

Untersuchungen zum Dimethylfumarat-induzierten Zelltod in soliden
Tumoren und die Auswirkung von Fumarsäureestern auf die
Migration maligner Zellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marlen Michalski
aus
Berlin

im Jahr
2023

Untersuchungen zum Dimethylfumarat-induzierten Zelltod in soliden
Tumoren und die Auswirkung von Fumarsäureestern auf die
Migration maligner Zellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marlen Michalski
aus
Berlin

im Jahr
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

Betreuer: PD Dr. Karsten Gülow

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2024

„Die Wissenschaft besteht nur aus Irrtümern. Aber diese muß man begehen. Es sind die Schritte zur Wahrheit.“

Jules Verne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tumormerkmale - <i>Hallmarks of Cancer</i>	1
1.2	Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes	5
1.2.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	5
1.2.2	Das kolorektale Karzinom.....	8
1.3	Apoptose und Nekroptose	10
1.4	Dimethylfumarat (DMF)	13
1.5	BH3-Mimetika.....	16
1.5.1	ABT-199/Venetoclax.....	17
1.5.2	MIK665/S64315.....	17
1.6	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte und Laborbedarf.....	20
2.1.2	Software	21
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.2	Proteinbiochemische Methoden	22
2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot-Analysen	22
2.2.2	Proteinbestimmung.....	23
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.2.4	Antikörper	23
2.2.5	Western Blot-Analysen.....	24
2.2.6	Immunhistochemie	26
2.3	Zellbiologische Methoden	26
2.3.1	Kultivierung von Zelllinien in vitro.....	26
2.3.2	Zellkulturmodelle zur Behandlung mit DMF, 5-FU, ABT-199 und MIK665	27
2.3.3	Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Zelltodinduktion	27
2.3.4	Durchflusszytometrie zur Untersuchung des Zellzyklus	27
2.3.5	Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Proliferation.....	28
2.3.6	Migrationsassay.....	28
2.3.7	ATP-Assay	28
2.3.8	Caspase-Aktivitätsassays	29

2.4	Statistische Analysen und andere Berechnungen	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Zeit- und dosisabhängige Reduktion des relativen ATP-Gehaltes durch DMF-Behandlung in HCC-Zelllinien	30
3.2	Die Behandlung mit DMF führt zur Reduktion der Proliferation in Huh7, HepG2 und Hep3B.....	31
3.3	DMF induziert G2-Arrest in Huh7 und Hep3B	34
3.4	Inhibition der Migration durch DMF in Huh7 und Hep3B Zellen	37
3.5	DMF induziert Zelltod in HCC-Zelllinien.....	39
3.6	BH3-Mimetika induzieren Zelltod in Huh7	41
3.7	Kombination von BH3-Mimetika induziert die Cytochrom c Freisetzung.....	42
3.8	Die Kombination von ABT-199 und MIK665 induziert die Caspase-Kaskade.....	44
3.9	Die Kombination von ABT-199 und MIK665 induziert signifikant Zelltod in Huh7-Zellen	52
3.10	ABT-199 und MIK665 wirken synergistisch in Huh7-Zellen	54
3.11	Kombination von DMF und BH3-Mimetika inhibiert die Migration in Huh7	57
3.12	Gesteigerte Zelltodinduktion durch DMF und BH3-Mimetika Kombination	58
3.13	DMF in Kombination mit 5-FU induziert verstärkt Zelltod in HCT116	59
4	Diskussion	62
4.1	Derzeitige Behandlungsoptionen für das HCC	62
4.2	DMF als neue Therapieoption für das HCC	64
4.3	BH3-Mimetika im HCC und anderen Tumorentitäten.....	68
4.4	DMF in Kombination mit BH3-Mimetika	70
4.5	DMF in Kombination mit 5-FU.....	72
5	Zusammenfassung	74
6	Abkürzungsverzeichnis.....	76
7	Literaturverzeichnis	79
8	Selbständigkeitserklärung.....	90
9	Danksagung.....	91
10	Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Tumormerkmale - *Hallmarks of Cancer*

Die Zahl der Tumorerkrankungen steigt weltweit an. Dies liegt unter anderem an einer immer älter werdenden Bevölkerung (bessere medizinische Versorgung) sowie unseren veränderten Lebensgewohnheiten (z.B. Rauchen und schlechte Ernährung). Tumorerkrankungen gehören dabei zu den häufigsten Todesursachen und zu den bedeutendsten Faktoren, die die Lebenserwartung einschränken [1,2]. Im Laufe der Tumorgenese erwerben Tumorzellen verschiedene Merkmale, die sie von gesunden Zellen unterscheiden. Im Jahr 2000 wurden durch Hanahan und Weinberg sechs sogenannte „*Hallmarks of Cancer*“ postuliert. Durch Forschung und daraus gewonnenen neuen Erkenntnissen werden diese *Hallmarks* immer wieder neu definiert und erweitert. 2022 postulierte Hanahan insgesamt 14 Tumormerkmale (Abbildung 1) [3].

Tumorzellen verfügen über die Fähigkeit zur anhaltenden Proliferation. Um dies zu gewährleisten können maligne Zellen unterschiedliche Fähigkeiten erwerben. So können sie beispielsweise selbst Wachstumsstimulatoren produzieren oder Signale aussenden, um die Produktion von Wachstumsfaktoren durch das tumorassoziierte Stroma zu induzieren [4]. Ebenso können durch Defekte in Rückkopplungsmechanismen, welche normalerweise zur Signaldämpfung oder zum Aufrechterhalten der Homöostase dienen, proliferative Signalweiterleitungen verstärkt werden. So besitzen z.B. 40% alle Melanome Mutationen im B-Raf-Protein, was zu einer konstitutiven Signalübertragung durch den MAP-Kinase-Weg führt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten oder unkontrollierten Zellproliferation [5]. Am häufigsten ist die V600E Punktmutation im BRAF, diese kommt bei ca. 80% aller BRAF mutierten Melanome vor [6]. Ein weiteres Protein aus dem MAP-Kinase-Weg, das häufig Mutationen aufweist, stellt Ras dar. Mehr als 30% aller menschlichen Tumorentitäten weisen onkogene Mutationen in RAS-Genen auf [7].

Weiterhin können Mutationen in der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase zu einer Hyperaktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs führen, wodurch es unter anderem zu einer gesteigerten Proliferationsrate kommt [4]. Um ihre fortwährende Proliferation gewährleisten zu können, besitzen Tumorzellen zudem die Möglichkeit Wachstumsinhibitoren zu umgehen. Zu diesem Merkmal tragen viele sogenannte Tumorsuppressoren wie RB und p53 bei. Diese

limitieren normalerweise das Zellwachstum sowie die Zellproliferation. Aufgrund fehlender Funktionen von Zellzyklus Proteinen kann es so zu unaufhörlicher Zellproliferation kommen. Ein weiteres entscheidendes Merkmal ist die Resistenz gegenüber der Zelltodinduktion von Tumorzellen. So besitzen Tumorzellen eine Vielzahl von Strategien, um die Apoptose einzuschränken oder ihr zu entgehen.

Einerseits kann die Expression von anti-apoptotischen Regulatoren (Bcl-2, Bcl-X_L) oder Überlebenssignalen (Igf1/2) erhöht oder andererseits die Expression von pro-apoptotischen Faktoren (Bax, Bim, Puma) herunterreguliert sein [3,8]. Auch eine abnormale MAP-Kinase Signalübertragung kann zu einer Resistenz gegenüber Apoptose führen [5,9].

Daneben kann der Verlust des p53-Tumorsuppressors die Induktion der Apoptose verhindern. Ebenfalls können Mutationen in *TP53* zur Tumorentstehung beitragen. So ist *TP53* das am häufigsten mutierte Gen bei allen menschlichen Tumorarten [10]. p53 wird auch „Wächter des Genoms“ genannt, es reguliert verschiedene zelluläre Signalwege, die am Überleben der Zelle, an der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Seneszenz beteiligt sind [11,12]. Durch Mutationen im *TP53* kommt es zum Verlust seiner physiologischen Funktion [12].

Bei den meisten p53-Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen, bei dem nur eine einzige Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp ausgetauscht ist. Die meisten Mutationen treten in der DNA-Bindungsdomäne von p53 auf, was die Transkriptionsaktivität von p53 beeinträchtigt [13]. Ebenfalls kann es zur Deletion von p53 kommen, was z.B. die Expression von Myc verstärkt [14]. Bei Myc handelt es sich um eine Onkogen, welches die Tumorentstehung von vielen Tumorentitäten im Menschen fördert [15].

Neben dem Verlust der tumorsuppressiven Funktion vom Wildtyp p53 können neue onkogene Aktivitäten von mutierten p53 erworben werden. Dadurch wird das Voranschreiten der Tumorerkrankung gefördert. Wird die Funktion oder Expression von Wildtyp-p53 wiederhergestellt kann die Tumorentstehung verringert werden [14].

Es ist bekannt, dass maligne Zellen ein unbegrenztes Replikationspotential benötigen, um makroskopische Tumore zu bilden. So können Zellen aus krisenhaften Populationen hervorgehen und ein unbegrenztes Replikationspotential entwickeln. Dieser Übergang wird als Immortalisierung bezeichnet. Telomere scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. So sind Telomerasen - DNA-Polymerasen, die Telomer-Wiederholungssegmente an die Enden der telomeren DNA anfügen – in 90% immortalisierter Zellen in funktionellen Mengen exprimiert. Eine vorhandene Telomerase-Aktivität ist weiterhin mit einer Resistenz

gegen die Induktion von Seneszenz oder Apoptose verbunden [4]. Um ihren erhöhten Nährstoffbedarf decken zu können, kommt es in Tumorzellen zu einem sogenannten „*angiogenic switch*“ der das normalerweise ruhende Gefäßsystem aktiviert und für die Bildung neuer Gefäße sorgt. Die bekanntesten Angiogenese-Induktoren und -Inhibitoren sind der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) und Thrombospondin-1 (TSP-1). Das VEGF-A Gen ist ein Mitglied der PDGF/VEGF Wachstumsfaktorfamilie und ist sowohl für die physiologische als auch pathologische Angiogenese essenziell [4,16]. Bei TSP-1 handelt es sich um einen Tumorsuppressor der die Angiogenese inhibiert [17,18]. Diese neu entstandenen Gefäße tragen zum Wachstum des Tumors bei. Ein weiteres Merkmal von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Dies kann unter anderem durch den Verlust von E-Cadherin, einem wichtigen Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, in Karzinomzellen zustande kommen. Maligne Zellen gewinnen so die Fähigkeit in anderes Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden. Dies erschwert die Behandlung dieser Erkrankung enorm.

Häufig kommt es durch Veränderungen im Genom zur Entstehung einer Tumorzelle. Mutierte Genotypen können zu einem Selektionsvorteil führen, wodurch sich diese Zellen ausbreiten und schließlich die lokale Gewebeumgebung dominieren. Oftmals sind Signalwege, welche normalerweise die genomische Integrität überwachen, in Karzinomzellen beeinträchtigt, wodurch die Mutationsrate erhöht wird [4]. Als „Wächter des Genoms“ kommt p53 eine zentrale Bedeutung zu. Daneben gibt es ebenfalls Belege dafür, dass epigenetische Veränderungen zum Erwerb von charakteristischen Tumorfähigkeiten beitragen können [4,19]. Zu epigenetischen Veränderungen zählen DNA-Methylierungen oder Histonmodifikationen, welche die Expression von Genen beeinflussen [19]. Die Methylierung der DNA führt hierbei zu einem *Gen-Silencing* [20]. Histonmodifikationen hingegen können sowohl zur Überexpression als auch zu Herunterregulation eines Gens führen [21,22].

Weiterhin können Entzündungen zur Tumorentwicklung beitragen, indem sie der Mikroumgebung des Tumors bioaktive Moleküle zuführen. Dazu zählen z.B. Wachstumsfaktoren, die proliferative Signale aufrechterhalten oder Überlebensfaktoren, die den Zelltod begrenzen. Weiterhin können pro-angiogene Faktoren oder extrazelluläre Matrix-modifizierende Enzyme, die Angiogenese, Invasion und Metastasierung erleichtern. Ebenso können induktive Signale zur Aktivierung eines epithelial-mesenchymalen Überganges und anderer Tumormerkmal-fördernder Programme führen [4,23].

Neben der chronischen und oft unkontrollierten Zellproliferation kommt es ebenfalls zu einer Anpassung des Energiestoffwechsels, um das Zellwachstum und die Zellteilung zu fördern. Dies ermöglicht es der proliferierenden Zelle, Nährstoffe wie Glukose effizienter in Biomasse umzuwandeln, indem sie eine unnötige katabolische Oxidation zu Kohlendioxid vermeidet, Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen bewahrt und den Anabolismus fördert [24].

Maligne Zellen bevorzugen auch in Gegenwart von Sauerstoff Glykolyse als Energiegewinnungsoption, auch bezeichnet als „aerobe Glykolyse“ oder Warburg-Effekt. Häufig wird der Glukosetransporter GLUT1 in Tumorzellen hochreguliert, um den Glukoseimport ins Zytoplasma zu erhöhen. Daneben können Tumorzellen der Zerstörung durch das Immunsystem entgehen, indem sie beispielsweise infiltrierende CTLs und NK-Zellen lähmen, durch Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren wie z.B. TGF- β [4].

Ein weiteres Merkmal von Tumorzellen ist ihre phänotypische Plastizität. Dies beschreibt die Fähigkeit der terminalen Differenzierung zu umgehen bzw. auch umzukehren. So können Karzinomzellen aus gesunden Zellen hervorgegangen sein, indem sie sich wieder in eine Vorläuferzelle zurückdifferenzieren. Zusätzlich gibt es zunehmend Beweise dafür, dass ein verändertes Mikrobiom zur Tumorentstehung beiträgt. So können Mikroorganismen, hauptsächlich Bakterien, eine schützende oder schädliche Auswirkung auf die Tumorentwicklung, das Fortschreiten der Erkrankung oder auch auf das Therapieansprechen haben. Ein Beispiel hierfür bietet die Entwicklung eines Gallengangkarzinoms. Durch eine Darmdysbiose können Bakterien durch die Pfortader zur Leber gelangen. Dadurch werden Hepatozyten stimuliert Chemokine wie CXCL1 zu exprimieren welche MDSCs rekrutieren, um so der Immunzerstörung zu entgehen. Weiterhin können z.B. Bakterien, die an der Oberfläche von Dickdarmepithelzellen binden und Ligandenmimetika produzieren, die epitheliale Proliferation stimulieren.

Außerdem gibt es immer mehr Belege dafür, dass in bestimmten Zusammenhängen seneszente Zellen die Tumorentwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung stimulieren. So konnte gezeigt werden, dass seneszente Tumorzellen zu proliferativen Signalen beitragen, die Apoptose verhindern, die Angiogenese induzieren, sowie die Invasion und Metastasierung stimulieren. Weiterhin können seneszente Tumorzellen diesem Stadium der Seneszenz entkommen und so unter anderem zu Therapieresistenzen führen [3].

