7). Selbst die hohe Konzentration des Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitors A-1155463 von 30 µM resultierte in der Synovialsarkom Zelllinie SW982/wt nicht in einer starken Zelltodinduktion (< 20%). Dies könnte beispielsweise an der Verwendung eines anderen Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitors (A-1155463 vs. BXI-72) und einer anderen Synovialsarkom Zelllinie (SW982 vs. SYO1, SS1A und FUJI) liegen. Auch in der Zelllinie RD zeigte sich die Inkubation mit 30 µM A-1155463 mit < 35% Zelltod weniger wirksam als eine Inkubation mit 30 µM Venetoclax (50-60% Zelltod). Die einzige Zelllinie, die sensitiver auf eine Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibition als auf eine Bcl-2-Inhibition reagierte, war SK-LMS-1 mit bereits ca. 40% Zelltod bei einer Inkubation mit 1,5 µM A-1155463. Eine Kombination von A-1155463 und Bortezomib induzierte bei gleicher Dosierung weniger stark Zelltod als Venetoclax mit Bortezomib. Die einzige Ausnahme war die Zelltodinduktion bei niedrigen Konzentrationen (bis 6 µM A-1155463 und 2 nM Bortezomib) in SK-LMS-1. Die höhere Zelltodinduktion in SK-LMS-1 ist jedoch mit der in dieser Dosierung besseren Wirksamkeit des Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitors im Vergleich zu

Venetoclax zu erklären. Bei einer simultanen Inkubation mit 15  $\mu$ M A-1155463 und 5 nM Bortezomib (A-1155463&Bortezomib) zeigten sich zwar weiterhin signifikante Unterschiede in der Zelltodinduktion im Vergleich zu den jeweiligen alleinigen Inkubationen (Ausnahme SK-LMS-1 A-1155463 vs. A-1155463&Bortezomib), jedoch war die Zelltodinduktion im Vergleich zu Venetoclax&Bortezomib signifikant reduziert (Ausnahme SK-LMS-1 TMRM<sup>low</sup>) (Abb. 7). Bei SW982/wt und RD lag der Anteil apoptotischer Zellen nach A-1155463&Bortezomib Inkubation sogar < 45%. Somit induziert die Kombination von Bortezomib mit einem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor bei gleicher Konzentration in den untersuchten Sarkomzelllinien weniger effektiv Zelltod als mit einem Bcl-2-Inhibitor.

Es gibt zunehmend Hinweise, dass Mcl-1 eine wichtige Rolle bei Behandlungsresistenzen und dem Überleben hämatologischer und solider Tumore spielt (Alcon et al., 2020, Hird and Tron, 2019, Wang and Hao, 2019), sodass erste Mcl-1-Inhibitoren in klinischen Studien getestet werden (NCT04178902, NCT02992483, NCT04543305, NCT03672695, etc.). Erst kürzlich wurde im Jahr 2020 ein Synergismus von Vincristin und Doxorubicin mit dem Mcl-1-Inhibitor S63845 in Rhabdomyosarkomen beschrieben (Alcon et al., 2020). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Zelltodinduktion durch eine Mcl-1-Inhibition alleine und in Kombination mit Bortezomib untersucht werden. Eine alleinige Inkubation mit dem Mcl-1-Inhibitor A-1210477 führte lediglich in RD und nur bei der höchsten verwendeten Dosierung von 30  $\mu$ M zu einer Zelltodinduktion über 20% (Abb. 8). Auch eine Kombination von 15  $\mu$ M A-1210477 mit 5 nM Bortezomib (A-1210477&Bortezomib) resultierte in keiner der getesteten Zelllinien in über 25% Zelltod (Abb. 8 & 9A). Zudem zeigte sich zwischen der simultanen Inkubation mit A-1210477&Bortezomib und mindestens einer der alleinigen Wirkstoffinkubationen kein signifikant erhöhter Zelltod (Ausnahme RD TMRM<sup>low</sup> mit einem Anteil TMRM<sup>low</sup> Zellen von 11% (15  $\mu$ M A-1210477, p = 0,0274) bzw. 9,5% (5 nM Bortezomib, p = 0,0197) vs. 25% nach Inkubation mit A-1210477&Bortezomib). Die alleinige Inkubation mit 15  $\mu$ M A-1210477 bzw. 5 nM Bortezomib erzielte folglich ähnliche Zelltodraten wie die Kombination dieser Wirkstoffe. Im Vergleich zu Venetoclax&Bortezomib resultierte eine

Inkubation mit A-1210477 & Bortezomib in signifikant weniger Zelltod (Abb. 9B). Somit induzierte die Kombination von Bortezomib mit einem Mcl-1-Inhibitor in den untersuchten Sarkomzelllinien weniger effektiv Zelltod als in Kombination mit einem Bcl-2-Inhibitor.

Obwohl zunehmend weitere BH3-Mimetika (Mcl-1-Inhibitoren, Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitoren) entwickelt und analysiert werden, die in Kombination mit weiteren Wirkstoffen zum Teil synergistisch wirken und vereinzelt bereits als vielversprechendere Substanzen als Bcl-2-Inhibitoren beschrieben wurden (Alcon et al., 2020, de Jong et al., 2018, Baranski et al., 2015, Barrott et al., 2017), induzierte die Kombination von Venetoclax und Bortezomib in den in dieser Arbeit untersuchten Sarkomzelllinien am effektivsten Zelltod. Erst die höchste verwendete Dosierung von 30 µM Mcl-1-Inhibitor bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor und 10 nM Bortezomib resultierte in SW982/wt, RD und SK-LMS-1 in einer Zelltodinduktion von über 60%. Fraglich ist einerseits, ob eine solch hohe Konzentration von 30 µM BH3-Mimetikum im Patienten realisierbar ist, andererseits, ob die zum Teil synergistische Wirkung bei diesen Dosierungen bereits auf *off-target* Effekte der BH3-Mimetika zurückzuführen ist. Bei gleicher Dosierung von 15 µM BH3-Mimetikum und 5 nM Bortezomib zeigte die Kombination des Proteasominhibitors mit dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463 und vor allem mit dem Mcl-1-Inhibitor A-1210477 eine deutlich geringere Apoptoseinduktion als die Kombination des Proteasominhibitors mit dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bortezomib nicht einen parallelen Weg der Apoptoseinduktion adressiert, sondern in die gleiche Achse der intrinsischen Apoptoseinduktion wie der Mcl-1- und Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor eingreift. Die Tatsache, dass die Kombination mit dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor noch etwas höhere Zelltodraten induzierte als mit dem Mcl-1-Inhibitor könnte daran liegen, dass Bcl-x<sub>L</sub> im Gegensatz zu Mcl-1 neben Bak auch Bax inhibieren kann und somit ein Protein darstellt, das verschiedene Apoptosewege verbindet (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Fletcher et al., 2008). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse eine zentrale Rolle von Bcl-2 in der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in Sarkomen vermuten.

## 4.2 Molekularer Hintergrund der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in Weichteilsarkomen

Um den Mechanismus der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib in Weichteilsarkomen genauer zu untersuchen, wurde die Expression und Clusterbildung verschiedener Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie genauer untersucht. Die pro- und anti-apoptotischen Faktoren der Bcl-2 Proteinfamilie spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle von MOMP und damit in dem intrinsischen Apoptosesignalweg. Dabei bewirkt die mitochondriale Akkumulation und Oligomerisierung der MDPs Bax, Bak und Bok eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Westphal et al., 2011, Einsele-Scholz et al., 2016, Llambi et al., 2016). Der Porenbildung von Bax und Bak wirken die anti-apoptotischen Vertreter der *Bcl-2 like* Gruppe, unter anderem Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub>, entgegen (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007). Bok ist infolge intrinsischer Instabilität bzw. Metastabilität und spontaner Konformationsänderung konstitutiv aktiv und unterliegt einer Regulation durch proteasomalen Abbau (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018, Zheng et al., 2018). Letztlich können *BH3-only* Proteine entweder durch Inhibition der anti-apoptotischen *Bcl-2 like* Proteine, wie beispielsweise an der Inaktivierung von Mcl-1 durch Noxa gezeigt wurde (Nakajima et al., 2014, Gomez-Bougie et al., 2007), oder durch direkte Aktivierung der MDPs den apoptotischen Zelluntergang positiv beeinflussen (Pedley and Gilmore, 2016, Shamas-Din et al., 2011).

Proteasominhibitoren sind bereits gut erforschte Wirkstoffe, die durch Inhibition der zielgerichteten Proteolyse einen Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren können. So wurde nach Proteasominhibition in zahlreichen Zelllinien (z.B. Multiples Myelom, Mantelzell-Lymphom, Kolorektales Karzinom) eine erhöhte Expression von pro-apoptotischem Bok und Noxa mit nachfolgender Apoptoseinduktion beobachtet (Llambi et al., 2016, Gomez-Bougie et al., 2007, Rizzatti et al., 2008, Pandit and Gartel, 2011, Moldoveanu and Zheng, 2018). In dieser Arbeit wurde in Sarkomzelllinien nach einer Inkubation mit 5 nM Bortezomib und vor allem nach simultaner Inkubation mit

Venetoclax&Bortezomib im Western Blot eine Zunahme der relativen Bandenintensität von Noxa und seines Gegenspielers Mcl-1 nachgewiesen (Abb. 10A). Obwohl nach Inkubation mit den Wirkstoffen die relative Bandenintensität von Mcl-1, das ebenso durch das Proteasom abgebaut wird (Adams and Cooper, 2007), erhöht war überwog aufgrund der Antagonisierung durch erhöhte Noxa-Spiegel die pro-apoptotische Wirkung von Venetoclax&Bortezomib (Abb. 5). Interessanterweise erhöhte auch die Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax die Expression von Noxa und Mcl-1. Die Ursache für die Erhöhung der Proteinspiegel in diesem Kontext müsste in weiterführenden Experimenten, z.B. zu Proteininteraktionen oder in entsprechenden *knock-out* Versuchen untersucht werden. Ein häufiger Mechanismus der Venetoclaxresistenz ist die Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienproteinen, wie Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> (Yue et al., 2020). Zudem zeigte sich in SW982/wt in Gegenwart der einzelnen Wirkstoffe und vor allem nach simultaner Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib eine deutliche Akkumulation von Bok, was im Hinblick auf seine konstitutive Aktivität (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018, Zheng et al., 2018) auf eine Beteiligung von Bok bei der Apoptoseinduktion hindeutet (Abb. 10B). Auch der Bak-Spiegel scheint nach einer gleichzeitigen Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib in SW982/wt erhöht.