EINLEITUNG

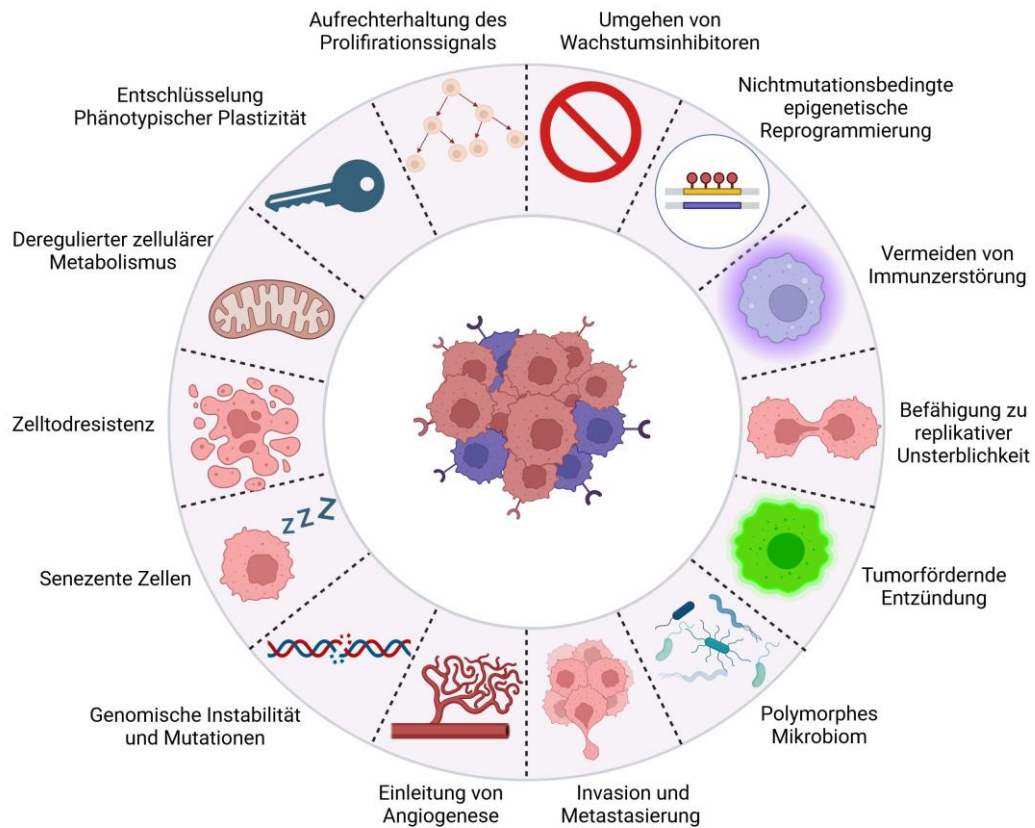


Abbildung 1: Hallmarks of Cancer. Die erweiterten *Hallmarks of Cancer* nach Hanahan [3]

1.2 Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes

1.2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Lebertumore gehören zu den am sechshäufigsten diagnostizierten Tumorentitäten und zu den Malignomen mit der dritthöchsten Sterblichkeitsrate weltweit (Abbildung 2). Das hepatozelluläre Karzinom (*engl. hepatocellular carcinoma* (HCC)) ist dabei die häufigste Tumorentität der Leber [1,25].

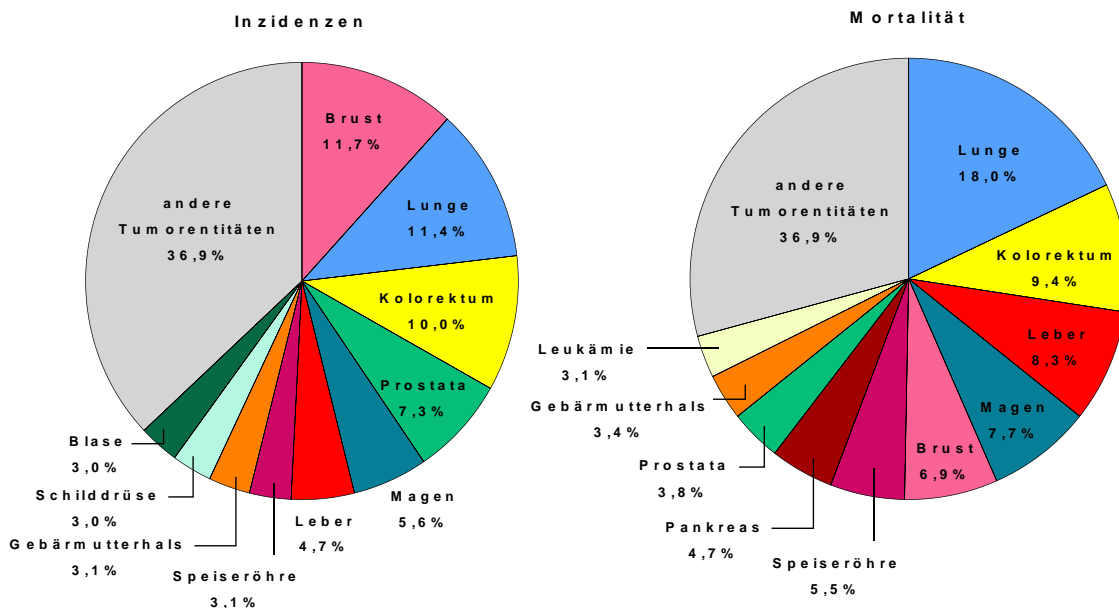


Abbildung 2: Verteilung der Inzidenzen und Mortalitäten für die 10 häufigsten Tumorentitäten im Jahr 2020 nach Sung et al. [1].

Chronische Infektionen mit Hepatitis B und C Viren (HBV und HCV) sind dabei die häufigsten Risikofaktoren für Lebertumore weltweit [25–27]. So können 54% der diagnostizierten HCC-Fälle auf eine HBV-Infektion und 31% der HCC-Fälle auf eine HCV-Infektion zurückgeführt werden [28]. Andere relevante Faktoren, die das HCC begünstigen, sind übermäßiger Alkoholkonsum, Tabak, Übergewicht, Diabetes, das metabolische Syndrom und Exposition gegenüber Aflatoxin [25,28–31].

Die Anzahl an Lebertumor-Erkrankungen ist über die letzten zwei Jahrzehnte stark angestiegen (44,6%), dies ist begründet mit der Zunahme von Diabetes und Adipositas und mit der weltweit steigenden Inzidenz des metabolischen Syndroms [1,32,33]. Alle diese Faktoren begünstigen die Entwicklung einer Leberzirrhose, einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HCCs [28]. Studien haben gezeigt, dass ca. 8% aller Patienten mit einer Leberzirrhose ein HCC entwickeln [34].

Die Leberzirrhose beginnt mit einer Fetteinlagerung in die Hepatozyten. Es kann zwischen einer alkoholischen Fettlebererkrankung und einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), die sich zu einer nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) entwickeln kann, unterschieden werden. Eine NASH ist durch Steatose, Entzündungen, degenerative Veränderungen und Fibrose gekennzeichnet [28].

Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur Entstehung von Narbengewebe in der Leber und Entzündungssignale werden ausgesendet. Mit der Zeit nimmt die Fibrose zu und es kommt zu immer mehr Entzündungssignalen und zur Zellschrumpfung in der Leber. Es entwickelt sich eine Zirrhose [35]. In diesem Stadium ist die Leber besonders anfällig für genomische Instabilitäten, einem wichtigen *Hallmark of Cancer* [4,28]. Außerdem ist es wahrscheinlicher, dass Hepatozyten somatische Mutationen, epigenetische Veränderungen und Genumlagerungen ansammeln, welche die Tumorprogression vorantreiben. Dies kann unter anderem durch HBV und HCV-Viren initiiert werden, indem die Viren entweder in das Wirtsgenom integriert werden oder Doppelstrangbrüche verursachen. Die häufigsten molekularen Veränderungen im HCC sind Mutationen im TERT-Promotor, p53, CTNNB1 sowie epigenetische Aberrationen (Abbildung 3) [28].

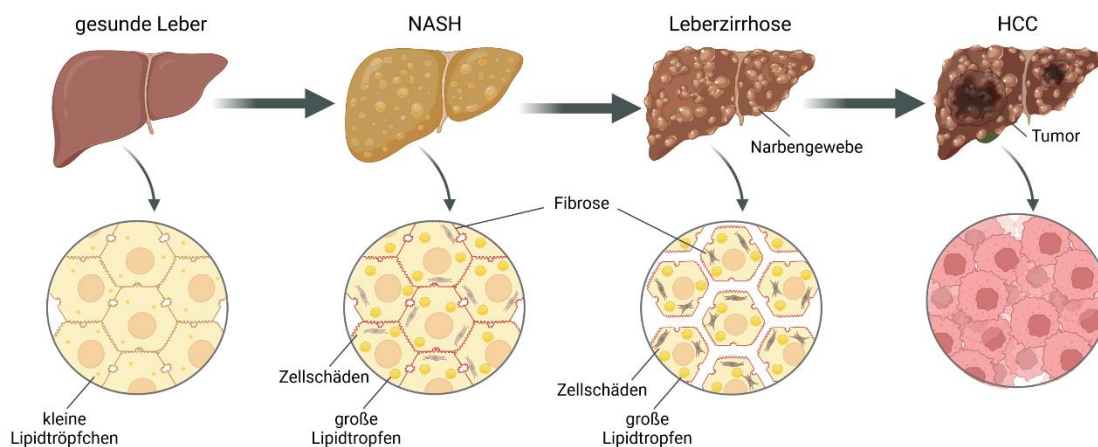


Abbildung 3: Schematische Darstellung der pathologischen Veränderungen die zur Entstehung eines HCCs führen. Eine NASH entsteht, wenn sich in einer gesunden Leber Fett ansammelt und eine zunächst mäßige Fibrose auftritt. Beim Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur Entstehung von Narbengewebe in der Leber und Entzündungssignale werden ausgesendet. Daraufhin werden die Fibroblasten zur Heilung der Narben stimuliert und es kommt zur Fibrose. Mit der Zeit nimmt die Ablagerung von Fibrose zu und führt zu mehr Entzündungen und Zellschrumpfung in der Leber. Daraus entwickelt sich eine Leberzirrhose, welche sich bis zum HCC ausbilden kann. Nach *Motalebzadeh und Eskandari* [35].

Die Behandlung des HCC ist abhängig vom Tumorstadium und der Leberfunktion. Das HCC wird deshalb nach dem aktualisierten Klassifizierungssystem der *Barcelona-Clinic-Liver Cancer* (BCLC) eingestuft [28,36]. Das HCC wird danach in 5 Stadien eingeteilt (von sehr früh bis Endstadium) und die Behandlung entsprechend des Stadiums angepasst. Die Prognose des Patienten richtet sich im Anschluss nach der Tumorlast, der Leberfunktion und dem körperlichen Gesamtzustand.

Nach der deutschen S3-Leitlinie für Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome vom August 2023 soll HCC-Patienten im fortgeschrittenen Stadium, mit Fernmetastasen oder einer Tumorlokalisierung, die lokoregionär nicht kontrolliert oder reseziert werden können als Erstlinientherapie eine Kombination von Atezolizumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen PD-L1) und Bevacizumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF) oder Tremelimumab (neutralisierender humanisierter monoklonaler Anti-CTLA-4-Antikörper) und Durvalumab (neutralisierender humanisierter monoklonaler Anti-PD-L1-Antikörper) angeboten werden. Patienten mit einer Kontraindikation für eine Immuntherapie soll eine Erstlinientherapie mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Lenvatinib oder Sorafenib angeboten werden. Bei HCC-Patienten, bei denen Atezolizumab/Bevacizumab nicht angewandt werden kann und die einen Tumorprogress unter einer Therapie mit Sorafenib/Lenvatinib aufweisen, soll eine weitere Systemtherapie angeboten werden [37].

Hierfür stehen die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Regorafenib und Cabozantinib oder bei einem Alpha-Fetoprotein-Wert von ≥ 400 ng/ml der VEGFR2-Antikörper Ramucirumab (neutralisierender monoklonaler humanisierter Antikörper) zur Verfügung. Dennoch sind die Therapieoptionen insbesondere durch die meist bestehende Leberzirrhose als Grunderkrankung und Präkanzerose eingeschränkt [36–43].

1.2.2 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (*engl. colorectal carcinoma* (CRC)) ist die am dritthäufigsten diagnostizierte Tumorentität und die zweithäufigste Todesursache im Bereich der Tumorerkrankungen weltweit [1]. Faktoren, die das CRC begünstigen, sind dabei übermäßiger Alkoholkonsum, Übergewicht, Tabak und Bewegungsmangel [1,44]. Die Anzahl an CRC-Erkrankungen ist über die letzten Jahrzehnte weltweit angestiegen [1,2,45].

Die meisten Darmtumore entwickeln sich in einem mehrstufigen Prozess, der eine Reihe von histologischen, morphologischen und genetischen, sowie epigenetischen Veränderungen umfasst, die sich im Laufe der Zeit akkumulieren [46,47]. Diese Veränderungen führen zu einer Hyperproliferation und dadurch zur Entstehung eines Darmpolypen. Häufig entwickelt sich ein Kolonkarzinom aus einem gutartigen Polypen. Es handelt sich dabei um örtlich begrenzte nicht-maligne Wucherungen oder Ansammlungen anormaler Zellen in der Darmschleimhaut.

Mutationen in den Genen für APC, DCC, KRAS oder p53 führen zu einer unkontrollierten Zellproliferation und zum Fortschreiten des Kolonkarzinoms. Durch diesen Prozess kommt es zur Akkumulation weiterer Mutationen, wodurch es zur Entstehung eines malignen Phänotyps kommt. Dadurch können die proliferierenden Zellen in den Polypen auch die Fähigkeit erwerben in die Darmwand einzudringen und es kommt zur Entstehung eines Tumors (Abbildung 4) [47].

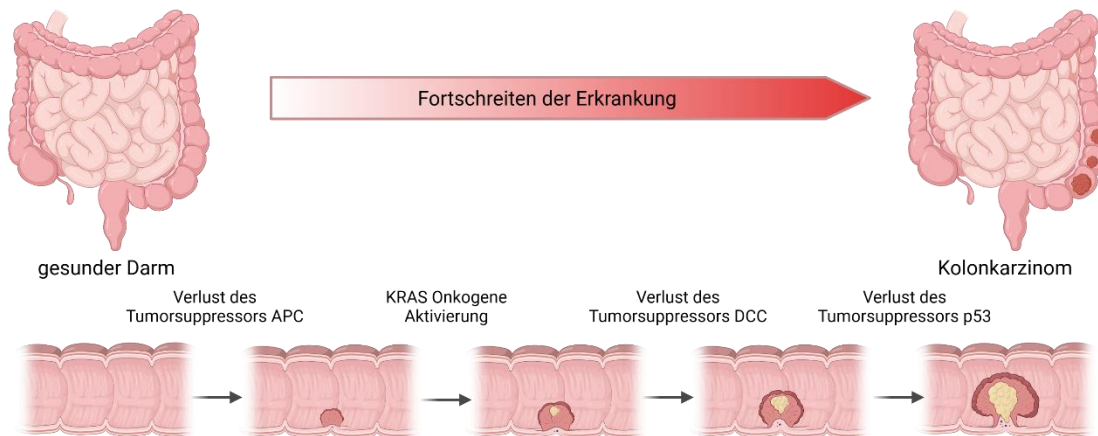


Abbildung 4: Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (CRC). Kolontumore wachsen langsam und verursachen häufig erst Symptome, wenn eine beträchtliche Größe (mehrere Zentimeter) erreicht ist. Er kann dann den Stuhlgang behindern und zu Krämpfen, Schmerzen oder Blutungen führen. Die meisten Dickdarntumore entwickeln sich in einem mehrstufigen Prozess, der eine Reihe von histologischen, morphologischen und genetischen Veränderungen umfasst, die sich im Laufe der Zeit akkumulieren. Nach *Hossain et al.* [47].

Abhängig vom Stadium des CRCs sind die Therapieoptionen limitiert [44]. In frühen Stadien wird eine vollständige chirurgische Resektion des Primärtumors angestrebt. Anschließend kann eine Behandlung mit Fluoropyrimidin, 5-Fluoruracil (5-FU)/Folinsäure oder Capecitabin folgen. 5-FU gehört dabei zu den wichtigsten Wirkstoffen in der Kombinationstherapie für die adjuvante Therapie. Gleichzeitig wird es auch zur Behandlung von metastasierten Tumoren eingesetzt [48]. Insgesamt werden ca. 25% der diagnostizierten CRCs erst in fortgeschrittenen Stadien festgestellt werden [47]. Die Therapie bei fortgeschrittenen CRC richtet sich nach dem Vorhandensein von primär resektablen oder primär nicht-resektablen Metastasen. Nach der deutschen S3-Leitlinie für Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms vom Januar 2019 soll Patienten des Kolonkarzinoms im fortgeschrittenen Stadium mit primär resektablen Metastasen eine Erstlinientherapie aus einer Kombination von Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin angeboten werden [48].

Die Therapie bei Patienten mit primär nicht-resektablen Metastasen richtet sich unter anderem nach dem Vorhandensein von Mutationen (z.B. RAS oder BRAF) oder dem Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität. So soll Patienten mit einer RAS-Mutation eine Erstlinientherapie mit Bevacizumab angeboten werden. Patienten mit einer Mikrosatelliteninstabilität sollten dagegen mit Pembrolizumab (monoklonaler Antikörper gegen PD-1) behandelt werden [48]. Liegt keine RAS-Mutation oder Mikrosatelliteninstabilität vor, kann hingegen unter anderem mit Fluoropyrimidin in Kombination mit Oxaliplatin oder Irinotecan ± Bevacizumab behandelt werden. Ist eine intensive Chemotherapie aufgrund des Allgemeinzustands des Patienten möglich, kann mit Fluoropyrimidin (5-FU mit Folinsäure, oder Capecitabin) in Kombination mit einem weiteren Zytostatikum (Irinotecan oder Oxaliplatin) behandelt werden [48]. Wie auch beim HCC führt die Entwicklung von Resistenzen auch beim CRC oftmals zu Behandlungsschwierigkeiten [49,50].

1.3 Apoptose und Nekroptose

Die Zelltod- und/oder Apoptoseresistenz ist eines der *Hallmarks of Cancer*. Häufig ist die Expression von anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Proteinfamilie, die den intrinsischen Apoptoseweg regulieren, in vielen Tumorentitäten verändert [51,52]. Diese Proteinfamilie besteht aus drei Untergruppen, die strukturell verwandt sind. Dazu gehören die anti-apoptotischen Bcl-2 ähnlichen Proteine (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1/BFL-1 und Bcl-B), die pro-apoptotischen Bax/Bak Proteine mit mehreren BH-Strukturdomänen (Bax, Bak und Bok), sowie die pro-apoptotischen BH3-*only* Proteine (Bim, Puma, Bid, Noxa, Bmf, Bik, und HRK). Kommt es zur Einleitung der Apoptose werden BH3-*only* Proteine hochreguliert und inhibieren anti-apoptotische BCL-2 Proteine wie Bcl-2 oder Mcl-1, dadurch kommt es zur Aktivierung von Bax und Bak. Durch Aktivierung kommt es zur Oligomerisierung von Bax und Bak, was zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran führt (*engl. mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)*). MOMP fördert die Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Molekülen, wie Smac/DIABOLO, aus dem Mitochondrium [51,53,54]. Zusammen mit der Caspase 9 und APAF-1 formt Cytochrom c eine sogenannte Todesplattform, das Apoptosom. Dies führt zur Spaltung und Aktivierung der Caspase 9, was wiederum zur Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führt. Die Effektorcaspasen spalten spezifische zelluläre Substrate, die letztendlich zur irreversiblen

Einleitung der Apoptose führen (Abbildung 5) [51,54,55]. Die intrinsische Apoptose kann durch verschiedene Faktoren, wie z.B. DNA-Schäden, Stress im ER oder Überlastung mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), initiiert werden.

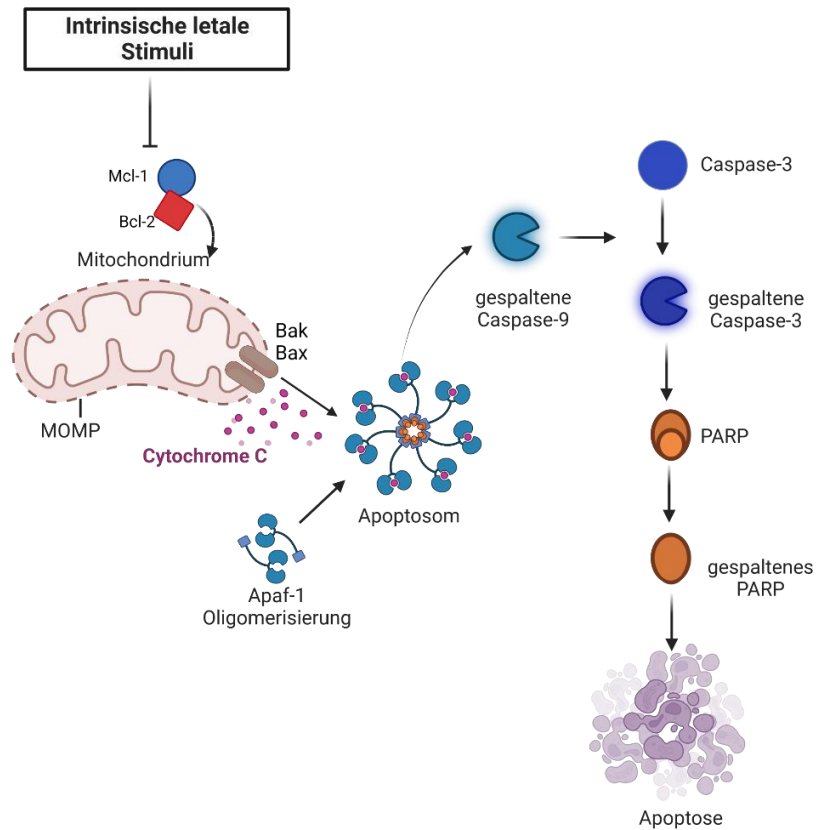


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Einleitung der intrinsischen Apoptose. Mitglieder der BCL-2 Protein Familie regulieren die Induktion der intrinsischen Apoptose. In gesunden Zellen schützen die anti-apoptotischen BCL-2 Proteine die Integrität der mitochondrialen Membran und gewährleisten das Überleben der Zelle, indem sie die Aktivierung von Bax und Bak verhindern. Durch Inhibition der BH3-*only* Proteine kommt es zur Oligomerisierung von Bax und Bak. Dies führt zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP), wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytosol kommt. Zusammen mit der Caspase 9 und APAF-1 formt Cytochrom c eine sogenannte Todesplattform, das Apoptosom. Die Aktivierung von Caspase 9 führt zur Initialisierung der Caspase-Kaskade, welche die Apoptose induziert [51].

Es kann zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose unterschieden werden. Die extrinsische Apoptose wird durch Störungen der extrazellulären Mikroumgebung ausgelöst. Anders als die intrinsische Apoptose ist die extrinsische Apoptose rezeptorvermittelt und wird durch externe Faktoren ausgelöst.

Zu den bekanntesten Rezeptoren gehören z.B. der CD95- oder der TRAIL-Rezeptor. Bindet ein Ligand z.B. CD95L an den CD95-Rezeptor kommt es zur Bildung eines intrazellulären Multiproteinkomplexes. Es bildet sich ein Komplex mit FADD (*engl. Fas-Associated Death Domain*), Caspase 8, Caspase 10 und FLIP_{L/S} (*FLICE-Proteine*). Dieser Komplex wird als DISC

(engl. *death-inducing signaling complex*) bezeichnet. Durch Bindung der Caspase 8 und 10 an den Proteinkomplex werden diese autokatalytisch gespalten und dadurch aktiviert. Dies führt letztlich zur Spaltung der Effektorcaspase 3 und damit zur Induktion der Apoptose (Abbildung 6) [51,56,57]. Die Aktivierung der Caspase 8 und 10 kann ebenfalls zur Spaltung von Bid führen. Das entstandene tBid (verkürztes Bid) wird anschließend in die Mitochondrien transloziert und führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Es kommt zur Bildung des Apoptosoms, gefolgt von der Aktivierung der Caspase 9 und anschließend Caspase 3. In sogenannten „Typ-II“-Zellen verstärkt Bid das apoptotische Signal, was zu einer effizienteren Apoptose führt. „Typ-II“-Zellen sind Zellen, die in erster Linie auf den intrinsischen Signalweg angewiesen sind. In „Typ-I“-Zellen hingegen führt die Aktivierung der Todesrezeptoren zu einer effizienten Aktivierung der Caspasen ohne Beteiligung der Mitochondrien. Anders als „Typ-II“-Zellen sind „Typ-I“-Zellen hauptsächlich auf den extrinsischen Signalweg angewiesen [56,57].

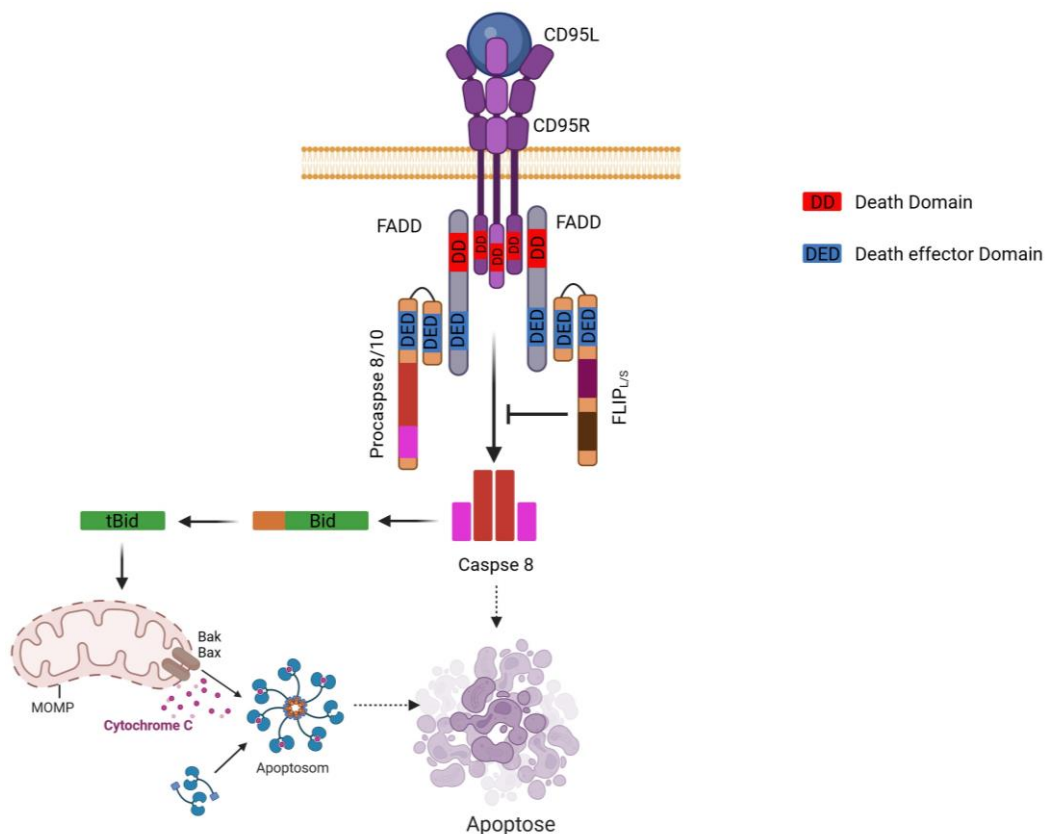


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Todesrezeptor Signalwegs (Death Receptor Signaling) am Beispiel des CD95-Rezeptors. Die Bindung des CD95L führt zur Trimerisierung des Todesrezeptors. Im Anschluss werden Adapterproteine wie FADD und die Initiatorcaspasen 8 und 10 rekrutiert. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen führt zur Aktivierung der Effektorcaspase z.B. Caspase 3 und zur Spaltung von Bid. tBid wird anschließend ins Mitochondrium transloziert und trägt zur Freisetzung von Cytochrom c bei. Dadurch kommt es zur Bildung des Apoptosoms gefolgt von der Aktivierung der Caspase 9 und 3. Dadurch wird das apoptotische Signal verstärkt [56,57]. Nach Lavrik et al. [56]

1.4 Dimethylfumarat (DMF)

Nach wie vor sind die Therapieoptionen für das HCC und das CRC begrenzt und Resistenzen erschweren die Behandlung. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapien essenziell. Hierfür werden auch Medikamente untersucht, die bereits für die Behandlung von anderen Erkrankungen zugelassen sind, z.B. Metformin oder Dimethylfumarat (DMF).

Bei DMF handelt es sich um einen entzündungshemmenden Diester der Fumarsäure mit Methanol, welcher bereits seit vielen Jahren zur Behandlung von Psoriasis (Fumaderm®) und seit geraumer Zeit auch zur Behandlung von Multipler Sklerose (MS) (Tecfidera®) eingesetzt wird [58–60]. DMF besitzt ein gutes Wirkungsprofil und ist relativ nebenwirkungsarm. So führt die Behandlung mit DMF unter anderem zu leichten Hautrötungen und gastrointestinalen Beschwerden (Diarrhö). Eine schwerwiegendere Nebenwirkung stellt hingegen die Lymphopenie dar, wodurch das Risiko für eine Virusinfektion ansteigt [61]. DMF befindet sich derzeit auch in verschiedenen klinischen Studien (Tabelle 1). Des Weiteren konnten wir dieses Jahr eine klinische Studie zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DMF beim kutanen T-Zell-Lymphom (*engl. cutaneous T-cell lymphoma* (CTCL)) abschließen [62].

In Maus-Modellen für andere (z.B. systemische Sklerose, Colitis) entzündliche Erkrankungen (zusätzlich zu Psoriasis oder MS) konnten durch DMF-Behandlung ebenfalls positive Effekte erzielt werden [63–65]. So konnte die Fibrose in Maus-Modellen mit systemischer Sklerose durch DMF-Behandlung reduziert werden [63,64].

DMF kann auf verschiedene Weisen eine Wirkung erzielen. Im Darm wird DMF durch Esterasen rasch zu Monomethylfumarat (MMF) hydrolysiert. MMF kann anschließend an den Hydroxycarbonsäure-Rezeptor (HCAR2) binden. Dies führt zur Aktivierung einer G-Protein-Signalkaskade. Es kommt zu einer Aktivierung der Phospholipase C beta und damit verbunden zu einem Anstieg von Ca^{2+} . Der Ca^{2+} -Anstieg aktiviert AMPK, was wiederum zu einem Anstieg von NAD^+ führt. Dies wirkt sich auf die NAD^+ abhängige Protein-Deacetylase Sirt1 aus und führt zur Hemmung von NF- κ B, wodurch die entzündliche NF- κ B-Signalgebung gehemmt wird. Anders als MMF ist DMF durch seinen ungeladenen Zustand in der Lage durch die Plasmamembran zu diffundieren. Dadurch kann DMF zur Succinylierung verschiedener Proteine innerhalb der Zelle führen. Durch eine Michael-Addition führt DMF dabei zu einer Monomethylsuccinylierung an Cysteinen (Abbildung 7). Dies kann z.B. zur Inaktivierung von GAPDH führen, wodurch es zur Herunterregulierung der aeroben Glykolyse in aktivierten myeloischen und lymphoiden Zellen kommt [59].

Tabelle 1: DMF-Verwendung in klinischen Studien.

Erkrankung	Offizieller Titel	Status	NCT-Nummer
Multiple Sklerose, schubförmig-schleichend	The Effect of Tecfidera® (Dimethyl Fumarate, BG00012) on the Gut Microbiota as a Causal Factor for Gastrointestinal Associated Adverse Events.	Phase IV	NCT02471560 [66]
Parkinson	Preliminary Study of the Quality of the Oral Flora in Parkinson's Patients		NCT03827551 [67]
Glioblastom im Erwachsenenhirn Riesenzell-Glioblastom bei Erwachsenen Gliosarkom bei Erwachsenen	Phase I Trial of Dimethyl Fumarate, Temozolomide, and Radiation Therapy in Glioblastoma Multiforme	Phase I	NCT02337426 [68]
Obstruktive Schlafapnoe Schlaf-Apnoe	A Randomized Clinical Trial of Dimethyl Fumarate as a Novel Therapeutic Agent for Obstructive Sleep Apnea	Phase II	NCT02438137 [69]
Rheumatoide Arthritis	A Phase 2a, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Study to Evaluate the Efficacy, Safety and Tolerability of BG00012 When Given with Methotrexate to Subjects With Active RA Who Have Had an Inadequate Response to Conventional Disease-Modifying Anti-rheumatic Drug Therapy	Phase II	NCT00810836 [70]

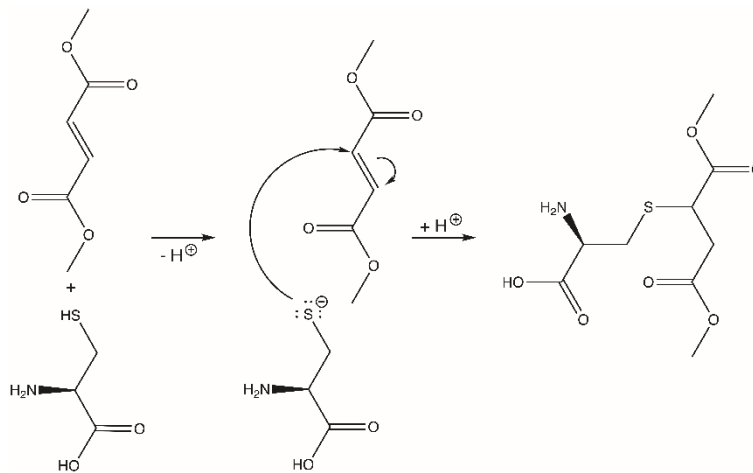


Abbildung 7: Succinylierung eines Cysteins durch DMF mittels Michael-Addition [59].