Die alleinige Untersuchung der Proteinspiegel von Bax und Bak erlaubt keine Aussage über deren Aktivitätszustand. Daher wurde die Aktivität der MDPs durch deren Akkumulation und Oligomerisierung am Mitochondrium immunfluoreszenzbasiert untersucht. Nach alleiniger Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax bzw. 5 nM Bortezomib zeigte sich keine Clusterbildung von Bax, Bak oder Bok am Mitochondrium (Abb. 11). Hingegen resultierte die simultane Gegenwart beider Wirkstoffe in einer mitochondrialen Bax- und Bak-Clusterbildung. Zusätzlich führte die Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib in SW982/wt zu einer Clusterbildung von Bok. Dies bestätigt die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse. Lediglich die Gegenwart beider Wirkstoffe resultiert in einer Clusterbildung von Bax, Bak und Bok und damit in einer gesteigerten Apoptoseinduktion. Dabei scheinen alle drei MDPs beteiligt zu sein (Abb. 11).

In weiteren Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der einzelnen MDPs bei der Apoptoseinduktion durch Venetoclax&Bortezomib mit Hilfe von Gen *knock-outs* in SW982 analysiert. Hierfür wurden mittels CRISPR/Cas9 Bax, Bak und Bok *knock-out* Zellen generiert. In den so generierten *knock-out* Zelllinien wurde zunächst die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib untersucht. Die Regulation der Proteinexpression, also die erhöhte oder verminderte Expression von Proteinen als Reaktion auf Inkubation mit den Wirkstoffen, glich in den MDP *knock-out* Zellen weitgehend der von SW982/wt. Auch in SW982/Bax-ko, SW982/Bak-ko und SW982/Bok-ko resultierte die alleinige und vor allem die simultane Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib in einer erhöhten Expression von Noxa und Mcl-1 (Abb. 13A). Die Expression von Bok und Bak veränderte sich nach den Wirkstoffinkubationen ähnlich wie bei SW982/wt, sofern das Protein exprimiert wurde (Abb. 13B). Analog zu SW982/wt führte eine Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib also in allen MDP *knock-out* Zelllinien zu einer deutlichen Akkumulation von Noxa, Mcl-1 und Bok (sofern exprimiert). Zusammenfassend wurden im Vergleich zur Wildtypzelllinie keine deutlichen Unterschiede in der Regulation der Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine nach Inkubation mit 15  $\mu$ M Venetoclax und/oder 5 nM Bortezomib festgestellt.

In der darauffolgenden durchflusszytometrischen Zelltodanalyse zeigte sich, ähnlich wie bei SW982/wt, in allen *knock-out* Zelllinien mit weniger als 25% apoptotischer Zellen eine äußerst geringe Zelltodinduktion durch die alleinigen Wirkstoffinkubationen (Abb. 14). In Bak-ko Zellen war die Zelltodinduktion durch Venetoclax&Bortezomib im Vergleich zur Wildtypzelllinie nicht signifikant verringert, was darauf hindeutet, dass Bak nicht essenziell für die synergistische Apoptoseinduktion ist bzw. dass die Kombination weiterhin effektiv wirken kann (Abb. 14A). Trotz eines Bok *knock-outs* induzierte die simultane Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib in ähnlichem Maße Zelltod wie in SW982/wt. Die Zelltodinduktion war zwar im Vergleich zu SW982/wt signifikant verringert ( $p = 0,0497$ ), dennoch bewirkte die Kombination mit über 70% sehr effektiv

Zelltod (Abb. 14B). Interessanterweise wurde durch einen Bax *knock-out* die durch Venetoclax&Bortezomib hervorgerufene Apoptoseinduktion deutlich reduziert (Abb. 14C). Der Anteil apoptotischer Zellen betrug trotz simultaner Wirkstoffinkubation nur noch weniger als 50%. Dabei war die Reduktion der Apoptoseinduktion durch Venetoclax&Bortezomib in SW982/Bax-ko Kl. 11 noch deutlicher als in Bax-ko Kl. 4, welcher aufgrund der schwachen Bax-Banden im Western Blot eher eine Mischpopulation vermuten lässt. So bestand in SW982/Bax-ko Kl. 11 zwischen einer alleinigen Bortezomib Inkubation und der zusätzlichen Addition von Venetoclax kein signifikanter Unterschied in der Anzahl TMRM<sup>low</sup> Zellen mehr ( $p = 0,0502$ ). Dies deutet darauf hin, dass die synergistische Apoptoseinduktion durch Venetoclax&Bortezomib vorwiegend auf Bax und weniger auf Bak oder Bok basiert, was wiederum mit der Inhibition des Venetoclax-Zielmoleküls Bcl-2 als primärer Antagonist von Bax (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Einsele-Scholz et al., 2016, Ku et al., 2011) begründet werden könnte. Zusammen mit der fehlenden bzw. deutlich schwächeren Sensibilisierung gegenüber Bortezomib durch 15  $\mu$ M Bcl-x<sub>L</sub>- bzw. Mcl-1-Inhibitor im Vergleich zu 15  $\mu$ M Bcl-2-Inhibitor (Abb. 5, 7 & 9) lässt dies auf eine zentrale Rolle der Bcl-2/Bax-Achse in der synergistischen Apoptoseinduktion schließen.

### **4.3 Modell der synergistischen Apoptoseinduktion**

Durch Inhibition von anti-apoptotischem Bcl-2, einem physiologischen Bax-Antagonisten (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Einsele-Scholz et al., 2016, Ku et al., 2011, Kale et al., 2018), nimmt Venetoclax direkten Einfluss auf die Balance und Interaktion der pro- und anti-apoptotischen Proteine und führt damit zu einer erhöhten Empfänglichkeit für Apoptose (*apoptotic priming*). Folgende Aspekte sprechen dafür, dass die von Venetoclax adressierte Bcl-2/Bax-Achse einen wichtigen Anteil in der synergistischen Apoptoseinduktion spielt:

- i) Der Bax *knock-out* reduzierte die Zelltodinduktion durch Venetoclax&Bortezomib deutlich auf unter 50% apoptotische Zellen (Abb. 14C), Bax scheint also für die synergistische Apoptoseinduktion unverzichtbar.

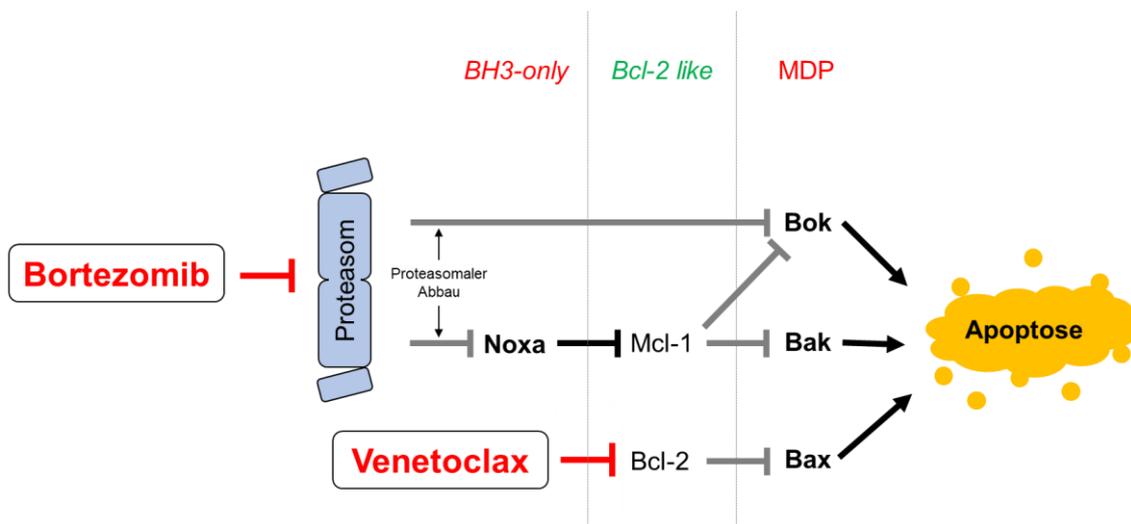
- ii) Die synergistische Apoptoseinduktion war in der gewählten Konzentration spezifisch für Bortezomib und eine Bcl-2-Inhibition und damit nicht übertragbar auf Bortezomib mit anderen BH3-Mimetika (Abb. 5, 7 & 9).

Auch für Proteasominhibitoren wurde bereits ein Einfluss auf Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie mit nachfolgender Apoptoseinduktion gezeigt. Die in der Literatur beschriebene Proteasominhibitor-induzierte Akkumulation von Noxa (Gomez-Bougie et al., 2007, Rizzatti et al., 2008, Pandit and Gartel, 2011) wurde auch in dieser Arbeit nach Inkubation mit 5 nM Bortezomib und vor allem nach Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib beobachtet (Abb. 10A & 13A). Das *BH3-only* Protein Noxa antagonisiert den anti-apoptotischen Faktor Mcl-1, der wiederum überwiegend Bak und vermutlich Bok inaktiviert (Nakajima et al., 2014, Gomez-Bougie et al., 2007, Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Hsu et al., 1997, Stehle et al., 2018, Ku et al., 2011). Zudem führt eine Proteasominhibition nachweislich zu einer Akkumulation von Bok (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018), die auch in dieser Arbeit nach den jeweiligen alleinigen und vor allem der simultanen Wirkstoffinkubation mit Venetoclax und Bortezomib in SW982 beobachtet wurde (Abb. 10B & 13B). Unabhängig auf welche Weise die Bok-Aktivität reguliert wird, ob über Interaktion mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen wie Mcl-1 (Hsu et al., 1997, Stehle et al., 2018) oder proteasomalen Abbau (Llambi et al., 2016, Moldoveanu and Zheng, 2018), eine Venetoclax&Bortezomib Inkubation führte zu einer Clusterbildung von Bok (Abb. 11) und somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts der Bcl-2 Proteinfamilie in Richtung Apoptose. Folglich adressiert Bortezomib vorwiegend die Mcl-1/Bak&Bok-Achse.

#### 4.3.1 Hypothese: Molekularer Mechanismus der synergistischen Apoptoseinduktion durch Venetoclax&Bortezomib

Der Synergismus von Venetoclax und Bortezomib beruht auf der simultanen Inhibition der Bcl-2/Bax-Signalachse durch Venetoclax und der Mcl-1/Bak&Bok-Achse durch Bortezomib-induzierte Noxa und Bok Expression (Abb. 15) (Muenchow et al., 2020). Dies führt zu einer Störung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine mit einem Überwiegen der pro-apoptotischen

Faktoren. Die Dysbalance der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie kann entweder direkt zu MOMP führen oder die Prädisposition der Zellen für Apoptose (*apoptotic priming*) derart steigern, dass z.B. vorhandene zytotoxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei zahlreichen zellulären Prozessen (z.B. Metabolismus, Proliferation, Differenzierung) entstehen und deren Level in malignen Zellen häufig erhöht sind (Panieri and Santoro, 2016), bereits MOMP induzieren können (Münchow, 2019). Letztlich führt die Kombination von Venetoclax und Bortezomib zu einer mitochondrialen Clusterbildung der drei MDPs Bax, Bak und Bok mit nachfolgendem apoptotischen Zelltod.



**Abbildung 15 | Modell der synergistischen Apoptoseinduktion.** Die simultane Inhibition der Bcl-2/Bax-Achse durch Venetoclax und der Mcl-1/Bak&Bok-Achse durch Bortezomib resultiert in einem Überwiegen pro-apoptotischer Proteine und apoptotischem Zelltod. *BH3-only* Proteine und MDPs sind pro-apoptotische Faktoren (rot), *Bcl-2 like* Proteine sind anti-apoptotische Faktoren (grün) [modifiziert nach (Muenchow et al., 2020)]

Unterstützt wird diese Hypothese durch die geringere Apoptoseinduktion durch eine Kombination von Bortezomib mit einem Mcl-1- bzw. Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor (Abb. 5, 7 & 9). In diesen Fällen erfolgt keine gezielte Inhibition der Bcl-2/Bax-Achse. Bei einer Kombination von Bortezomib mit A-1155463 bzw. A-1210477 wird die durch Bortezomib bereits adressierte Mcl-1/Bak&Bok-Achse zusätzlich durch die BH3-Mimetika inhibiert. Aufgrund der Bindungsfähigkeit von Bcl-x<sub>L</sub> sowohl an Bak als auch Bax (Willis et al., 2005, Gillissen et al., 2007, Ku et al., 2011, Fletcher et al., 2008) kann der Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor vermutlich auch bedingt eine Bax-Aktivierung vermitteln, die jedoch schwächer ausfällt und daher in Kombination mit

Bortezomib weniger effektiv wirkt als der direkte Bcl-2-Inhibitor, der gezielt die Bcl-2/Bax-Achse inhibiert. Wird lediglich die Mcl-1/Bak&Bok-Achse durch die Wirkstoffkombination adressiert, dann entfällt die synergistische Apoptoseinduktion, da keine simultane Inhibition paralleler Bcl-2 Signalachsen besteht. Die Hypothese steht im Einklang mit dem beschriebenen Synergismus von Bcl-2- und Mcl-1-Inhibitoren. So wurde präklinisch im Multiplen Myelom eine synergistische Reduktion der Zellviabilität durch eine Inkubation mit Venetoclax in Kombination mit dem Mcl-1-Inhibitor S63845 gezeigt (Algarin et al., 2020). Auch in AML Zelllinien zeigten Venetoclax und der Mcl-1-Inhibitor VU661013 synergistische Effekte (Ramsey et al., 2018). Im Fall von Venetoclax&Bortezomib wird die Inhibition von Mcl-1 durch eine in der Literatur bereits beschriebene Bortezomib-induzierte Hochregulation des *BH3-only* Proteins Noxa erzielt (Gomez-Bougie et al., 2007, Rizzatti et al., 2008, Pandit and Gartel, 2011, Baou et al., 2010, Hagenbuchner et al., 2010).

#### **4.4 Ausblick**

Diese Arbeit zeigte eine zentrale Rolle der Bcl-2/Bax-Achse in der synergistischen Apoptoseinduktion durch das BH3-Mimetikum Venetoclax und Bortezomib. Obwohl die Kombination beider Wirkstoffe zu einer Aktivierung bzw. Clusterbildung aller drei MDPs Bax, Bak und Bok führte, scheint die Sensibilisierung für Apoptoseinduktion durch Bortezomib und Venetoclax in Weichteilsarkomen vor allem Bax-abhängig zu sein. Die über verschiedene Sarkomzelllinien hinweg stets beobachtete Akkumulation von Noxa nach Inkubation mit den Wirkstoffen lässt zudem auf eine wichtige Rolle dieses Proteins in der synergistischen Apoptoseinduktion schließen, was in nachfolgenden Experimenten bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt) (Muenchow et al., 2020).

Die Therapie von Sarkompatienten stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar und die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose eines Sarkoms liegt weiterhin durchschnittlich bei lediglich 54-65%, sodass neue Behandlungsmöglichkeiten gesucht werden. Aufgrund der präsentierten präklinischen *in vitro* Daten könnte die Kombination von Venetoclax und

Bortezomib einen vielversprechenden neuen Ansatz in der Behandlung von Sarkomen darstellen. Weiterführende Experimente könnten die Optimierung der Wirksamkeit einer Kombination von Bcl-2-Inhibitoren und Proteasominhibitoren adressieren sowie die Untersuchung der längerfristigen Wirksamkeit einschließen. Mögliche Experimente wären:

- i) Die Kombination mit anderen Bcl-2-Inhibitoren wie Navitoclax, der neben Bcl-2 auch Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w inhibiert (Tse et al., 2008, Selleckchem), oder Verwendung anderer Proteasominhibitoren, beispielsweise Carfilzomib oder Ixazomib (Manasanch and Orlowski, 2017). Gegebenenfalls kann so die *in vitro* Wirksamkeit auf andere Substanzen derselben Wirkstoffklasse erweitert oder noch weiter gesteigert werden. Dies könnte in Bezug auf eine größere Medikamentenauswahl mit potenziell unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften und dosisabhängigen Nebenwirkungsprofilen für die zukünftige klinische Anwendung interessant sein. In Patienten mit soliden Tumoren zeigte Bortezomib bisher keine gute Wirksamkeit (Manasanch and Orlowski, 2017, Huang et al., 2014). Diese Resistenz könnte auf pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften von Bortezomib mit verminderter Verfügbarkeit des Wirkstoffes in den Tumoren zurückzuführen sein und beispielsweise durch Dosissteigerung, die jedoch durch toxische Nebenwirkungen begrenzt ist, behoben werden (Manasanch and Orlowski, 2017). Durch Verwendung neuerer Proteasominhibitoren könnte die *in vivo* Wirksamkeit einerseits durch andere pharmakologische Eigenschaften, andererseits durch eine bessere Verträglichkeit höherer Dosen verbessert werden. Wichtig ist zuvor jedoch die präklinische *in vitro* Untersuchung einer solchen Kombination.
- ii) In der vorliegenden Arbeit wurde bisher nur die Effektivität der Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib untersucht. Interessant könnte auch die Fähigkeit der behandelten Krebszellen zur Bildung neuer Kolonien sein. Hierfür könnte ein Koloniebildungstest (*colony formation assay*, CFA) durchgeführt werden (Franken et al., 2006, Katz et al., 2008).

- iii) Durchführen von Tierversuchen, beispielsweise im Mausmodell, um die Wirksamkeit von Venetoclax und Bortezomib in der Apoptoseinduktion von Sarkomen nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zu testen und ein näheres Verständnis über das komplexe Zusammenwirken im Körper zu erhalten. Neben der Untersuchung pharmakologischer Wechselwirkungen der Wirkstoffe sollte auch besonders auf die Toxikologie mit potenziellen Nebenwirkungen geachtet werden. Derartige Tierversuche sind meist Voraussetzung für die weiterführende Testung im Rahmen klinischer Studien im Menschen und damit die Translation in die klinische Anwendung.