DMF wirkt unter anderem über den Nrf2-Signalweg und führt zur Produktion von antioxidativen Enzymen in Zellen [59]. In neurodegenerativen Erkrankungen spielt oxidativer Stress eine Schlüsselrolle [71]. So führt die Aktivierung von Nrf2 zur Besserung von Krankheitssyndromen bei Patienten. Nrf2 induziert dabei beispielsweise die Transkription antioxidativer Enzyme. Nrf2 ist unter normalen Bedingungen an das Keap1 Protein gebunden und wird proteasomal abgebaut. Oxidativer Stress und elektrophile Verbindungen, wie DMF, können Keap1 durch die Succinylierung seiner Cysteinreste inaktivieren. Dadurch dissoziiert Nrf2 von Keap1 und transloziert in den Nukleus und bindet dort an den Transkriptionsfaktor MafK. Dieses Heterodimer bindet an Promotorregionen für Gene, die für antioxidative, entgiftende und zytoprotektive Enzyme kodieren. Der Nrf2-Signalweg reguliert neben antioxidativen und zellulären Abwehrmechanismen, auch den Kohlenhydratstoffwechsel, die Kognition, Entzündungen, den Eisenstoffwechsel, die Metastasierung, die NADPH-Regeneration, den Lipidstoffwechsel und den Gewebeumbau.

Weiterhin inhibiert DMF unter anderem den entzündungsfördernden NF-κB Signalweg [59]. Eine der Komponenten, die den NF-κB-Komplex bilden ist p65 (auch bekannt als RelA). In Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass DMF eine Monosuccinilierung am Cystein 38 von p65 durchführt, wodurch die NF-κB Aktivität inhibiert wird. Durch die eingeführte Succinylierung wird die Translokation von p65 in den Nukleus verhindert [72]. DMF kann den NF-κB Signalweg ebenfalls indirekt über den Nrf2 Signalweg inhibieren. Dabei konkurrieren Nrf2 und p65 um den transkriptionellen Ko-Aktivator GBP-300. GBP-300 acetyliert Histone, wodurch die Chromatinstruktur aufgelockert und eine Bindung an die DNA möglich wird [59].

Durch Succinylierung des katalytischen Cysteins des glykolytischen Enzyms GAPDH reguliert DMF ebenfalls die aerobe Glykolyse in aktivierten myeloischen und lymphoiden Zellen herunter. GAPDH ist zentrales Enzym des aeroben glykolytischen Stoffwechselwegs (Warburg Effekt) [73,74]. Dieser Mechanismus ist unter anderem für die Anti-Tumor Eigenschaften von DMF verantwortlich [59].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DMF Apoptose in primären von Patienten stammenden CD41-Zellen und CTCL-Zelllinien induziert, wobei gesunde Zellen kaum auf eine DMF-Therapie ansprechen [75,76].

DMF führt dabei in diesen malignen Zellen eine spezifische Monomethylsuccinylierung an Thioredoxin 1 (Txr1) durch, die zur Inhibition dieses Proteins führt. Dies führt zu einer Blockade des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der in diesen Malignomen konstitutiv exprimiert wird [75,77]. In einem Maus-Modell konnte neben der signifikanten Reduktion des Primärtumors auch eine Verringerung der Metastasen festgestellt werden [76].

Neben einer konstitutiven NF- κ B-Expression können ebenfalls Proteine der BCL-2 Familie, z.B. Bcl-2, in Tumorzellen überexprimiert sein [55]. Es konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Inhibition von NF- κ B (DMF) und Bcl-2 (ABT-199/Venetoclax) in einem Xenograft Maus-Modell sowohl effektiv das Tumorwachstum reduzierte als auch das Gesamtüberleben (*engl. Overall Survival (OS)*) erhöhte. Dies ist einerseits auf die synergistische Induktion des Zelltods in CTCL-Zellen und andererseits auf die Hemmung der Tumorpheriferation zurückzuführen. Die Kombinationsbehandlung war dabei der ABT-199-Monotherapie sowohl in Bezug auf die Wirksamkeit als auch auf die Verträglichkeit überlegen [78].

1.5 BH3-Mimetika

Da Proteine der BCL-2 Familie in vielen Tumorentitäten häufig überexprimiert sind, bieten sich diese Proteine als Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer Wirkstoffe an [55,79]. Diese sogenannten BH3-Mimetika imitieren die Wirkung von BH3-*only* Proteinen, indem sie die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine blockieren und somit die Apoptose direkt auslösen. Zu diesen Inhibitoren gehören unter anderem der bereits erwähnte oral bioverfügbare, selektive Bcl-2 Inhibitor ABT-199/Venetoclax und der selektive Mcl-1 Inhibitor MIK665/S64315 [80,81].

1.5.1 ABT-199/Venetoclax

ABT-199 wurde erstmals 2016 für die Behandlung von chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) von der Europäischen Arzneimittelagentur zugelassen [82,83].

In einer Phase I Studie bei Patienten mit rezidivierender oder refraktärer CLL wurde ein Gesamtansprechen von 79% und eine vollständige Ansprechrate von 20% erreicht. Die Therapie mit ABT-199 wurde von Patienten mit CLL oder akuter myeloischer Leukämie (AML) besser vertragen als eine herkömmliche Chemo-Immuntherapie [84]. Allerdings führt auch bei einer ABT-199 basierten Therapie die Entwicklung von Resistenzen zu Behandlungsschwierigkeiten [85,86].

Resistenzen gegenüber ABT-199 sind dabei häufig mit der Überexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-X_L und/oder Mcl-1 assoziiert [86]. Um Resistenzen zu überwinden und die Effektivität zu erhöhen, wurde ABT-199 auch mit anderen Therapeutika kombiniert [87–89]. ABT-199 ist bereits in Kombination mit Obinutuzumab oder Rituximab (neutralisierende monoklonale Anti-CD20-Antikörper) in CLL zugelassen. In Kombination mit Azacitidine, Decitabine, oder Cytarabine ist ABT-199 zur Behandlung von AML zugelassen [90]. Wie bereits erwähnt induziert ABT-199 auch zusammen mit DMF synergistisch Zelltod in CTCL. Die Kombination von DMF und ABT-199 führte zur verstärkten Bak/Bax-Oligomerisierung und zur Spaltung von Caspase 3. Dies konnte sowohl in Primärzellen, in verschiedenen Zelllinien des CTCL sowie in einem korrespondierenden Xenograft Maus-Modell gezeigt werden [78].

Die Expression von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen ist häufig im HCC verändert [91]. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Bcl-2 die Chemosensitivität in HCC und Hepatom-Zellen erhöht. Dies unterstützt die Hypothese, dass Bcl-2 eine Schutzfunktion im HCC einnimmt. So konnte das BH3-Mimetikum ABT-737 (ein Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-W Inhibitor), bei gleichzeitiger Inhibition der Mcl-1 Expression z.B. durch Sorafenib oder Celestrol Apoptose induzieren [92,93].

1.5.2 MIK665/S64315

Das anti-apoptotische BCL-2 Protein Mcl-1 spielt vor allem in HCC eine entscheidende Rolle, da es dort als entscheidender Überlebensfaktor agiert und eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika übernimmt [94–96]. Daher ist der selektive Mcl-1 Inhibitor MIK665/S64315 eine vielversprechende Therapieoption.

MIK665/S64315 erzielte in Maus-Modellen für verschiedene solide und hämatologische Tumorentitäten beträchtliche Wirkungen, wobei gesundes Gewebe verschont wurde [81]. Eine Kombination aus MIK665 und ABT-199 wird zurzeit in einer klinischen Studie der Phase I/II in AML untersucht [97]. Weiterhin konnte in Melanom-Zellen gezeigt werden, dass solide Tumore ebenfalls auf eine MIK665/ABT-199 Wirkstoffkombination ansprechen. Die Behandlung mit beiden BH3-Mimetika führte zu einer reduzierten Zellviabilität und einer gesteigerten PARP-Spaltung. In einem korrespondierenden Xenograft Maus-Modell konnte ebenfalls eine Reduktion des Tumorumfanges bei minimaler Toxizität gezeigt werden [98].

1.6 Ziele der Arbeit

Das HCC ist die häufigste Tumorentität in der Leber und gehört zu den Malignomen mit der dritthöchsten Mortalitätsrate (Abbildung 2). Die verschiedenen therapeutischen Ansätze sind abhängig vom Stadium des Tumors und richten sich nach der Klassifizierung der BCLC. Danach umfassen derzeitige Therapieoptionen die chirurgische Resektion, die lokale Ablation, eine Lebertransplantation und die systemische Therapie. Als Erstlinientherapie für eine systemische Therapie haben sich Kombinationstherapien mit Immuntherapeutika als hochwirksam erwiesen und sind Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sorafenib oder Lenvatinib überlegen. Das HCC ist jedoch sehr therapieresistent, weshalb die Behandlung oftmals schwierig ist. Daher ist die Identifizierung neuer therapeutischer Optionen zur Behandlung des HCCs dringlich erforderlich. Hierbei stehen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt: (i) Wie kann man die Metastasierung und die Proliferation von Malignomen inhibieren und (ii) wie kann man effektiv Zelltod in HCC-Zellen induzieren. Für diese Fragestellungen wurden unterschiedliche therapeutische Ansätze analysiert.

Ein Fokus lag auf dem Fumarsäureester DMF, welcher im klinischen Gebrauch ist. Es wurde analysiert, ob DMF ein mögliches Therapeutikum zur Behandlung des HCCs darstellt. Es sollte einerseits die Inhibition der Metastasierung und andererseits die Zelltodinduktion nach DMF-Behandlung in HCC-Zelllinien untersucht werden (Abbildung 8).

Weiterhin wurden sowohl die Einzeltherapie als auch die Kombinationstherapie von BH3-Mimetika in einer HCC-Zelllinie untersucht. Es wurde der oral verfügbare selektive Bcl-2 Inhibitor ABT-199/Venetoclax und der Mcl-1 Inhibitor MIK665/S64315 verwendet. Die Analyse der Zelltodinduktion durch entweder Einzel- oder Kombinationstherapie und die dahinterliegenden molekularen Mechanismen standen hierbei im Vordergrund. Das Ziel der

Kombination zweier BH3-Mimetika bestand weiterhin darin durch Kombination von Wirkstoffen die Dosis zu reduzieren. Die BH3-Mimetika Kombination wurde ebenfalls mit DMF kombiniert. Auch bei dieser Tripplewirkstoffkombination sollte eine Dosisreduktion erzielt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Effekte in Bezug auf Inhibition der Metastasierung und Zelltodinduktion bei Kombination von DMF, ABT-199 und MIK665 verstärken (Abbildung 8).

Ein weiteres Ziel bestand in der Untersuchung neuer Therapieoptionen für das CRC. Beim CRC handelt es sich um die dritthäufigste diagnostizierte Tumorentität und die Tumorerkrankung mit der zweithöchsten Mortalitätsrate. Wie beim HCC sind die verschiedenen Therapieansätze abhängig vom Tumorstadium. Zu den wichtigsten Wirkstoffen in der Kombinationstherapie gehört 5-FU, welches in Kombination mit Folinsäure und Oxaliplatin zur Behandlung von fortgeschrittenen Karzinomen eingesetzt wird. Da 5-FU bereits in Kombination verwendet wird, sollte ebenfalls die Kombination von DMF und 5-FU untersucht werden. Im Vordergrund stand die Analyse der Zelltodinduktion nach Behandlung mit den beiden Wirkstoffen. Es sollte untersucht werden, ob eine Kombination mit DMF die Zelltodinduktion steigert (Abbildung 8).

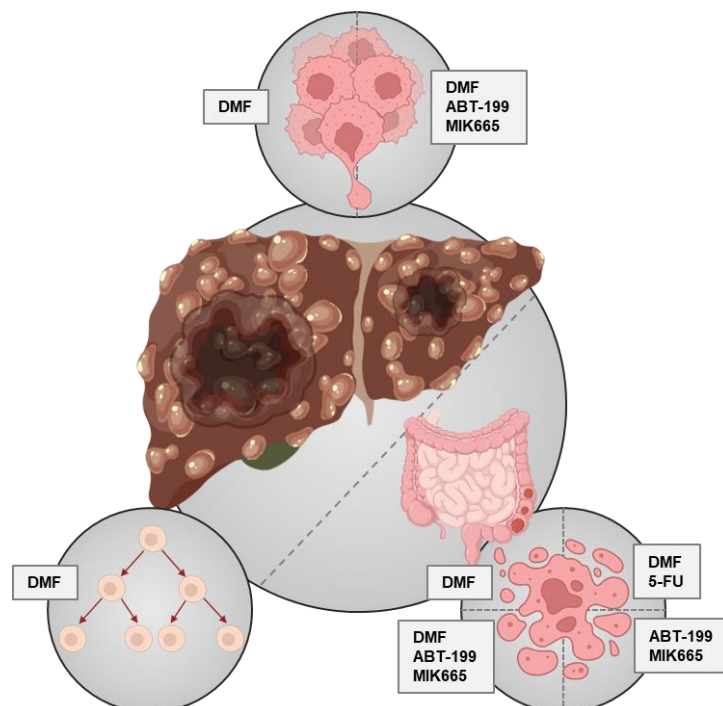


Abbildung 8: Schematische Darstellung der untersuchten Elemente dieser Doktorarbeit. Bestandteile der Analysen innerhalb dieser Doktorarbeit waren die Inhibition der Metastasierung und der Proliferation sowie der Zelltodinduktion nach DMF-Behandlung in HCC-Zelllinien. Weiterhin sollte die Zelltodinduktion nach BH3-Mimetika Behandlung sowie die dahinter liegenden molekularen Mechanismen untersucht werden. Ebenfalls wurde eine Tripplewirkstoffkombination bestehend aus DMF, ABT-199 und MIK665 erforscht. Als finaler Aspekt sollte ebenfalls die Zelltodinduktion in CRC-Zellen nach DMF/5-FU-Kombinationstherapie analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Beschreibung	Hersteller
6-Well Platen	Corning, USA
96-Well Mikrotiterplatten (weiß, klarer Boden)	Berthold, Deutschland
Analysenwaage Excellence XA 105	Mettler Toledo, Deutschland
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, USA
Durchflusssystem BD LSR Fortessa	BD Bioscience, USA
Eppendorf Gefäße 1,5 ml, 2 ml, 5ml	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon® Filter 40 µm,	Corning, USA
Falcon® Gefäße 15 ml, 50 ml	Corning, USA
Grade Whatman 3MM Chr Fließpapier	GE Healthcare, USA
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph, Deutschland IKA RH basic 2, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Mini-PROTEAN® TGX Gel	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, USA
Schüttelgerät	IKA KS 260 basic, Deutschland
Sterilbank Laminair	Thermo Fisher Scientific, USA
TC20™ Zählkammer	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Thermoblock	Eppendorf AG, Deutschland
Vortexer	VWR, USA
Wärmeschränke	Binder, Deutschland
Zählkammern für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Zellkultur-Flaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Corning, USA
Zellkulturschale TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland

Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Deutschland
ZOE™ Fluoreszenzmikroskop	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Ibidi Inserts	Ibidi, Deutschland

2.1.2 Software

Microsoft Excel 2016, Power Point, Word	Microsoft, USA
ChemDraw	PerkinElmer, Inc., USA
Compusyn-Software	ComboSyn, Inc., USA
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, USA
Sigmaplot 14,0	Systat, Deutschland
Flowjo	BD Bioscience, USA
BioRender	© 2023 BioRender, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	BD Bioscience, USA
6 x Laemmli SDS-Probenpuffer, nicht reduzierend	Thermo Fisher Scientific, USA
Accutase® -Lösung	Sigma-Aldrich, USA
Annexin V FITCs	BD Bioscience, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Deutschland
Cell Proliferation Staining Reagent - Green Fluorescence - Cytopainter	Abcam, vereinigtes Königreich
cOmplete™ ULTRA, Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylfumarate (DMF)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Anprotect, Deutschland

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gradientengel (4-20 %)	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Hepes	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
ProLong™ Gold Eindeckmittel mit DAPI	Thermo Fisher Scientific, USA
ReBlot Plus Strong Stripping Lösung (10x)	Merck Millipore, USA
RIPA	Merck Millipore, USA
SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
zVAD	Selleckchem
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, USA
Caspase-Glo® 8 Assay	Promega, USA
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega, USA
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	Promega, USA

Die Auflistung enthält die Nicht-Standard-Reagenzien. Standard-Reagenzien wurden von handelsüblichen Herstellern bezogen und sind hier nicht aufgeführt.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot-Analysen

RIPA Lysepuffer

50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,25 % Deoxycholsäure, 1 % NP-40, 1 mM EDTA versetzt mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren

Nach der Zellernte wurde das Zellpellet mit 80 – 100 µl RIPA Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C und 18 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Proteinbestimmung

BCA-Lösung

BCA Reagenz mit Kupfer(II)-sulfat in einem Verhältnis von 50:1

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten wurde die BCA-Methode angewandt. Dazu wurden die Proben in Triplikaten und einer Verdünnung von 1/10 bei einer Absorption von 492 nm gemessen. Als Standard dienten BSA-Konzentrationen von 200 – 2000 µg/ml.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS Laufpuffer

25 mM Tris Base, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

6x Laemmli Puffer

375 mM-Tris-HCl (pH 6,8), 9 % SDS, 50 % Glycerin, 9 % β-Mercaptoethanol, 0,03 % Bromphenolblau

Die Proben wurden auf 20 µg Proteingehalt eingestellt und mit 6x Laemmli Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 10 min denaturiert und kurz bei 380 x g zentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurden käuflich erwerbliche Gradientengele 4% - 20% verwendet. Die Proben wurden mittels 1x SDS Laufpuffer für 50 min bei 150 V, 500 mA aufgetrennt.