#### **4.5 Übertragbarkeit in den Sarkompatienten**

Zum Abschluss soll die Frage zur Übertragbarkeit in den Sarkompatienten diskutiert werden, da dies die Zielsetzung der medizinischen Forschung darstellt. Bevor neue Medikamente oder Medikamentenkombinationen im Rahmen klinischer Studien in Krebspatienten getestet werden dürfen, wird die Pharmakologie und Toxikologie *in vivo* in Tierexperimenten untersucht. Allerdings sind sowohl Venetoclax als auch Bortezomib schon für die Behandlung anderer Krebsentitäten im Menschen zugelassen (Ratiopharm, 2019, European Medicines Agency, 2020). Auch die Kombination aus Venetoclax plus Bortezomib und Dexamethason wird bereits in einer Phase 3 Studie in Patienten mit Multiplem Myelom getestet (NCT02755597), nachdem eine Phase 1b Studie eine vielversprechende Wirksamkeit mit akzeptabler Sicherheit gezeigt hat (NCT01794507) (Moreau et al., 2017). Häufige höhergradige Nebenwirkungen einer Behandlung mit Venetoclax plus Bortezomib und Dexamethason sind Zytopenien, wie Neutropenie (18%), Thrombozytopenie (15%) und Anämie (15%), sowie Pneumonien (16%) und Diarrhoe (15%) (Kumar et al., 2020). Obwohl das Vorkommen schwerer behandlungsbedingter Nebenwirkungen bei Patienten mit Venetoclax plus Bortezomib und Dexamethason bisher sogar etwas geringer war als bei Patienten mit Placebo plus Bortezomib und Dexamethason (48% vs. 50%), zeigt die aktuell durchgeführte Phase 3 Studie eine leicht erhöhte Mortalität bei Patienten der Venetoclaxgruppe im Vergleich zur Placebogruppe, was hauptsächlich auf Infektionen (Pneumonie, Sepsis)

zurückzuführen ist (Kumar et al., 2020). In dieser Studie erhielten die Patienten zusätzlich zu Venetoclax und Bortezomib noch das in der Therapie des Multiplen Myeloms etablierte Dexamethason (Wörmann et al., 2018), welches eine immunsuppressive Wirkung hat (Ratiopharm, 2018) und daher zu einem verstärkten Infektionsgeschehen beitragen kann. Im Falle einer klinischen Studie im Sarkompatienten würde auf das Dexamethason verzichtet und lediglich Venetoclax und Bortezomib gegeben werden. Da so die immunsuppressive Wirkung des Dexamethasons entfällt, wäre gegebenenfalls das Risiko schwerer Infektionen reduziert. Eine weitere Studie im Multiplen Myelom (NCT01794520) zeigt eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf Venetoclax und hohen Bcl-2:Bcl-x<sub>L</sub> bzw. Bcl-2:Mcl-1 mRNA Expressionsverhältnissen (Kumar et al., 2017). Die höchste Ansprechrate auf Venetoclax wurde hier bei Patienten mit t(11;14) Translokation, die eine im Verhältnis zu Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 hohe Bcl-2 Expression aufweisen, festgestellt. Basierend auf diesen Erkenntnissen und den Ergebnissen dieser Arbeit, die auf eine wichtige Rolle der Bcl-2/Bax-Achse in der synergistischen Apoptoseinduktion hinweisen, könnte das Expressionsprofil der Bcl-2 *like* Proteine, also eine hohe Bcl-2 Expression bzw. hohe Bcl-2:Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2:Mcl-1 Verhältnisse, als Auswahlkriterium für den Einschluss in die klinische Studie zur Testung von Venetoclax und Bortezomib in Sarkompatienten herangezogen werden.

Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen sind an den im Rahmen von Vorarbeiten an 13 Sarkomzelllinien (Synovialsarkome, Leiomyosarkome, Liposarkome, Rhabdomyosarkome, Chondrosarkome, Osteosarkome, NOS) ermittelten durchschnittlichen IC<sub>50</sub>-Werten angelehnt. Die Konzentration von 15 µM Venetoclax erscheint dabei im Vergleich zu der gemessenen mittleren ( $\pm$  Standardabweichung) maximalen Plasmakonzentrationen im *Steady State* von  $2,4 \pm 1,3$  µM nach einmal täglicher Gabe von 400 mg Venetoclax bei fettarmer Ernährung (Abbvie, 2021) hoch. Allerdings kann durch Gabe zusammen mit einer fettreichen Mahlzeit die Venetoclaxexposition weiter erhöht werden (Abbvie, 2021). Weiterhin zeigten tägliche Dosen von 1200 mg Venetoclax in Myelompatienten ein akzeptables Sicherheitsprofil (Kumar et al., 2017), sodass die Bioverfügbarkeit (Plasmakonzentrationen bzw. *Area under the curve* (AUC))

wahrscheinlich weiter erhöht werden kann. Im Gegensatz dazu werden bei wiederholter Gabe von 1,3 mg/m<sup>2</sup> Bortezomib maximale Plasmakonzentrationen zwischen 231,6 und 312,3 nM erreicht (Ratiopharm, 2019) und damit deutlich höhere Konzentrationen als die hier verwendeten 5 nM. Diese präklinischen *in vitro* Arbeiten dienen der Darstellung sowie Charakterisierung der synergistischen Wirkung von Venetoclax und Bortezomib und schaffen somit eine Grundlage, um im Rahmen klinischer Studien die optimale Dosierung der Medikamente in Sarkompatienten zu untersuchen. Es ist zu beachten, dass eine *in vitro* festgestellte Wirksamkeit aufgrund des komplexen Wechselspiels des menschlichen Körpers nie 1:1 *in vivo* übertragbar ist. Im Patienten spielen viele weitere Faktoren, wie die Physiologie des Menschen (z.B. Immunsystem, Entzündungsreaktionen, 3D Tumor versus 2D Zellkultur, etc.) oder die Pharmakologie der Medikamente (Gewebeängigkeit, Metabolisierung, Plasmaproteinbindung, etc.), eine wichtige Rolle. Zudem würde man im Sarkompatienten aufgrund möglicher lebensbedrohlicher Stoffwechselentgleisungen - dem Tumorlyse-Syndrom (Tambaro and Wierda, 2020, Howard et al., 2011) - keinen Zelluntergang von beispielsweise über 80% in SW982 innerhalb von 24 h anstreben. Die vorliegende Arbeit konnte eine starke Apoptoseinduktion durch Venetoclax und Bortezomib nachweisen und den Mechanismus der synergistischen Wirkung genauer beleuchten. Eine Anpassung und Optimierung der Medikamentendosierungen kann jedoch nicht in der Zellkultur erfolgen, sondern muss im Rahmen klinischer Studien in Sarkompatienten stattfinden.

Aufgrund der stark begrenzten zugelassenen Therapieoptionen sind viele Sarkompatienten bereits kurz nach Diagnosestellung austherapiert. Daher werden dringend neue Behandlungsmöglichkeiten benötigt. Eine Kombinationstherapie mit Venetoclax und Bortezomib stellt wegen der hier dargestellten starken Apoptoseinduktion in Sarkomzelllinien einen vielversprechenden Ansatz bei der Behandlung von Sarkomen dar und könnte so bei synergistischer Wirkung zu einer Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten führen. Da diese Medikamentenkombination bereits in Myelompatienten getestet wird und in einer Phase 1b Studie ein akzeptables

Nebenwirkungsprofil zeigte, kann eventuell auf weitere Tierversuche verzichtet und eine Venetoclax und Bortezomib Kombinationstherapie direkt Sarkompatienten, denen unglücklicherweise keine zugelassenen Behandlungsmöglichkeiten mehr zur Verfügung stehen, entweder in Form von individuellen Heilversuchen oder im Rahmen einer klinischen Studie angeboten werden.

## 5. Zusammenfassung

Sarkome sind eine seltene Gruppe bösartiger Tumorerkrankungen mesenchymalen Ursprungs. Aufgrund ihrer Heterogenität und Rarität stellt die Therapie von Sarkomen auch heute noch eine große Herausforderung dar. Trotz multimodaler Therapiekonzepte einschließlich Chemotherapie, Radiotherapie und ausgedehnter Resektion liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei durchschnittlich lediglich 54-65%. Folglich werden dringend neue wirksame Therapien für die Behandlung von Sarkompatienten benötigt.

In Vorarbeiten wurde die synergistische Reduktion vitaler Zellen mittels simultaner Bcl-2-Inhibition durch Venetoclax und Proteasominhibition durch Bortezomib in Weichteilsarkomen nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der synergistischen Wirkung von Venetoclax und Bortezomib sowie die Relevanz spezifischer Bcl-2 Familienproteine für diesen Mechanismus in drei Sarkomzelllinien (Synovialsarkom, Rhabdomyosarkom und Leiomyosarkom) zu untersuchen, um ein näheres Verständnis des Zusammenwirkens dieser Medikamente zu erlangen. Dazu sollte zunächst die starke Apoptoseinduktion durch gleichzeitige Inkubation mit Venetoclax und Bortezomib durchflusszytometrisch verifiziert und die Übertragbarkeit auf eine Kombination anderer BH3-Mimetika und Bortezomib geprüft werden. Anschließend sollte die Auswirkung einer Inkubation mit Venetoclax und/oder Bortezomib sowohl auf die Expression pro- und anti-apoptotisch wirkender Bcl-2 Proteine als auch die Clusterbildung der MDPs Bax, Bak und Bok mittels Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Schließlich sollte der Einfluss des spezifischen Verlustes der MDPs auf die Wirksamkeit von Venetoclax und Bortezomib analysiert werden. Hierfür wurden mittels CRISPR/Cas9 generierte Bax, Bak und Bok *knock-out* Zellen mit Venetoclax und/oder Bortezomib inkubiert und nachfolgend die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine sowie die Effektivität der Apoptoseinduktion untersucht.

Bei gleicher Dosierung bewirkte die Kombination von Bortezomib mit dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax die höchsten Zelltodraten (Venetoclax&Bortezomib: > 80% (SW982/wt, SK-LMS-1) bzw. ~70% (RD) avitale Zellen), während die

Kombination mit dem Bcl-x<sub>L</sub>-Inhibitor A-1155463 geringere Zelltodraten (A-1155463&Bortezomib: < 45% (SW982/wt, RD) bzw. ~60% (SK-LMS-1) avitale Zellen) und mit dem Mcl-1-Inhibitor A-1210477 einen vernachlässigbaren Anteil apoptotischer Zellen (A-1210477&Bortezomib: < 25% avitale Zellen in SW982/wt, RD und SK-LMS-1) induzierte. Die synergistische Apoptoseinduktion war somit in der gewählten Dosierung von 15 µM BH3-Mimetikum und 5 nM Bortezomib spezifisch für Bortezomib und eine Bcl-2-Inhibition. Nach Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib zeigten sich in allen getesteten Zelllinien erhöhte Expressionen von Mcl-1 und Noxa sowie erhöhte Bok- und Bak-Level in SW982/wt. In SW982/wt resultierte die Inkubation mit Venetoclax&Bortezomib zudem in einer mitochondrialen Clusterbildung von Bax, Bak und Bok. Die Regulation der Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine war in den *knock-out* Zellen im Vergleich zur Wildtypzelllinie unverändert, jedoch war bei einem Bax *knock-out* die Zelltodinduktion durch Venetoclax&Bortezomib auf unter 50% reduziert. Dies lässt auf eine zentrale Rolle von Bax in der Venetoclax&Bortezomib-induzierten Apoptose schließen. Basierend auf unseren Ergebnissen und bestehender Literatur schlagen wir vor, dass der Synergismus von Venetoclax und Bortezomib auf der simultanen Inhibition der Bcl-2/Bax-Achse durch Venetoclax und der Mcl-1/Bak&Bok-Achse durch Bortezomib-induzierte Noxa und Bok Hochregulierung beruht. Das Überwiegen pro-apoptotischer Faktoren resultiert letztendlich über die Aktivierung der drei MDPs Bax, Bak und Bok in Apoptose.

Diese *in vitro* Arbeit liefert Hinweise einer möglichen Wirksamkeit von Venetoclax in Kombination mit Bortezomib bei der Therapie von Sarkompatienten. Beide Medikamente sind bereits für die Behandlung anderer Krebserkrankungen im Menschen zugelassen und die Kombination aus Venetoclax plus Bortezomib und Dexamethason wird momentan in einer Phase 3 Studie in Patienten mit Multiplem Myelom getestet (Bellini, NCT02755597). Eine Kombinationstherapie mit Venetoclax und Bortezomib stellt wegen der hier dargestellten starken Apoptoseinduktion in Sarkomzelllinien auch bei der Behandlung von Sarkomen einen vielversprechenden Ansatz dar und könnte so bei synergistischer Wirkung zu einer Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten führen.

## 6. Literaturverzeichnis

- ABBVIE. 2021. *Venclyxto® 10 mg/50 mg/100 mg Filmtabletten* [Online]. Available: <https://www.fachinfo.de/pdf/021277#view=FitH&pagemode=none&toolbar=1&statusbar=0&messages=0&navpanes=0> [Accessed 01.05 2021].
- ADAMOWICZ, M., RADLWIMMER, B., RIEKER, R. J., MERTENS, D., SCHWARZBACH, M., SCHRAML, P., BENNER, A., LICHTER, P., MECHTERSHEIMER, G. & JOOS, S. 2006. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 45, 829-38.
- ADAMS, K. W. & COOPER, G. M. 2007. Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *J Biol Chem*, 282, 6192-200.
- AKHTAR F, B. S. 2020. *Apoptosis* [Online]. StatPearls. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/> [Accessed 20.10. 2020].
- ALCON, C., MANZANO-MUNOZ, A., PRADA, E., MORA, J., SORIANO, A., GUILLEN, G., GALLEGRO, S., ROMA, J., SAMITIER, J., VILLANUEVA, A. & MONTERO, J. 2020. Sequential combinations of chemotherapeutic agents with BH3 mimetics to treat rhabdomyosarcoma and avoid resistance. *Cell Death Dis*, 11, 634.
- ALGARIN, E. M., DIAZ-TEJEDOR, A., MOGOLLON, P., HERNANDEZ-GARCIA, S., CORCHETE, L. A., SAN-SEGUNDO, L., MARTIN-SANCHEZ, M., GONZALEZ-MENDEZ, L., SCHOUMACHER, M., BANQUET, S., KRAUS-BERTHIER, L., KLOOS, I., DERREAL, A., HALILOVIC, E., MAACKE, H., GUTIERREZ, N. C., MATEOS, M. V., PAINO, T., GARAYOA, M. & OCIO, E. M. 2020. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica*, 105, e116-e120.
- AMANKWAH, E. K., CONLEY, A. P. & REED, D. R. 2013. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. *Clin Epidemiol*, 5, 147-62.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2018. *Global Cancer Facts & Figures 4th Edition* [Online]. Available: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/global-cancer-facts-and-figures/global-cancer-facts-and-figures-4th-edition.pdf> [Accessed 14.04. 2020].
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2021a. *Key Statistics for Soft Tissue Sarcomas* [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/soft-tissue-sarcoma/about/key-statistics.html> [Accessed 16.05. 2021].
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2021b. *Survival Rates for Soft Tissue Sarcoma* [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/soft-tissue-sarcoma/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> [Accessed 06.04 2021].

- ANTONESCU, C. R., BESMER, P., GUO, T., ARKUN, K., HOM, G., KORYOTOWSKI, B., LEVERSHA, M. A., JEFFREY, P. D., DESANTIS, D., SINGER, S., BRENNAN, M. F., MAKI, R. G. & DEMATTEO, R. P. 2005. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res*, 11, 4182-90.
- ARVAND, A. & DENNY, C. T. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene*, 20, 5747-54.
- ATCC. 2013. *ATCC Tumor Cell Panels by gene mutations and tissue origin* [Online]. Available: <https://lifescience invitro.com.au/assets/Uploads/TumorCellPanelsBrochure.pdf> [Accessed 10.04 2020].
- ATCC. 2016a. *RD (ATCC® CCL-136™)* [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-136.aspx#characteristics> [Accessed 10.04 2020].
- ATCC. 2016b. *SK-LMS-1 (ATCC® HTB-88™)* [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-88.aspx#characteristics> [Accessed 10.04 2020].
- ATCC. 2016c. *SW 982 [SW-982, SW982] (ATCC® HTB-93™)* [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-93.aspx#characteristics> [Accessed 10.04 2020].
- ATTIA, S., MAHONEY, M. R., OKUNO, S. H., ADKINS, D., AHUJA, H. G., DUCKER, T. P., MAPLES, W. J., OCHS, L., WENTWORTH-HARTUNG, N. L., ERLICHMAN, C. & BAILEY, H. H. A phase II consortium trial of vorinostat and bortezomib for advanced soft tissue sarcomas. ASCO Annual Meeting, 2011.
- BAE, S., CROWE, P., GOWDA, R., JOUBERT, W., CAREY-SMITH, R., STALLEY, P. & DESAI, J. 2016. Patterns of care for patients with advanced soft tissue sarcoma: experience from Australian sarcoma services. *Clin Sarcoma Res*, 6, 11.
- BAKRI, A., SHINAGARE, A. B., KRAJEWSKI, K. M., HOWARD, S. A., JAGANNATHAN, J. P., HORNICK, J. L. & RAMAIYA, N. H. 2012. Synovial sarcoma: imaging features of common and uncommon primary sites, metastatic patterns, and treatment response. *AJR Am J Roentgenol*, 199, W208-15.
- BAO, Q. & SHI, Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14, 56-65.
- BAOU, M., KOHLHAAS, S. L., BUTTERWORTH, M., VOGLER, M., DINSDALE, D., WALEWSKA, R., MAJID, A., ELDERING, E., DYER, M. J. & COHEN, G. M. 2010. Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 95, 1510-8.

- BARANSKI, Z., DE JONG, Y., ILKOVA, T., PETERSE, E. F., CLETON-JANSEN, A. M., VAN DE WATER, B., HOGENDOORN, P. C., BOVEE, J. V. & DANEN, E. H. 2015. Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget*, 6, 36113-25.
- BARROTT, J. J., ZHU, J. F., SMITH-FRY, K., SUSKO, A. M., NOLLNER, D., BURRELL, L. D., POZNER, A., CAPECCHI, M. R., YAP, J. T., CANNON-ALBRIGHT, L. A., DENG, X. & JONES, K. B. 2017. The Influential Role of BCL2 Family Members in Synovial Sarcomagenesis. *Mol Cancer Res*, 15, 1733-1740.
- BATE-EYA, L. T., DEN HARTOG, I. J., VAN DER PLOEG, I., SCHILD, L., KOSTER, J., SANTO, E. E., WESTERHOUT, E. M., VERSTEEG, R., CARON, H. N., MOLENAAR, J. J. & DOLMAN, M. E. 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. *Oncotarget*, 7, 27946-58.
- BENITO, J. M., GODFREY, L., KOJIMA, K., HOGDAL, L., WUNDERLICH, M., GENG, H., MARZO, I., HARUTYUNYAN, K. G., GOLFMAN, L., NORTH, P., KERRY, J., BALLABIO, E., CHONGHAILE, T. N., GONZALO, O., QIU, Y., JEREMIAS, I., DEBOSE, L., O'BRIEN, E., MA, H., ZHOU, P., JACAMO, R., PARK, E., COOMBES, K. R., ZHANG, N., THOMAS, D. A., O'BRIEN, S., KANTARJIAN, H. M., LEVERSON, J. D., KORNBLAU, S. M., ANDREEFF, M., MUSCHEN, M., ZWEIDLER-MCKAY, P. A., MULLOY, J. C., LETAI, A., MILNE, T. A. & KONOPLEVA, M. 2015. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Rep*, 13, 2715-27.
- BERNER, J. M., FORUS, A., ELKAHLOUN, A., MELTZER, P. S., FODSTAD, O. & MYKLEBOST, O. 1996. Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 17, 254-9.
- BURNINGHAM, Z., HASHIBE, M., SPECTOR, L. & SCHIFFMAN, J. D. 2012. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res*, 2, 14.
- CANCER RESEARCH UK. 2017. *Types of cancer* [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> [Accessed 14.04. 2020].
- CORLESS, C. L., FLETCHER, J. A. & HEINRICH, M. C. 2004. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*, 22, 3813-25.
- COWLING, V. & DOWNWARD, J. 2002. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ*, 9, 1046-56.