2.2.4 Antikörper

Blocklösung

5% Milch oder 5% BSA in PBST

Für die Proteindetektion wurde eine PVDF-Membran mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 2) bei 4°C über Nacht entweder in einer Milch oder BSA basierten Blocklösung schüttelnd inkubiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte in der Blocklösung des Primärantikörpers. In der folgenden Tabelle 2 sind die verwendeten Antikörper angegeben.

Tabelle 2: verwendete Antikörper für Westerblot-Analysen.

Antigen	ID	Hersteller	Verdünnung	Blocklösung	Stamm
CASP3	9662S	Cell Signaling	1/1000	Milch	Kaninchen
PARP1	9542L	Cell Signaling	1/1000	Milch	Kaninchen
CASP9	PA5 - 17913	Invitrogen	1/1000	BSA	Kaninchen
β-Actin-HRP	A3854	Sigma Aldrich	1/10 000	Milch	Maus

Für die histochemischen Analysen wurden die Antikörper aus Tabelle 3 verwendet. Für die Färbung von Huh7 Zellen wurden ungekoppelte Antikörper gegen Cytochrome c und TOMM20, mit entsprechenden Isotyp Kontrollen verwendet. Die Analyse erfolgte mit einem Alexa Fluor 594- und Alexa Fluor 488-gekoppelten Antikörper.

Tabelle 3: verwendete Antikörper für Immunhistochemie.

Antikörper	ID	Hersteller	Verdünnung	Stamm
Cytochrome c	Ab110325	abcam	2 µg/ml	Maus IgG2a
TOMM20	424065	Cell Signaling	2 µg/ml	Kaninchen IgG
Isotyp Kontrolle Maus IgG2a	ab18415	abcam	5 µg/ml	Maus IgG2a
Isotyp Kontrolle Kaninchen IgG	Ab172730	abcam	2 µg/ml	Kaninchen IgG
Anti mouse Alexa Flour 594	A11005	Invitrogen	1/1000	Maus IgG2a
Anti rabbit Alexa Flour 488	A11078	invitrogen	1/1000	Kaninchen IgG

2.2.5 Western Blot-Analysen

Detektionslösung

2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarin-Säure in DMSO, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,03% H₂O₂

SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate

Western Blot Waschpuffer

1x PBS mit 0,05 % Tween-20 (PBST)

Blockierlösung

5 % Milch oder 5 % BSA in PBST

Strippinglösung

1x Re-Blot Plus Strong

Anodenpuffer A

300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer B

25 mM Tris, 20 % Methanol, pH10,4

Kathodenpuffer C

25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4

Die zuvor aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Systems auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und die Filterpapiere sowie das SDS-Gel in den jeweiligen Anoden- bzw. Kathodenpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte bei 80 mA (pro Gel) für 50 min. Das SDS-Gel war dabei zum Minuspol und die PDVF-Membran zum Pluspol gerichtet. Anschließend wurde die Membran für 1 h unter Schwenken in Blockierlösung bei RT inkubiert. Es folgte, schüttelnd, eine Inkubation mit Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde anschließend 3 x 5 min in Western Blot Waschpuffer gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit entsprechendem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Die Membran wurde anschließend für 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteine, dazu wurde die entsprechende Detektionslösung verwendet. Um die Membran anschließend mit weiteren Antikörpern anfärben zu können, wurde die Membran für 20 min schüttelnd mit Strippinglösung bei RT inkubiert und darauffolgend für 1 h blockiert. Es folgte die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

2.2.6 Immunhistochemie

Immunhistochemie Waschpuffer

1 x PBS mit 0,05% Tween-20 (PBST)

Für die immunhistochemischen Analysen wurden Huh7 Zellen nach Stimulation 1 x mit PBS gewaschen und für 5 min mit 4% Paraformaldehyd bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und mit 0,1% TritonX-100 für 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1% BSA in PBST geblockt. Folgend wurden die Zellen zusammen mit dem primären Antikörper (Tabelle 3) bei 4°C für 12 h bis 16 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern (Tabelle 3). Nach 3 x Waschen wurden die Zellen mit ProLong™ Gold Eindeckmittel mit DAPI bedeckt und mit Deckgläschen fixiert. Die Analyse erfolgte am Keyence BZ-X810.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien in vitro

Hep3B Zellkultur Medium

MEM, 10% FCS

HepG2 Zellkultur Medium

RPMI, 10% FCS

Huh7 Zellkultur Medium

DMEM *high glucose*, 10% FCS

HCT116 Zellkultur Medium

McCoy's 5A, 10% FCS

Einfrierlösung

FCS, 5% DMSO

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 300 x g. Das Zellpellet wurde anschließend im entsprechenden Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche bei 37°C, 5% - 10% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Die Hep3B Zellen wurden 1/3 – 1/4, die HepG2 Zellen wurden 1/4 - 1/5 und die Huh7 und HCT116 wurden 1/4 - 1/10 gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Folgend wurden die Zellen mit 1 x Trypsin-EDTA versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im entsprechenden Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sowie Filtrieren vereinzelt. Für Experimente erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl mittels TC20™ Automated Cell Counter.

2.3.2 Zellkulturmodelle zur Behandlung mit DMF, 5-FU, ABT-199 und MIK665

Für die Analysen des relativen ATP-Gehalts (2.3.7), des Zellzykluses (2.3.4), des Zelltods (2.3.3), für die Herstellung von Proteinlysaten (2.2.1) sowie für die Immunhistochemie (2.2.6) wurden die Zellen in einer Konzentration von $1,5 - 2,0 \cdot 10^5$ /ml ausgesät.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen DMF, 5-FU, ABT-199 oder MIK665 behandelt. Eine Ko-Behandlung mit zVAD erfolgte 30 min vor der Behandlung mit DMF, ABT-199 oder MIK665. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit behandelt.

2.3.3 Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Zelltodinduktion

1x Bindepuffer

140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 7,4

Zur Analyse der Zelltodinduktion wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und mit dem Überstand inklusiv apoptotischer/toter Zellen für 5 min, bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde darauffolgend in 1x Bindepuffer aufgenommen und mit DAPI (0,01 µg/ml) und Annexin V FITCs (0,54 µg/ml) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Messungen wurden am LSRFortessa durchgeführt.

2.3.4 Durchflusszytometrie zur Untersuchung des Zellzyklus

1 mg/ml RNase

Zur Analyse des Zellzyklus wurden sowohl vitale adhärenente Zellen als auch Zellen im Überstand verwendet. Die Zellen wurden gemäß 2.3.1 mit 1 x Trypsin abgelöst und anschließend 5 min, bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach einmal mit PBS gewaschen und darauffolgend in 300 µl PBS aufgenommen. Unter langsamen Vortexen erfolgte die Zugabe von 700 µl 100% EtOH zur Fixierung der Zellen (Endkonzentration 70% EtOH). Die fixierten Zellen wurden bei -20°C über Nacht gelagert. Am Tag der Messung wurden die Zellen pelletiert (5 min, 3 400 x g) und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 400 µl PBS aufgenommen, 50 µl RNase hinzugegeben (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde DAPI (0,5 µg/ml) hinzugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden vor der Messung durch ein Zellsieb (Porengröße 35 µm) gegeben und anschließend am LSRFortessa vermessen.

2.3.5 Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Proliferation

Cell Proliferation Staining Reagent - Green Fluorescence - Cytopainter

Zur Analyse der Proliferation wurden $1,0 \cdot 10^5$ Zellen mit 500 nM Cytopainter versetzt. Es folgte eine Inkubation von 4 h – 6 h bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und anschließend stimuliert. Zur Analyse wurde der Überstand verworfen und die Zellen wie in 2.3.1 beschrieben abgelöst. Die Messungen wurden am LSRFortessa durchgeführt.

2.3.6 Migrationsassay

Zur Analyse der Migrationsfähigkeit wurden die Zellen in 2-well Kultur-Inserts in einer 24 – Well Platte ausgesät. Pro Insertkammer wurden 70 µl einer Zellsuspension mit der Konzentration $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml verwendet. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Inserts entfernt und die Zellen stimuliert. Die Darstellung der Bilder erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Für die Auswertung des relativen Lückenschlusses wurde die Software Image J verwendet.

2.3.7 ATP-Assay

CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega)

Zur Analyse des relativen ATP-Gehalts wurden die Hep3B, HepG2, Huh7 und HCT116 Zellen wie in 2.3.2 in eine 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend behandelt. Die Messung des relativen ATP-Gehalts erfolgte mittels CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.8 Caspase-Aktivitätsassays

Caspase-Glo® 3/7 Assay

Caspase-Glo® 8 Assay

Caspase-Glo® 9 Assay

Zur Analyse der Caspase-Aktivität wurden Huh7 und HCT116 Zellen in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in eine 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend behandelt. Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgte mittels Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay oder Caspase-Glo® 9 Assay (Promega) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4 Statistische Analysen und andere Berechnungen

Zur statistischen Auswertung diente Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 8. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem student's t-test oder der *One-way-Anova* durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. *p $< 0,05$, **p $0,01$, ***p $< 0,001$, ****p $< 0,0001$. Sofern keine weiteren Angaben gemacht wurden, beziehen sich die angegebenen p-Werte auf Kontrollzellen, die mit DMSO behandelt wurden.

Der Kombinationsindex (*engl. Combination Index (CI)*) wurde mittels der CompuSyn Software berechnet (<http://www.combosyn.com/> Version 1)[99]. Dazu wurde die IC_{50} aus den Ergebnissen des spezifischen Zelltods (Einzel- und Kombinationsbehandlung) berechnet.

Die IC_{50} wurde anschließend durch eine sigmoidale Dosis(log)-Wirkungs-Kurve (variable Steigung) abgeleitet. Dazu wurde die Software GraphPad Prism 8 verwendet. Werte $< 0,9$ deuten auf Synergismus hin, kleinere IC-Werte deuten auf eine stärkere Synergie.

3 Ergebnisse

3.1 Zeit- und dosisabhängige Reduktion des relativen ATP-Gehaltes durch DMF-Behandlung in HCC-Zelllinien

Der zelluläre Metabolismus dient nicht allein der Energiegewinnung von Zellen, die entstehenden Metaboliten beeinflussen ebenfalls Signalkaskaden, Zelltod, Proliferation sowie die Differenzierung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DMF die Zellviabilität bzw. den relativen ATP-Gehalt in verschiedenen soliden Tumorentitäten reduziert und somit zu einer Energie-Depletion führt [100,101]. Weiterhin konnte in einem CCK8 Assay bereits gezeigt werden, dass die Zellviabilität nach DMF-Behandlung in verschiedenen HCC-Zelllinien reduziert wird [102]. Es sollte nun untersucht werden, ob eine DMF-Behandlung ebenfalls den relativen ATP-Gehalt in HCC-Zelllinien reduziert. Mit Hilfe eines lumineszenz-basierten Assays wurde der relative Gehalt von ATP in den Zelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B nach DMF-Behandlung bestimmt (Abbildung 9a). Die Zellen wurden dazu mit verschiedenen DMF-Konzentrationen von 25 μ M – 100 μ M bis zu 72 h behandelt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Es war eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der ATP-Konzentration in den analysierten Zelllinien zu erkennen (Abbildung 9b – d).

Nach 48 h Behandlungszeit konnte in der Huh7-Zelllinie eine Reduktion des ATP-Gehalts von bis zu 38,2% und nach 72 h bis zu 46,4% beobachtet werden (Abbildung 9b). In HepG2-Zellen konnte der ATP-Gehalt um bis zu 47,8% nach 48 h und 72 h Behandlungszeit reduziert werden (Abbildung 9c). Die Zelllinie Hep3B zeigte die größten Effekte in Bezug auf die Reduktion des Energie-Levels. Es konnte eine Reduktion der ATP-Menge um bis zu 40,3% nach 48 h und um bis zu 58,7% nach 72 h DMF-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 9d). DMF ist somit in der Lage den relativen ATP-Gehalt in HCC-Zelllinien zu reduzieren und führt demzufolge zu einer Energie-Depletion in den untersuchten Zelllinien.