- DE BRUIJN, D. R., ALLANDER, S. V., VAN DIJK, A. H., WILLEMSE, M. P., THIJSSSEN, J., VAN GRONINGEN, J. J., MELTZER, P. S. & VAN KESSEL, A. G. 2006. The synovial-sarcoma-associated SS18-SSX2 fusion protein induces epigenetic gene (de)regulation. *Cancer Res*, 66, 9474-82.
- DE JONG, Y., MONDERER, D., BRANDINELLI, E., MONCHANIN, M., VAN DEN AKKER, B. E., VAN OOSTERWIJK, J. G., BLAY, J. Y., DUTOUR, A. & BOVÉE, J. V. M. G. 2018. Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma. *Oncogenesis*, 7, 74.
- DEMICCO, E. G., MAKI, R. G., LEV, D. C. & LAZAR, A. J. 2012. New therapeutic targets in soft tissue sarcoma. *Adv Anat Pathol*, 19, 170-80.
- DEN DUNNEN, J. T. & ANTONARAKIS, S. E. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*, 15, 7-12.
- DENT, P., CUIEL, D. T., FISHER, P. B. & GRANT, S. 2009. Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: mechanisms for improved cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 12, 65-73.
- EINSELE-SCHOLZ, S., MALMSHEIMER, S., BERTRAM, K., STEHLE, D., JOHANNING, J., MANZ, M., DANIEL, P. T., GILLISSEN, B. F., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ESSMANN, F. 2016. Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J Cell Sci*, 129, 2213-23.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2019. *No new patients should start treatment with Lartruvo after study shows cancer medicine does not prolong life* [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/news/no-new-patients-should-start-treatment-lartruvo-after-study-shows-cancer-medicine-does-not-prolong> [Accessed 31.05 2020].
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2020. *Venclyxto (Venetoclax) Übersicht über Venclyxto und warum es in der EU zugelassen ist* [Online]. Available: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/venclyxto-epar-medicine-overview\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/venclyxto-epar-medicine-overview_de.pdf) [Accessed 29.10 2020].
- FAIRCHILD, C. K., FLOROS, K., JACOB, S., COON, C., PUCHALAPALLI, M., HU, B., DOZMOROV, M., KOBLINSKI, J., SMITH, S., DOMSON, G., EBI, H., FABER, A. & BOIKOS, S. A. 2020. Evaluation of combined BCL-2/MCL-1 inhibition as a therapeutic approach for synovial sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 38, e23561-e23561.
- FERRARI, A., SULTAN, I., HUANG, T. T., RODRIGUEZ-GALINDO, C., SHEHADEH, A., MEAZZA, C., NESS, K. K., CASANOVA, M. & SPUNT, S. L. 2011. Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database. *Pediatr Blood Cancer*, 57, 943-9.

- FLETCHER, J. I., MEUSBURGER, S., HAWKINS, C. J., RIGLAR, D. T., LEE, E. F., FAIRLIE, W. D., HUANG, D. C. & ADAMS, J. M. 2008. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 18081-7.
- FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1, 2315-9.
- FRENZEL, A., GRESPI, F., CHMELEWSKI, W. & VILLUNGER, A. 2009. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, 14, 584-96.
- FULDA, S. & DEBATIN, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798-811.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., LU, X., MADEO, F., MALORNI, W., MEHLEN, P., NUNEZ, G., PETER, M. E., PIACENTINI, M., RUBINSZTEIN, D. C., SHI, Y., SIMON, H. U., VANDENABEELE, P., WHITE, E., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. & KROEMER, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 107-20.
- GARCIA, C. B., SHAFFER, C. M., ALFARO, M. P., SMITH, A. L., SUN, J., ZHAO, Z., YOUNG, P. P., VANSANUN, M. N. & EID, J. E. 2012. Reprogramming of mesenchymal stem cells by the synovial sarcoma-associated oncogene SYT-SSX2. *Oncogene*, 31, 2323-34.
- GEORGE, A. & GRIMER, R. 2012. Early symptoms of bone and soft tissue sarcomas: could they be diagnosed earlier? *Ann R Coll Surg Engl*, 94, 261-6.
- GILBERT, S. 2000. *Developmental Biology*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- GILLISSEN, B., ESSMANN, F., HEMMATI, P. G., RICHTER, A., RICHTER, A., OZTOP, I., CHINNADURAI, G., DORKEN, B. & DANIEL, P. T. 2007. Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol*, 179, 701-15.
- GOMEZ-BOUGIE, P., WUILLEME-TOUMI, S., MENORET, E., TRICHET, V., ROBILLARD, N., PHILIPPE, M., BATAILLE, R. & AMIOT, M. 2007. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res*, 67, 5418-24.
- GOTTLIEB, S. 2002. Tamoxifen may increase risk of uterine sarcoma. *BMJ*, 325, 7.

- HAGENBUCHNER, J., AUSSERLECHNER, M. J., PORTO, V., DAVID, R., MEISTER, B., BODNER, M., VILLUNGER, A., GEIGER, K. & OBEXER, P. 2010. The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression. *J Biol Chem*, 285, 6904-12.
- HEINRICH, M. C., CORLESS, C. L., DEMETRI, G. D., BLANKE, C. D., VON MEHREN, M., JOENSUU, H., MCGREEVEY, L. S., CHEN, C. J., VAN DEN ABEELE, A. D., DRUKER, B. J., KIESE, B., EISENBERG, B., ROBERTS, P. J., SINGER, S., FLETCHER, C. D., SILBERMAN, S., DIMITRIJEVIC, S. & FLETCHER, J. A. 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*, 21, 4342-9.
- HIRD, A. W. & TRON, A. E. 2019. Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 198, 59-67.
- HOANG, N. T., ACEVEDO, L. A., MANN, M. J. & TOLANI, B. 2018. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res*, 10, 1089-1114.
- HOWARD, S. C., JONES, D. P. & PUI, C. H. 2011. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med*, 364, 1844-54.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12401-6.
- HUANG, Z., WU, Y., ZHOU, X., XU, J., ZHU, W., SHU, Y. & LIU, P. 2014. Efficacy of therapy with bortezomib in solid tumors: a review based on 32 clinical trials. *Future Oncol*, 10, 1795-807.
- IN, G. K., HU, J. S. & TSENG, W. W. 2017. Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol*, 9, 533-550.
- ISHIBE, T., NAKAYAMA, T., OKAMOTO, T., AOYAMA, T., NISHIJO, K., SHIBATA, K. R., SHIMA, Y., NAGAYAMA, S., KATAGIRI, T., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, T. & TOGUCHIDA, J. 2005. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. *Clin Cancer Res*, 11, 2702-12.
- JEDLICKA, P. 2010. Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol*, 3, 338-47.
- JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A. & LOWE, S. W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108, 153-64.

- JUDSON, I., VERWEIJ, J., GELDERBLOM, H., HARTMANN, J. T., SCHOFFSKI, P., BLAY, J. Y., KERST, J. M., SUFLIARSKY, J., WHELAN, J., HOHENBERGER, P., KRARUP-HANSEN, A., ALCINDOR, T., MARREAUD, S., LITIERE, S., HERMANS, C., FISHER, C., HOGENDOORN, P. C., DEI TOS, A. P., VAN DER GRAAF, W. T., EUROPEAN, O., TREATMENT OF CANCER SOFT, T. & BONE SARCOMA, G. 2014. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 15, 415-23.
- JULIEN, O. & WELLS, J. A. 2017. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 24, 1380-1389.
- KACKER, C., MARX, A., MOSSINGER, K., SVEHLA, F., SCHNEIDER, U., HOGENDOORN, P. C., NIELSEN, O. S., KUFFER, S., SAUER, C., FISHER, C., HALLERMANN, C., HARTMANN, J. T., BLAY, J. Y., MECHTERSHEIMER, G., HOHENBERGER, P. & STROBEL, P. 2013. High frequency of MYC gene amplification is a common feature of radiation-induced sarcomas. Further results from EORTC STBSG TL 01/01. *Genes Chromosomes Cancer*, 52, 93-8.
- KALE, J., OSTERLUND, E. J. & ANDREWS, D. W. 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 25, 65-80.
- KATZ, D., ITO, E., LAU, K. S., MOCANU, J. D., BASTIANUTTO, C., SCHIMMER, A. D. & LIU, F. F. 2008. Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *Biotechniques*, 44, ix-xiv.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. & NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL, D. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.
- KU, B., LIANG, C., JUNG, J. U. & OH, B. H. 2011. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res*, 21, 627-41.
- KUMAR, S., KAUFMAN, J. L., GASPARETTO, C., MIKHAEL, J., VIJ, R., PEGOURIE, B., BENBOUBKER, L., FACON, T., AMIOT, M., MOREAU, P., PUNNOOSE, E. A., ALZATE, S., DUNBAR, M., XU, T., AGARWAL, S. K., ENSCHEDE, S. H., LEVERSON, J. D., ROSS, J. A., MACIAG, P. C., VERDUGO, M. & TOUZEAU, C. 2017. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*, 130, 2401-2409.

- KUMAR, S. K., HARRISON, S. J., CAVO, M., DE LA RUBIA, J., POPAT, R., GASPARETTO, C., HUNGRIA, V., SALWENDER, H., SUZUKI, K., KIM, I., PUNNOOSE, E. A., HONG, W. J., FREISE, K. J., YANG, X., SOOD, A., JALALUDDIN, M., ROSS, J. A., WARD, J. E., MACIAG, P. C. & MOREAU, P. 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. *Lancet Oncol*, 21, 1630-1642.
- LAPORTE, A. N., BARROTT, J. J., YAO, R. J., POULIN, N. M., BRODIN, B. A., JONES, K. B., UNDERHILL, T. M. & NIELSEN, T. O. 2017. HDAC and Proteasome Inhibitors Synergize to Activate Pro-Apoptotic Factors in Synovial Sarcoma. *PLoS One*, 12, e0169407.
- LI, H., ZHU, H., XU, C. J. & YUAN, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- LLAMBI, F., WANG, Y. M., VICTOR, B., YANG, M., SCHNEIDER, D. M., GINGRAS, S., PARSONS, M. J., ZHENG, J. H., BROWN, S. A., PELLETIER, S., MOLDOVEANU, T., CHEN, T. & GREEN, D. R. 2016. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell*, 165, 421-33.
- LOPEZ-POUSA, A., MARTIN BROTO, J., MARTINEZ TRUFERO, J., SEVILLA, I., VALVERDE, C., ALVAREZ, R., CARRASCO ALVAREZ, J. A., CRUZ JURADO, J., HINDI, N. & GARCIA DEL MURO, X. 2016. SEOM Clinical Guideline of management of soft-tissue sarcoma (2016). *Clin Transl Oncol*, 18, 1213-1220.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2009. *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme.
- LUO, X., BUDIHardjo, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-90.
- MAKI, R. G., KRAFT, A. S., SCHEU, K., YAMADA, J., WADLER, S., ANTONESCU, C. R., WRIGHT, J. J. & SCHWARTZ, G. K. 2005. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer*, 103, 1431-8.
- MANASANCH, E. E. & ORLOWSKI, R. Z. 2017. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14, 417-433.

- MARGARET VON MEHREN MD, R. L. R. M., ROBERT S. BENJAMIN MD, SARAH BOLES MD, MARILYN M. BUI MD, PHD, KRISTEN N. GANJOO MD, SUZANNE GEORGE MD, RICARDO J. GONZALEZ MD, MARTIN J. HESLIN MD, JOHN M. KANE III MD, VICKI KEEDY MD, MSCI, EDWARD KIM MD, HENRY KOON MD, JOEL MAYERSON MD, MARTIN MCCARTER MD, SEAN V. MCGARRY MD, CHRISTIAN MEYER MD, PHD, ZACHARY S. MORRIS MD, PHD, RICHARD J. O'DONNELL MD, ALBERTO S. PAPPO MD, I. BENJAMIN PAZ MD, IVY A. PETERSEN MD, JOHN D. PFEIFER MD, PHD, RICHARD F. RIEDEL MD, BERNICE RUO MD, SCOTT SCHUETZE MD, PHD, WILLIAM D. TAP MD, JEFFREY D. WAYNE MD, MARY ANNE BERGMAN AND JILLIAN L. SCAVONE PHD 2018. Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16, 536-563.
- MILANO, A., IAFFAIOLI, R. V. & CAPONIGRO, F. 2007. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer*, 43, 1125-33.
- MOLDOVEANU, T. & ZHENG, J. H. 2018. Metastability, an emerging concept governing BOK-mediated apoptosis initiation. *Oncotarget*, 9, 30944-30945.
- MOREAU, P., CHANAN-KHAN, A., ROBERTS, A. W., AGARWAL, A. B., FACON, T., KUMAR, S., TOUZEAU, C., PUNNOOSE, E. A., CORDERO, J., MUNASINGHE, W., JIA, J., SALEM, A. H., FREISE, K. J., LEVERSON, J. D., ENSCHEDE, S. H., ROSS, J. A., MACIAG, P. C., VERDUGO, M. & HARRISON, S. J. 2017. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood*, 130, 2392-2400.
- MOVVA, S., WEN, W., CHEN, W., MILLIS, S. Z., GATALICA, Z., REDDY, S., VON MEHREN, M. & VAN TINE, B. A. 2015. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget*, 6, 12234-47.
- MUENCHOW, A., WELLER, S., HINTERLEITNER, C., MALENKE, E., BUGL, S., WIRTHS, S., MULLER, M. R., SCHULZE-OSTHOFF, K., AULITZKY, W. E., KOPP, H. G. & ESSMANN, F. 2020. The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death Dis*, 11, 701.
- MÜNCHOW, A. 2019. *Bortezomib and Venetoclax synergize to induce apoptosis in various sarcoma subtypes*. Masterarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- NAKA, N., TAKENAKA, S., ARAKI, N., MIWA, T., HASHIMOTO, N., YOSHIOKA, K., JOYAMA, S., HAMADA, K., TSUKAMOTO, Y., TOMITA, Y., UEDA, T., YOSHIKAWA, H. & ITOH, K. 2010. Synovial sarcoma is a stem cell malignancy. *Stem Cells*, 28, 1119-31.

- 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. *Cell Death Dis*, 5, e1052.
- NAKAJIMA, W. & TANAKA, N. 2016. BH3 mimetics: Their action and efficacy in cancer chemotherapy. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, Volume 3(3): 437-441.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2015a. *Age and Cancer Risk* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age> [Accessed 14.04. 2020].
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2015b. *What is cancer?* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> [Accessed 14.04. 2020].
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2020. *Cancer Survival Statistics* [Online]. Available: <https://surveillance.cancer.gov/statistics/types/survival.html> [Accessed 16.04. 2020].
- NICHOLSON, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- ONCOLOGIC DRUGS ADVISORY COMMITTEE, P. S. 2016. *Venetoclax for the Treatment of Pediatric Patients with Relapsed/Refractory Cancers* [Online]. Available: <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM508665.pdf> [Accessed 19.05. 2021].
- ORPHANET. 2014. *Undifferentiated pleomorphic sarcoma* [Online]. Available: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=en&Expert=2023](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=en&Expert=2023) [Accessed 18.04. 2020].
- OTTAVIANI, G. & JAFFE, N. 2009. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*, 152, 3-13.
- PANDIT, B. & GARTEL, A. L. 2011. Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells. *Am J Pathol*, 178, 355-60.
- PANIERI, E. & SANTORO, M. M. 2016. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*, 7, e2253.
- PEDLEY, R. & GILMORE, A. P. 2016. Mitosis and mitochondrial priming for apoptosis. *Biol Chem*, 397, 595-605.
- PETERSEN, I. 2018. Entitäten der Weichteilsarkome. *Trauma und Berufskrankheit*, 20, 25-32.
- PISTRITTO, G., TRISCIUOGGIO, D., CECI, C., GARUFI, A. & D'ORAZI, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8, 603-19.

- POKLEPOVIC, A., YOUSSEFIAN, L. E., WINNING, M., BIRDSSELL, C. A., CROSBY, N. A., RAMAKRISHNAN, V., ERNSTOFF, M. S. & ROBERTS, J. D. 2013. Phase I trial of bortezomib and dacarbazine in melanoma and soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs*, 31, 937-42.
- POTTER, D. S. & LETAI, A. 2016. To Prime, or Not to Prime: That Is the Question. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 81, 131-140.
- RADIC-SARIKAS, B., TSAFOU, K. P., EMDAL, K. B., PAPAMARKOU, T., HUBER, K. V., MUTZ, C., TORETSKY, J. A., BENNETT, K. L., OLSEN, J. V., BRUNAK, S., KOVAR, H. & SUPERTI-FURGA, G. 2017. Combinatorial Drug Screening Identifies Ewing Sarcoma-specific Sensitivities. *Mol Cancer Ther*, 16, 88-101.
- RAJKUMAR, S. V., RICHARDSON, P. G., HIDESHIMA, T. & ANDERSON, K. C. 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*, 23, 630-9.
- RAMSEY, H. E., FISCHER, M. A., LEE, T., GORSKA, A. E., ARRATE, M. P., FULLER, L., BOYD, K. L., STRICKLAND, S. A., SENSINTAFFAR, J., HOGDAL, L. J., AYERS, G. D., OLEJNICZAK, E. T., FESIK, S. W. & SAVONA, M. R. 2018. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov*, 8, 1566-1581.
- RATIOPHARM. 2018. *Dexamethason-ratiopharm 4 mg/8 mg Tabletten* [Online]. Fachinformation. Available: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Dexamethason-ratiopharm%204%20mg-8%20mg%20Tabletten%20-%202.pdf?pzn=2214739> [Accessed 02.04 2021].
- RATIOPHARM. 2019. *Bortezomib-ratiopharm® 2,5 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung* [Online]. Fachinformation. Available: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Bortezomib-ratiopharm%202%20C5%20mg%20Pulver%20zur%20Herstellung%20einer%20Injektionslosung%20-%202.pdf?pzn=12724370> [Accessed 29.10 2020].
- RICCIOTTI, R. W., BARAFF, A. J., JOUR, G., KYRISS, M., WU, Y., LIU, Y., LI, S. C., HOCH, B. & LIU, Y. J. 2017. High amplification levels of MDM2 and CDK4 correlate with poor outcome in patients with dedifferentiated liposarcoma: A cytogenomic microarray analysis of 47 cases. *Cancer Genet*, 218-219, 69-80.
- RIZZATTI, E. G., MORA-JENSEN, H., WENIGER, M. A., GIBELLINI, F., LEE, E., DAIBATA, M., LAI, R. & WIESTNER, A. 2008. Noxa mediates bortezomib induced apoptosis in both sensitive and intrinsically resistant mantle cell lymphoma cells and this effect is independent of constitutive activity of the AKT and NF-kappaB pathways. *Leuk Lymphoma*, 49, 798-808.

- ROBERTS, A. W. & HUANG, D. 2017. Targeting BCL2 With BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies. *Clin Pharmacol Ther*, 101, 89-98.
- ROCK, K. L. & KONO, H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*, 3, 99-126.
- RUTKOWSKI, P., DEBIEC-RYCHTER, M., NOWECKI, Z., MICHEJ, W., SYMONIDES, M., PTASZYNSKI, K. & RUKA, W. 2011. Treatment of advanced dermatofibrosarcoma protuberans with imatinib mesylate with or without surgical resection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25, 264-70.
- SAVAGE, S. A. & MIRABELLO, L. 2011. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma*, 2011, 548151.
- SCHÜTTE, J., BAUER, S., BRODOWICZ, T., GRÜNWALD, V., HOFER, S., HOHENBERGER, P., JOST, L., KASPER, B., LINDNER, L. H., PRITZKULEIT, R., REICHARDT, P., RESSING, M., ROTHERMUNDT, C., SINN, M., TUNN, P. U., WARDELMANN, E. & WÖRMANN, B. 2019. *Weichgewebssarkome (maligne Weichgewebstumoren) des Erwachsenen* [Online]. onkopedia leitlinien. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichgewebssarkome-maligne-weichgewebstumoren-des-erwachsenen/@@guideline/html/index.html#> [Accessed 30.05. 2020].
- SEATTLE CANCER CARE ALLIANCE. 2020. *Sarcoma facts* [Online]. Available: <https://www.seattlecca.org/diseases/sarcoma/sarcoma-facts> [Accessed 18.04. 2020].
- SELLECKCHEM. 2013. *Navitoclax (ABT-263)* [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/ABT-263.html> [Accessed 01.04 2021].
- SHAMAS-DIN, A., BRAHMBHATT, H., LEBER, B. & ANDREWS, D. W. 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 508-20.
- SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., FERNANDES-ALNEMRI, T. & ALNEMRI, E. S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1, 949-57.
- STEHLE, D., GRIMM, M., EINSELE-SCHOLZ, S., LADWIG, F., JOHANNING, J., FISCHER, G., GILLISSEN, B., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ESSMANN, F. 2018. Contribution of BH3-domain and Transmembrane-domain to the Activity and Interaction of the Pore-forming Bcl-2 Proteins Bok, Bak, and Bax. *Sci Rep*, 8, 12434.
- TAMBARO, F. P. & WIERDA, W. G. 2020. Tumour lysis syndrome in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with BCL-2 inhibitors: risk factors, prophylaxis, and treatment recommendations. *Lancet Haematol*, 7, e168-e176.