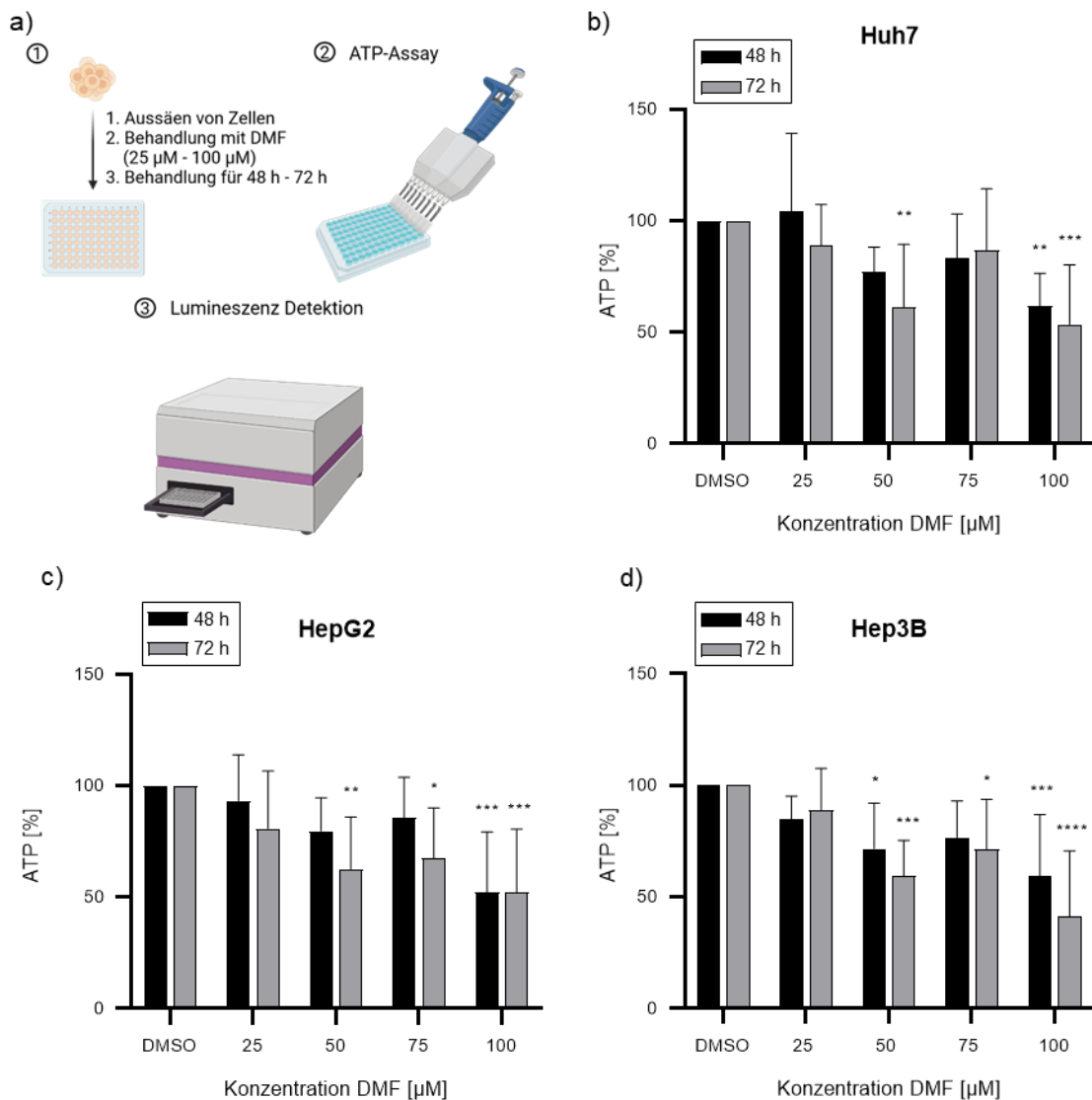


Abbildung 9: Behandlung mit DMF reduziert den relativen ATP-Gehalt von HCC-Zelllinien. (a) Schematische Durchführung eines ATP-Assays. HCC-Zelllinien wurden bis zu 72 h mit den angegebenen DMF-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl vitaler Zellen, ATP-produzierender Zellen und dem Lumineszenzsignal. ATP-Gehalt von (b) Huh7 (n = 8), (c) HepG2 (n = 8) und (d) Hep3B (n = 9). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001 verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

3.2 Die Behandlung mit DMF führt zur Reduktion der Proliferation in Huh7, HepG2 und Hep3B

Verminderte ATP-Mengen können zu einer verminderten Proliferation führen [103]. Deshalb wurde die Proliferationsrate nach DMF-Behandlung untersucht. Dazu wurde ein FACS-basierter Proliferationsassay durchgeführt. Bei diesem Assay wurden die Zellen mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (*CytoPainter Cell Proliferation Staining Reagent*,

abcam) markiert, der das Cytoplasma der Zellen anfärbt. Durch die Proliferation wird das Fluoreszenzsignal der Zellen fortschreitend schwächer, da sich die Menge des Farbstoffes bei jeder Zellteilung halbiert. Auf dieser Grundlage kann die Proliferation der Zellen verfolgt werden. Die unterschiedlichen Hepatomzelllinien wurden zunächst gefärbt und anschließend mit aufsteigenden DMF-Konzentrationen (25 μ M – 100 μ M) für bis zu 96 h behandelt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Um eine mögliche Zelltodinduktion zu verhindern, wurden die Zellen ebenfalls mit zVAD, einem Pan-Caspase-Inhibitor, behandelt. In *Schroeder et al.* konnten wir bereits zeigen, dass DMF Apoptose in CTCL-Zellen induziert [75]. Durch die simultane Behandlung mit zVAD kann untersucht werden, ob die Proliferationsinhibition wirklich auf DMF und nicht auf Caspase induzierten Zelltod zurückzuführen ist.

Es war zu beobachten, dass mit steigender DMF-Konzentration die Proliferation der Zellen ohne und mit zVAD-Behandlung zeit- und dosisabhängig inhibiert wurde (Abbildung 10a – j). Die Proliferationsinhibition war bei gleichzeitiger Behandlung mit zVAD jedoch ausgeprägter (Abbildung 10a, c, d, g, h und j). Die größten Effekte konnten bei den Zelllinien Huh7 und Hep3B beobachtet werden (Abbildung 10a – c, h – j). Die Proliferationsrate wurde bei diesen Zelllinien um bis zu 15% reduziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DMF die Proliferation von Huh7, HepG2 und Hep3B konzentrationsabhängig inhibiert.

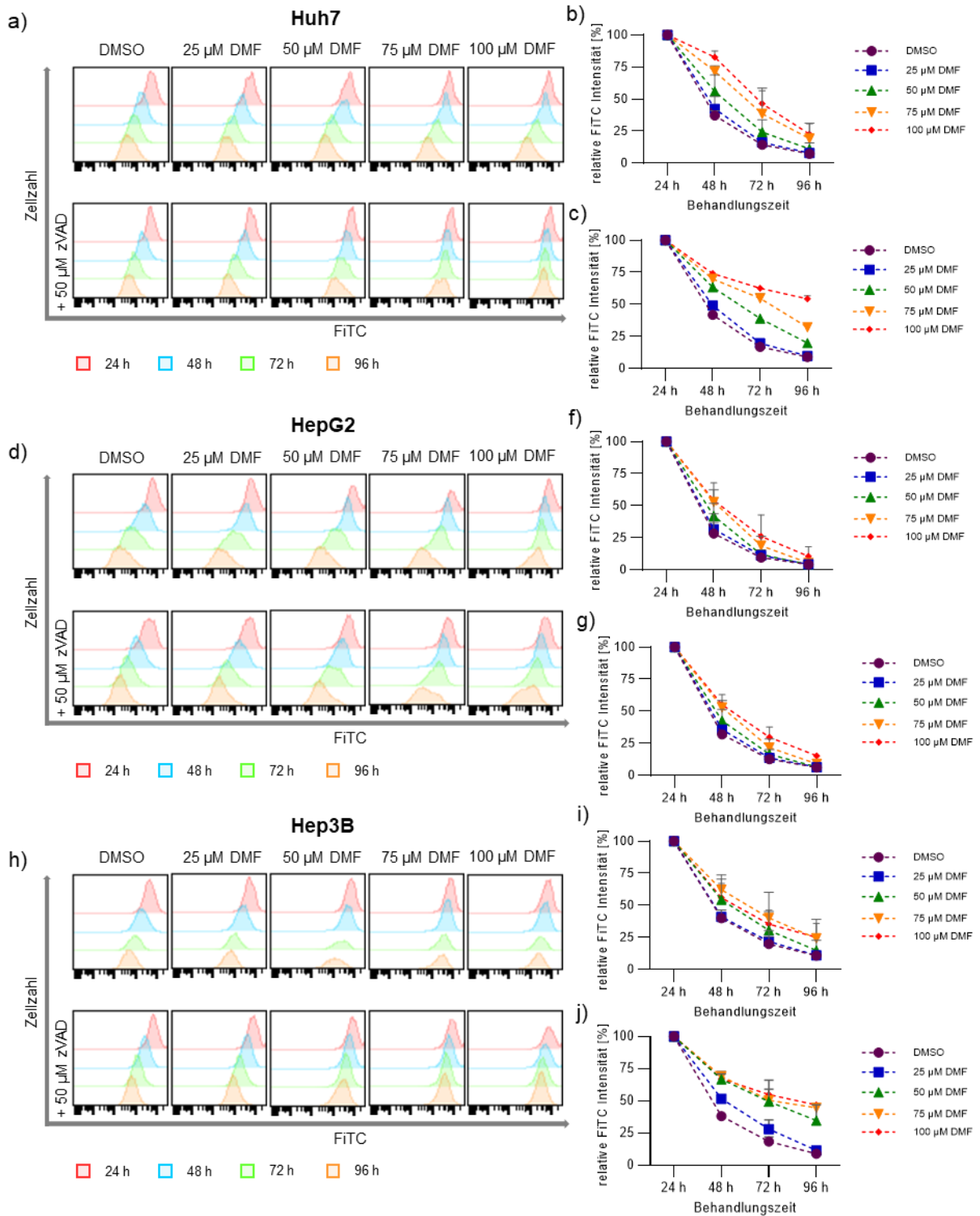


Abbildung 10: DMF inhibiert die Proliferation von HCC-Zelllinien. Die HCC-Zelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B wurden mit den angegebenen DMF-Konzentrationen für bis zu 96 h behandelt. Die Zellen wurden mit *CytoPainter Cell Proliferation Staining Reagent* gefärbt und die Proliferation mittels Durchflusszytometrie analysiert. DMSO diente als Kontrolle. Proliferationsassay von (a) Huh7 (n = 3; +zVAD n = 2). (d) HepG2 (n = 4, +zVAD n = 2) und (h) Hep3B (n = 3, zVAD n = 3). Quantifizierung der relativen FITC-Intensität von (b, c) Huh7, (f, g) HepG2 und (i, j) Hep3B.

3.3 DMF induziert G2-Arrest in Huh7 und Hep3B

Die Proliferation ist mit dem Zellzyklus verknüpft. Deshalb wurde folgend untersucht, ob die Proliferationsinhibition durch einen Zellzyklusarrest initiiert wird. Der Zellzyklus besteht aus verschiedenen Phasen bezeichnet als G₀/G₁ (*Gap*), S (Synthese), G₂ (Wachstumsphase) und M (Mitose) (Abbildung 11a).

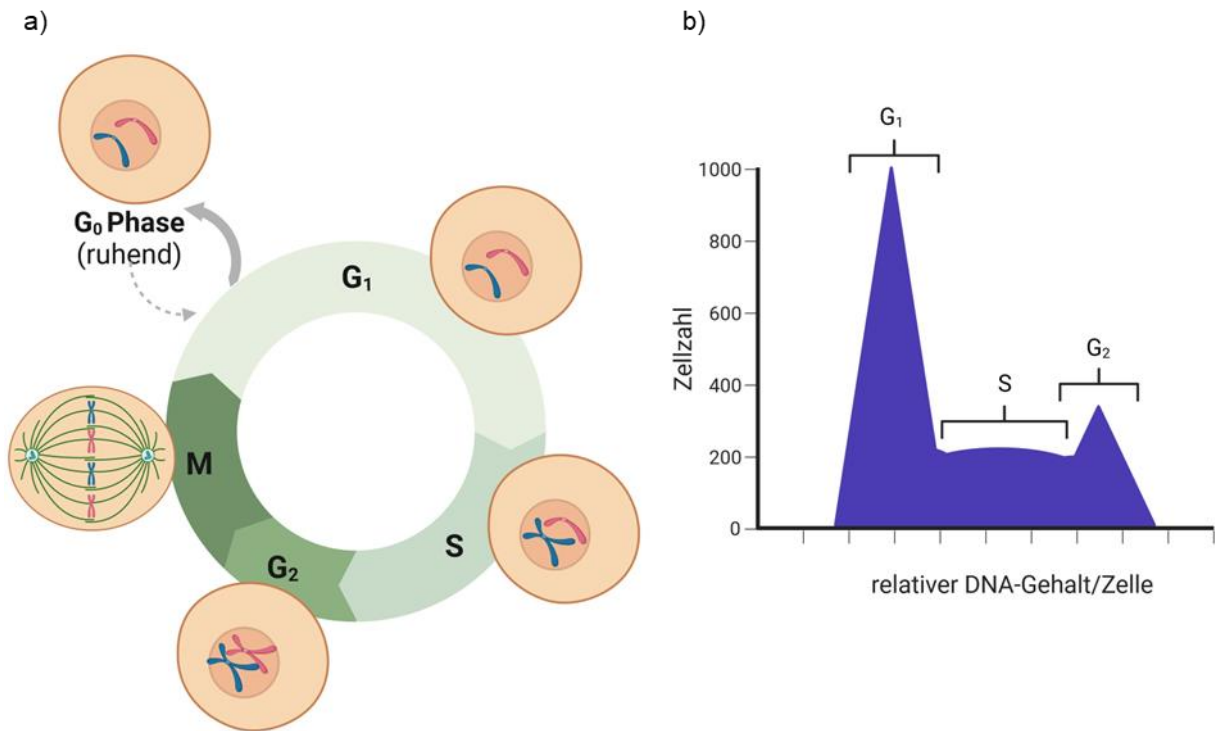


Abbildung 11: (a) Schematische Darstellung des Zellzyklus. G (*GAP*), S (Synthese), M (Mitose). Von der G₁-Phase kann eine Zelle in den Zustand G₀ wechseln, diese Zellen werden als ruhend (quiescent) bezeichnet. (b) Schematische Darstellung einer Zellzyklusanalyse im FACS, gemessen wird der relative DNA-Gehalt in den Zellen.

Die G₁- und G₂-Phasen markieren dabei eine Pause im Zellzyklus, hervorgerufen durch zwei Ereignisse, zunächst der DNA-Replikation und anschließend der Mitose. Des Weiteren können Zellen auch von der G₁- in die G₀-Phase, ein ruhendes Stadium, wechseln. Die G₁- und G₂-Phasen werden dabei genutzt, um z.B. Zellbestandteile neu zu synthetisieren oder die Chromosomensegregation vorzubereiten [104]. Zur Bestimmung des Zellzykluses wurde ein FACS-basierter Assay durchgeführt (Abbildung 11b). Für diesen Assay wurden die Zelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B mit aufsteigenden DMF-Konzentrationen (25 μ M – 100 μ M) behandelt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die Zellen wurden bis zu 48 h behandelt, anschließend mit Ethanol fixiert und der relative DNA-Gehalt mittels DAPI-Färbung bestimmt.

Nach 6 h Behandlung mit DMF konnte in keiner Zelllinie eine Veränderung des Zellzyklus beobachtet werden (Abbildung 12a – c). In HepG2 konnte auch nach 48 h Behandlungszeit mit DMF keine Veränderung im Zellzyklus gemessen werden (Abbildung 12 b). Dies ist konsistent mit den vorherigen Ergebnissen zur Inhibition der Proliferation. Auch bei diesem Experiment zeigte die Zelllinie HepG2 die geringsten Effekte. Bei den Zelllinien Huh7 und Hep3B führte eine DMF-Behandlung nach 24 h zu einem G2-Arrest ab 75 μ M DMF (Abbildung 12a und c). Dieser Effekt verstärkte sich nach einer Behandlungszeit von 48 h. Bereits eine Behandlung mit 50 μ M DMF führte nach 48 h zu einem G2-Arrest sowohl bei Huh7 als auch bei Hep3B (Abbildung 12a und c). In Hep3B nahm gleichzeitig ebenfalls die Synthese-Phase zu (Abbildung 12c). Es befanden sich zeitgleich weniger Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass DMF abhängig von der Zelllinie (Hep3B und Huh7) zu einem G2-Arrest führt.