- TAP, W. D., JONES, R. L., VAN TINE, B. A., CHMIELOWSKI, B., ELIAS, A. D., ADKINS, D., AGULNIK, M., COONEY, M. M., LIVINGSTON, M. B., PENNOCK, G., HAMEED, M. R., SHAH, G. D., QIN, A., SHAHIR, A., CRONIER, D. M., ILARIA, R., JR., CONTI, I., COSAERT, J. & SCHWARTZ, G. K. 2016. Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. *Lancet*, 388, 488-97.
- TAP, W. D., PAPAI, Z., VAN TINE, B. A., ATTIA, S., GANJOO, K. N., JONES, R. L., SCHUETZE, S., REED, D., CHAWLA, S. P., RIEDEL, R. F., KRARUP-HANSEN, A., TOULMONDE, M., RAY-COQUARD, I., HOHENBERGER, P., GRIGNANI, G., CRANMER, L. D., OKUNO, S., AGULNIK, M., READ, W., RYAN, C. W., ALCINDOR, T., DEL MURO, X. F. G., BUDD, G. T., TAWBI, H., PEARCE, T., KROLL, S., REINKE, D. K. & SCHOFFSKI, P. 2017. Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 1089-1103.
- TAP, W. D., WAGNER, A. J., PAPAI, Z., GANJOO, K. N., YEN, C.-C., SCHOFFSKI, P., RAZAK, A. R. A., BROTO, J. M., SPIRA, A. I., KAWAI, A., KRARUP-HANSEN, A., CESNE, A. L., TINE, B. V., NAITO, Y., PARK, S. H., SOLDATENKOVA, V., MO, G., SHAHIR, A., WRIGHT, J. & JONES, R. L. 2019. ANNOUNCE: A randomized, placebo (PBO)-controlled, double-blind, phase (Ph) III trial of doxorubicin (dox) + olaratumab versus dox + PBO in patients (pts) with advanced soft tissue sarcomas (STS). *Journal of Clinical Oncology*, 37, LBA3-LBA3.
- TAYLOR, B. S., BARRETINA, J., MAKI, R. G., ANTONESCU, C. R., SINGER, S. & LADANYI, M. 2011. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 11, 541-57.
- TOUZEAU, C., DOUSSET, C., LE GOUILL, S., SAMPATH, D., LEVERSON, J. D., SOUERS, A. J., MAIGA, S., BENE, M. C., MOREAU, P., PELLAT-DECEUNYNCK, C. & AMIOT, M. 2014. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 210-2.
- TSE, C., SHOEMAKER, A. R., ADICKES, J., ANDERSON, M. G., CHEN, J., JIN, S., JOHNSON, E. F., MARSH, K. C., MITTEN, M. J., NIMMER, P., ROBERTS, L., TAHIR, S. K., XIAO, Y., YANG, X., ZHANG, H., FESIK, S., ROSENBERG, S. H. & ELMORE, S. W. 2008. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*, 68, 3421-8.
- UDAGER, A. M., ISHIKAWA, M. K., LUCAS, D. R., MCHUGH, J. B. & PATEL, R. M. 2016. MYC immunohistochemistry in angiosarcoma and atypical vascular lesions: practical considerations based on a single institutional experience. *Pathology*, 48, 697-704.
- WANG, Q. & HAO, S. 2019. A-1210477, a selective MCL-1 inhibitor, overcomes ABT-737 resistance in AML. *Oncol Lett*, 18, 5481-5489.

- WESTPHAL, D., DEWSON, G., CZABOTAR, P. E. & KLUCK, R. M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 521-31.
- WILLIS, S. N., CHEN, L., DEWSON, G., WEI, A., NAIK, E., FLETCHER, J. I., ADAMS, J. M. & HUANG, D. C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, 19, 1294-305.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021a. *Cancer* [Online]. Available: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1) [Accessed 19.05.2021].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021b. *Cancer* [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Accessed 20.05.2021].
- WÖRMANN, B., DRIESSEN, C., EINSELE, H., GOLDSCHMIDT, H., GUNSILIUS, E., KORTÜM, M., KRÖGER, N., LUDWIG, H., MÜGGE, L.-O., NAUMANN, R., PRITZKULEIT, R., RÖLLIG, C., SCHEID, C., TAVERNA, C., WEISEL, K. & WEIßINGER, F. 2018. *Multiples Myelom* [Online]. onkopedia leitlinien. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html> [Accessed 02.04 2021].
- YIN, N., MA, W., PEI, J., OUYANG, Q., TANG, C. & LAI, L. 2014. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One*, 9, e93960.
- YUE, X., CHEN, Q. & HE, J. 2020. Combination strategies to overcome resistance to the BCL2 inhibitor venetoclax in hematologic malignancies. *Cancer Cell Int*, 20, 524.
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN. 2021. *Krebs der Weichteilgewebe ohne Mesotheliom* [Online]. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Weichteilgewebe\\_ohne\\_Mesotheliom/weichteilgewebe\\_o\\_mesotheliom\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Weichteilgewebe_ohne_Mesotheliom/weichteilgewebe_o_mesotheliom_node.html) [Accessed 16.05.2021].
- ZHANG, P. & POLLOCK, R. E. 2014. Epigenetic Regulators: New Therapeutic Targets for Soft Tissue Sarcoma. *Cancer Cell Microenviron*, 1.
- ZHENG, J. H., GRACE, C. R., GUIBAO, C. D., MCNAMARA, D. E., LLAMBI, F., WANG, Y. M., CHEN, T. & MOLDOVEANU, T. 2018. Intrinsic Instability of BOK Enables Membrane Permeabilization in Apoptosis. *Cell Rep*, 23, 2083-2094 e6.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Hans-Georg Kopp durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Dr. Hans-Georg Kopp und Herrn PD Dr. Frank Essmann.

Sämtliche Western Blot Versuche und die Versuche aus Kapitel 3.1 wurden nach Einarbeitung durch Herrn PD Dr. Frank Essmann und Frau Kerstin Willecke von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Die Immunfluoreszenzversuche (Kapitel 3.2.2) wurden von mir eigenständig durchgeführt und in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Frank Essmann ausgewertet. Die *knock-out* Zelllinien wurden von Frau Sandra Weller generiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die FACS-Messungen der *knock-out* Zellen (Kapitel 3.3.2) wurden von mir in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Weller durchgeführt und ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, die vorliegende Dissertation selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08.06.2021

Alina Münchow

## 8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Alina Muenchow, Sandra Weller, Clemens Hinterleitner, Elke Malenke, Stefanie Bugl, Stefan Wirths, Martin R. Müller, Klaus Schulze-Osthoff, Walter E. Aulitzky, Hans-Georg Kopp and Frank Essmann, „The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA“, Cell Death and Disease (2020)11:701

### **Abstracts:**

Münchow A., Hinterleitner C., Malenke E., Aulitzky W., Kopp H.-G., Essmann F., „V500 - Synergistic apoptosis induction in soft-tissue sarcomas by BH3-Mimetic and Bortezomib“, ISSN 1863-1819, DGHO Jahrestagung, 11. - 14. Oktober 2019, Berlin

Münchow A., Hinterleitner C., Malenke E., Aulitzky W., Kopp H.-G., Essmann F., „Venetoclax and Bortezomib synergize to induce apoptosis in soft-tissue sarcomas“, CESAR Jahrestagung, 12. - 14. September 2019, Oldenburg

## 9. Danksagung

Ich danke Professor Dr. Hans-Georg Kopp für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die tolle wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit sowie die Möglichkeit, an Kongressen teilzunehmen und unsere Daten vorzustellen.

Ich danke Professor Dr. Helmut Salih für die Übernahme der Zweitbetreuung dieser Arbeit. Professor Dr. Matthias Schwab danke ich, dass er als Institutsleiter mir die Promotion am IKP gestattet hat. Ebenso danke ich Professor Dr. Walter E. Aulitzky für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für seine vielfältigen Ideen und Anregungen meine Arbeit betreffend.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Essmann für seine umfassende fachliche Betreuung und Unterstützung sowohl im Labor als auch auf den Kongressen, seine zahlreichen Hilfestellungen und Tipps sowie das Korrekturlesen. Außerdem danke ich ihm und Kerstin Willecke für die Einarbeitung im Labor.

Ich danke Sandra Weller für die zügige Generierung und freundliche Bereitstellung der *knock-out* Zelllinien.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für ihre Ideen und Hilfestellungen und die gute Zeit bedanken. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für das sehr nette Miteinander.

Abschließend gebührt ein großes Dankeschön meiner Familie und Freunden, die mich auf meinem Weg bisher begleitet haben und immer für mich da sind. Dr. Martin Pilz danke ich zudem für seine Zeit beim Korrekturlesen.

## 10. Lebenslauf