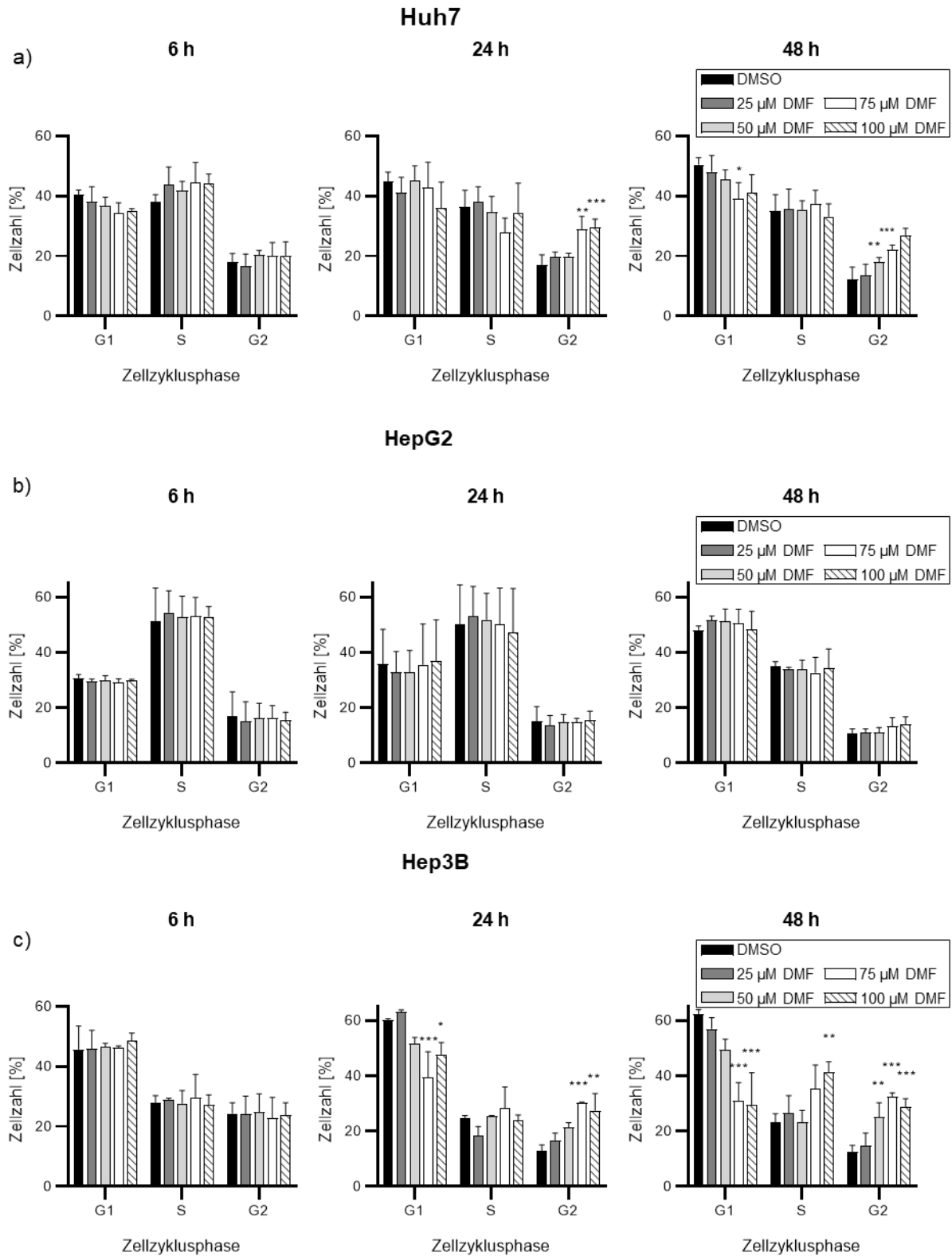


Abbildung 12: DMF induziert G2-Arrest in HCC-Zelllinien. Die Zelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B wurden mit den angegebenen DMF-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Zellzyklusanalyse von (a) Huh7 nach 6 h, 24 h und 48 h. (n = 3) (b) HepG2 nach 6 h, 24 h und 48 h. (n = 3) (c) Hep3B nach 6 h, 24 h und 48 h (n = 3). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

3.4 Inhibition der Migration durch DMF in Huh7 und Hep3B Zellen

Im Zusammenhang mit der durch DMF induzierten ATP-Depletion wurde weiterhin untersucht, ob auch die Migration der HCC-Zelllinien beeinflusst wird. Die Fähigkeit zur Migration ist für die Bildung von Metastasen essenziell [105]. Deshalb wurde ein Migrationsassay für die Hepatomzelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B durchgeführt. Bei diesem Assay entsteht mit Hilfe eines Inserts ein zellfreier Raum mit definierter Spaltbreite. Anschließend kann die Migration der Zellen in den zur Verfügung stehenden Raum mikroskopisch beobachtet werden. Da wir in CTCL-Zellen DMF-induzierte Apoptose nachweisen konnten, wurde zVAD hinzugegeben, um sicherzustellen, dass die Inhibierung der Migration nicht durch Zelltod verursacht wird [75]. Es war zu beobachten, dass die Migration von Hep3B als auch von Huh7 Zellen konzentrationsabhängig durch DMF inhibiert wurde (Abbildung 13a, b, e und f).

Die Migration von Huh7 Zellen wurde bereits bei einer Konzentration von 25 μ M DMF nach 24 h sowie bei 50 μ M DMF nach 48 h Behandlung inhibiert (Abbildung 13a und b). Bei Hep3B konnte eine DMF-Konzentration von 50 μ M ebenfalls die Migration nach 24 h und 48 h inhibieren (Abbildung 13e und f). Eine Behandlung mit 100 μ M DMF für 48 h führte in Hep3B Zellen zum vollständigen Migrationsstopp (Abbildung 13e und f). Die Migration der HepG2 Zellen konnte nicht untersucht werden. Es war nur eine minimale basale Migration unabhängig von der DMF-Behandlung zu beobachten (Abbildung 13c und d). Eine Behandlung mit DMF führt damit abhängig von der Zelllinie zur Inhibition der Migration im HCC.

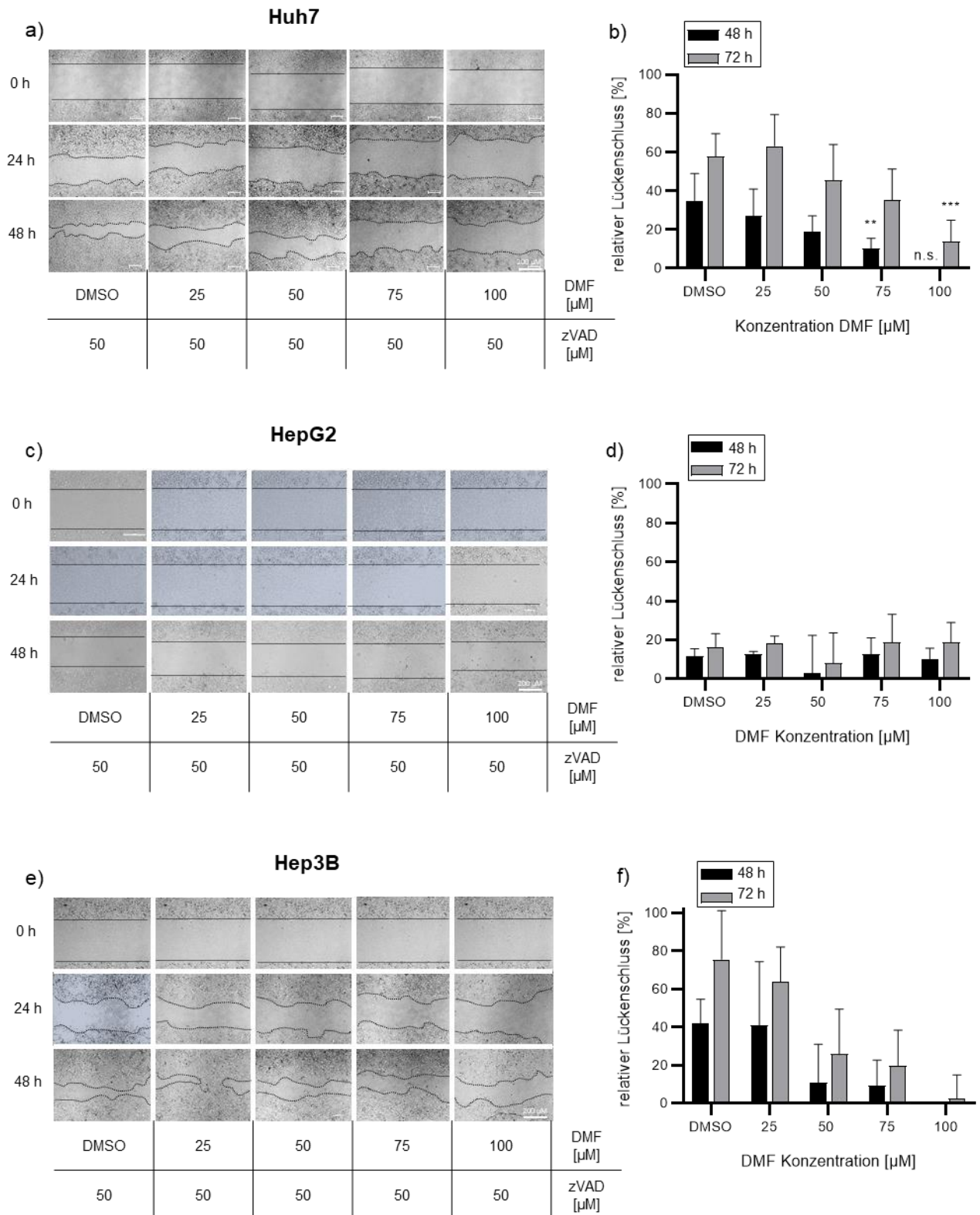


Abbildung 13: DMF inhibiert die Migration von HCC-Zelllinien. Zellen wurden mit den angegebenen DMF-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Repräsentative Abbildung eines Migrationassays von **(a)** Huh7, **(c)** HepG2 und **(e)** Hep3B. Aufnahmen wurden nach 0 h, 24 h und 48 h gemacht. Quantifizierung des Lückenschlusses von **(b)** Huh7 (n = 3), **(d)** HepG2 (n = 2), und **(f)** Hep3B (n = 3). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

3.5 DMF induziert Zelltod in HCC-Zelllinien

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde unter anderem der ATP-Gehalt untersucht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine DMF-Behandlung sowohl zur Proliferation- als auch zur Migrationsinhibition führt. Diese Daten lassen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, ob eine DMF-Behandlung auch zum Zelltod führt. Deshalb wurde untersucht, ob DMF Zelltod in Hepatomzelllinien induziert. Dazu wurden Huh7, HepG2 und Hep3B Zellen nach der Behandlung mit DMF mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei Induktion von Apoptose kommt es zu einer Veränderung in der Plasmamembran. Phosphatidylserin ist ein Lipid, das bei vitalen Zellen auf der intrazellulären Membranseite lokalisiert ist. Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Translokation zur extrazellulären Seite der Membran. Deshalb dient Phosphatidylserin auch als Apoptose Marker [106]. Das mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Protein Annexin V FITC (nicht membrangängig) bindet an Phosphatidylserin und kann somit die Induktion von Apoptose im Durchflusszytometer anzeigen. Um Apoptose und späte Apoptose/Nekroptose unterscheiden zu können, wird ein zweiter Farbstoff (DAPI), der in die DNA interkaliert, benötigt. In den Stadien der späten Apoptose bzw. Nekrose kommt es zum Verlust der Membranintegrität wodurch ein Eindringen von DAPI in die Zelle und somit eine Interaktion mit der DNA möglich wird.

Im Durchflusszytometer kann ebenfalls die Größe und Granularität von Zellen bestimmt werden. Anhand dieser beiden Faktoren kann ebenfalls die Zelltodinduktion analysiert werden. Eine apoptotische Zelle ist durch Schrumpfung und eine erhöhte Granularität der Zelle gekennzeichnet. Eine nekrotische Zelle hingegen durch eine Vergrößerung der Zelle [51]. Um die Zelltodinduktion in Huh7, HepG2 und Hep3B zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit aufsteigenden DMF-Konzentrationen (25 μ M – 100 μ M) für bis zu 72 h behandelt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Es wurde der spezifische Zelltod mit folgender Formel $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ für alle Zelllinien berechnet [107]. Dabei konnte gezeigt werden, dass DMF in allen analysierten HCC-Zelllinien vor allem bei hohen DMF-Konzentrationen spezifischen Zelltod induziert (Abbildung 14a, d und g).

ERGEBNISSE

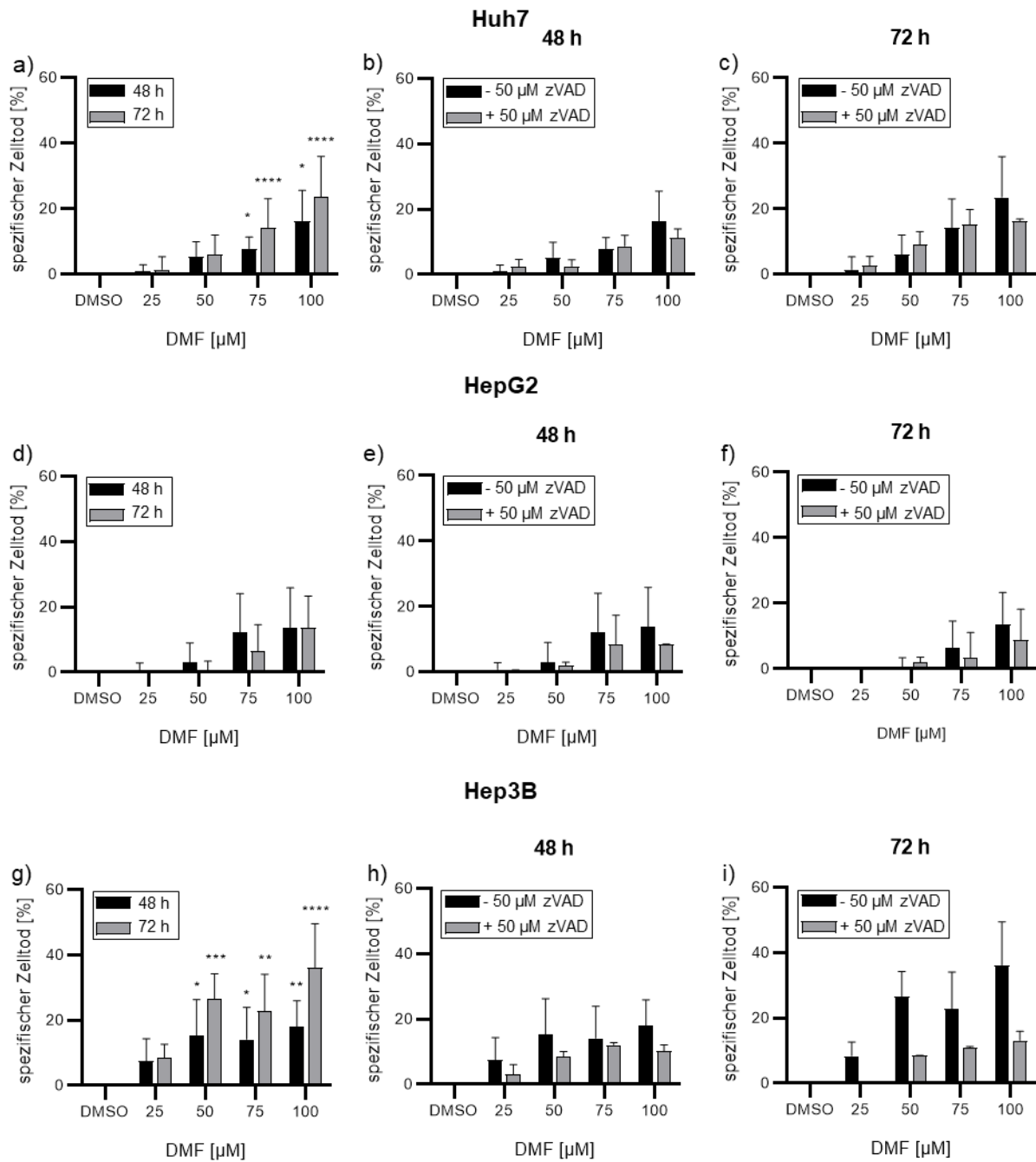


Abbildung 14: DMF induziert Zelltod in Huh7, HepG2 und Hep3B. Die HCC-Zelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B wurden mit den angegebenen DMF-Konzentrationen für bis zu 72 h behandelt. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) \cdot 100$ berechnet [107]. Spezifischer Zelltod nach bis zu 72 h Behandlung von (a) Huh7 (n = 6), (d) HepG2 (n = 3) und (g) Hep3B (n = 5). Spezifischer Zelltod von Huh7, HepG2 und Hep3B nach Behandlung mit DMF \pm 50 μM zVAD für 48 h. (b) Huh7 (n = 3), (e) HepG2 (n = 2) und (h) Hep3B (n = 2). Spezifischer Zelltod von Huh7, HepG2 und Hep3B nach Behandlung mit DMF \pm 50 μM zVAD für 72 h. (c) Huh7 (n = 3), (f) HepG2 (n = 2) und (i) Hep3B (n = 2). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001 verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

Bei einer DMF-Konzentration von 75 μM und einer Behandlungsdauer von 48 h kann ein Anstieg des Zelltods um 14,2% bei Huh7 und Hep3B (Abbildung 14a und d) sowie 12,3% bei

HepG2 (Abbildung 14g) gemessen werden. Eine Behandlungsdauer von 72 h mit einer DMF-Konzentration von 100 μM führte zu einem Anstieg der Zelltodrate um 23,6% bei Huh7, 13,7% bei HepG2 und 36,2% bei Hep3B (Abbildung 14a, d und g). Demzufolge kann bei Konzentrationen von 75 μM oder 100 μM DMF ein signifikanter Anstieg des spezifischen Zelltods gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob DMF ebenfalls in HCC-Zellen Apoptose induziert, wurde die Inhibition der Zelltodinduktion durch zVAD nach 48 h (Abbildung 14b, e und h) und 72 h (Abbildung 14c, f und i) untersucht. Durch eine Ko-Behandlung mit zVAD konnte der DMF-induzierte Zelltod reduziert werden. Die Rate der Zelltodreduktion war dabei abhängig von der untersuchten Zelllinie. Die stärksten Effekte in Bezug auf die Zelltodinhibition konnten in Hep3B nach 72 h gemessen werden (Abbildung 14i). Somit ist DMF in der Lage spezifischen Zelltod in HCC-Zelllinien konzentrationsabhängig zu induzieren.

3.6 BH3-Mimetika induzieren Zelltod in Huh7

DMF induziert erst bei höheren Dosen ($> 50 \mu\text{M}$ DMF) signifikant Zelltod in HCC-Zelllinien. Um die Dosis zu reduzieren, wurde DMF mit anderen Wirkstoffen kombiniert. Dazu wurden zwei BH3-Mimetika ausgewählt. Der selektive Bcl-2 Inhibitor ABT-199 und der Mcl-1 Inhibitor MIK665. BH3-Mimetika inhibieren anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie. Um die optimale Wirkstoffkonzentration zu ermitteln, wurde zunächst die halb-maximale Inhibitorkonzentration (IC_{50}) der einzelnen Wirkstoffe bestimmt. Die IC_{50} beschreibt die Dosis, die erforderlich ist, um Zelltod bei 50% der behandelten Zellen auszulösen. Die IC_{50} wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden beide Wirkstoffe aufsteigend titriert und anschließend der spezifische Zelltod berechnet. Die IC_{50} von ABT-199 lag bei 62,2 μM nach 24 h und bei 51 μM nach 48 h (Abbildung 15a und b). Die IC_{50} von MIK665 lag bei 23,6 μM nach 24 h und bei 21,6 μM nach 48 h (Abbildung 15c und d) [108]. So wird auch bei den gewählten BH3-Mimetika erst bei höheren Wirkstoffdosen Zelltod induziert. Um die Konzentrationen der Wirkstoffe zu reduzieren, wurden die beiden BH3-Mimetika miteinander kombiniert. Die aus diesem Experiment gewonnenen Daten wurden auch zur Erstellung einer Publikation verwendet [108].

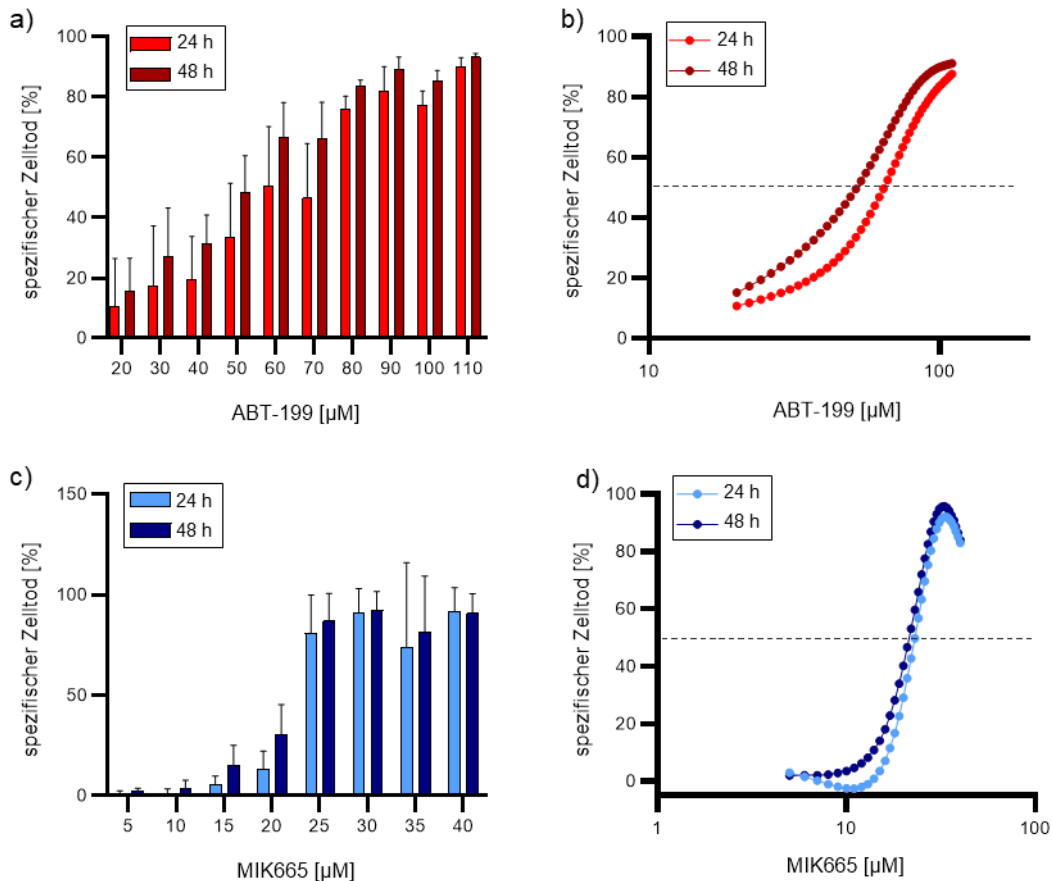


Abbildung 15: Bestimmung der IC₅₀ in Huh7 nach ABT-199 oder MIK665-Behandlung. Der spezifische Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie in Huh7-Zellen analysiert (a) Die Huh7-Zellen wurden mit den angegebenen ABT-199-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (b) Interpolation des spezifischen Zelltods nach 24 h und 48 h Behandlung mit aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen. (c) Die Huh7-Zellen wurden mit den angegebenen MIK665-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (d) Interpolation des spezifischen Zelltods nach 24 h und 48 h Behandlung mit aufsteigenden MIK665-Konzentrationen. Die dargestellten sigmoidalen Dosis(log)-Wirkungs-Kurven wurden zur Anfertigung einer Publikation verwendet [108].

3.7 Kombination von BH3-Mimetika induziert die Cytochrom c Freisetzung

BH3-Mimetika inhibieren anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie. Die Inhibition anti-apoptotischer BCL-2 Proteine führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol, der initiale Schritt zur Einleitung der intrinsischen Apoptose [51]. Jedoch kann der Verlust eines anti-apoptotischen BCL-2-Proteins durch andere Proteine ersetzt werden. So können Tumorzellen der Apoptose entgehen, indem sie andere Mitglieder der BCL-2 Familie hochregulieren [82]. Um die Wirksamkeit einer Einzelbehandlung mit ABT-199 oder MIK665 gegenüber einer Kombinationsbehandlung zu evaluieren, wurden Huh7-Zellen mit aufsteigenden ABT-199 (bis zu 5 µM) und MIK665 (bis zu 6 µM) Konzentrationen, einzeln oder

simultan, für 4 h behandelt. Die Serumkonzentration von ABT-199 variiert dabei je nach Patienten zwischen 0,25 μM und 10 μM [109]. Für MIK665 wurden bis jetzt keine Daten zu den gemessenen Serumkonzentrationen veröffentlicht. Die Cytochrom c Freisetzung wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die *Translocase of outer mitochondrial membrane 20* (TOMM20), ein Transporter der äußeren mitochondrialen Membran, diente als Marker für das Mitochondrium (Abbildung 16a und b). Als Positivkontrolle für eine Cytochrom c Freisetzung wurde der mitochondriale Entkoppler Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) verwendet (Abbildung 16d). Die Behandlung mit DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 16c). Durch Monobehandlung mit ABT-199 oder MIK665, in den gewählten Konzentrationen, konnte keine Cytochrom c Freisetzung in Huh7 ausgelöst werden (Abbildung 16e, f und i, j). Dies ist konsistent mit der vorher bestimmten hohen IC_{50} (Abbildung 15a – d). So war eine Konzentration von 5 μM ABT-199 oder eine Konzentration von 6 μM MIK665 nicht in der Lage eine Cytochrom c Freisetzung zu initiieren (Abbildung 16f und j). Dies spricht für einen Kompensationsmechanismus, der die Inhibition eines anti-apoptotischen Proteins ausgleicht. Die Kombination mit geringen Wirkstoffkonzentrationen wie 1 μM ABT-199 und 1 μM MIK665 sowie die Kombination von 1 μM ABT-199 und 6 μM MIK665 führte ebenfalls nicht zur Cytochrom c Freisetzung (Abbildung 16g und h). Hervorzuheben ist, dass erst bei einer Kombination von 5 μM ABT-199 und 1 μM MIK665 sowie 5 μM ABT-199 und 6 μM MIK665 Cytochrom c freigesetzt wird (Abbildung 16k und l). Diese Wirkstoffkombination induziert somit MOMP. Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition zweier Mitglieder der BCL-2-Familie von Huh7-Zellen, bei entsprechender Wirkstoffkonzentration, nicht kompensiert werden kann.

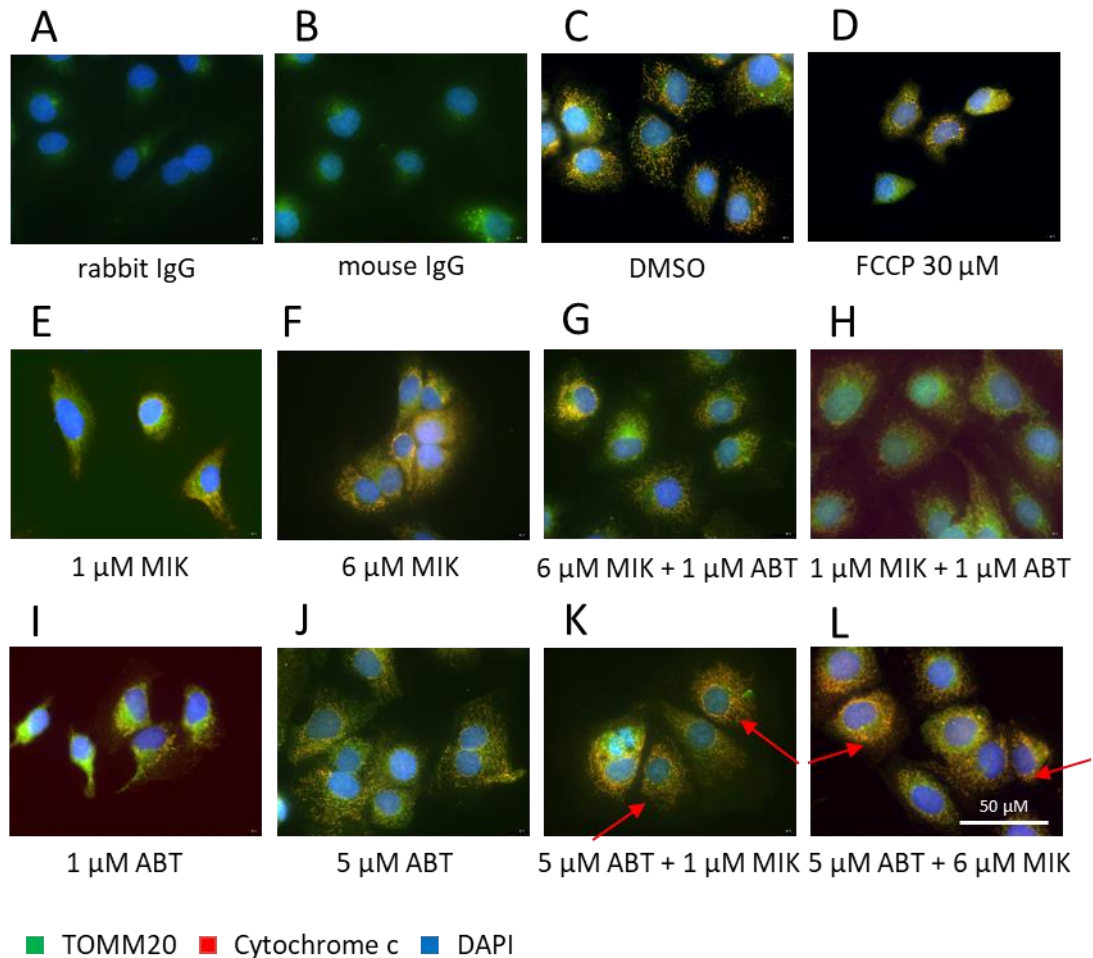


Abbildung 16: Kombination von ABT-199 und MIK665 induziert eine Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium. Immunfluoreszenz von TOMM20 und Cytochrom c. TOMM20 ist mit Alexa Fluor 488 Antikörpern (grün) und Cytochrom c mit Alexa Fluor 594 Antikörpern (rot) markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Gelb: Cytochrom c kolokalisiert mit dem Mitochondrium, rot/orange: Cytochrom c Freisetzung (a, b) Korrespondierende Isotyp Kontrolle (c) DMSO-Behandlung als Negativkontrolle. (d) Positivkontrolle: Zellen wurden 3 h mit 30 µM FCCP behandelt, um MOMP zu induzieren. (e-l) Immunfluoreszenz von TOMM20 und Cytochrom c in Huh7-Zellen. Die Zellen wurden mit ABT-199 und/oder MIK665 in den angegebenen Konzentrationen für 4 h behandelt (n = 3).

3.8 Die Kombination von ABT-199 und MIK665 induziert die Caspase-Kaskade

Die Freisetzung von Cytochrom c führt über das Apoptosom zur proteolytischen Spaltung der Initiatorcaspase 9 und somit zur ihrer Aktivierung (Abbildung 17a) [51,110]. Tumorzellen verfügen jedoch häufig über Mechanismen, um eine Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivierung zu unterdrücken, wie z.B. durch die *Inhibitors of Apoptosis* (IAP1, IAP2 und XIAP). Diese können effektiv eine Caspase-Aktivierung inhibieren [111]. Deshalb wurde sowohl die Spaltung als auch die Aktivität der Initiatorcaspase 9 und der von ihr induzierten Effektorcaspase 3 untersucht. Diese beiden Caspasen sind wichtige Bestandteile der Caspase-

Kaskade und initiieren die intrinsische Apoptose [51,112]. Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Monobehandlung mit den Inhibitoren zu keiner Spaltung von Caspase 9 in Huh7-Zellen führt (Abbildung 17b). Da die Monobehandlung mit den einzelnen Inhibitoren keine Auswirkungen auf die Freisetzung von Cytochrom c hatte, entspricht dies den Erwartungen.

Erst die Kombination aus 5 μ M ABT-199 und 1 μ M MIK665 sowie die Kombination aus 5 μ M ABT-199 und 6 μ M MIK665 führten zur Spaltung von Caspase 9 nach 4 h Behandlungszeit (Abbildung 17b). Zusätzlich zur Caspase-Spaltung führte die Kombinationsbehandlung zu einer erhöhten Caspase 9 Aktivität in Huh7-Zellen, die durch einen lumineszenz-basierten Assay nach 4 h Behandlung gemessen wurde (Abbildung 17c und d). Die Behandlung der Huh7-Zellen mit einer festen MIK665-Konzentration (6 μ M) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen resultierte in einer Steigerung der Aktivität um bis zu 26,7% nach 4 h Behandlungszeit im Vergleich zur Monobehandlung mit 6 μ M MIK665 (Abbildung 17c). Bei Kombination von 5 μ M ABT-199 und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen konnte eine Steigerung der Caspase 9 Aktivität von 37,7% im Vergleich zur Monobehandlung mit 5 μ M ABT-199 erreicht werden (Abbildung 17d). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Caspase-Aktivität durch zVAD blockiert werden kann (Abbildung 17c und d). Bei Behandlung mit 5 μ M ABT-199 und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen reduzierte sich die spezifische Caspase-Aktivität bereits nach 6 h wieder (Abbildung 17f). Dahingegen blieb die spezifische Caspase-Aktivität bei Behandlung mit 6 μ M MIK665 und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen 4 h – 8 h konstant (Abbildung 17e). Somit habe ich zeigen können, dass nur die parallele Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 eine effektive Aktivierung der Caspase 9 in Huh7-Zellen induziert. Die dargestellten Ergebnisse wurden auch für die Erstellung einer Publikation verwendet [108].

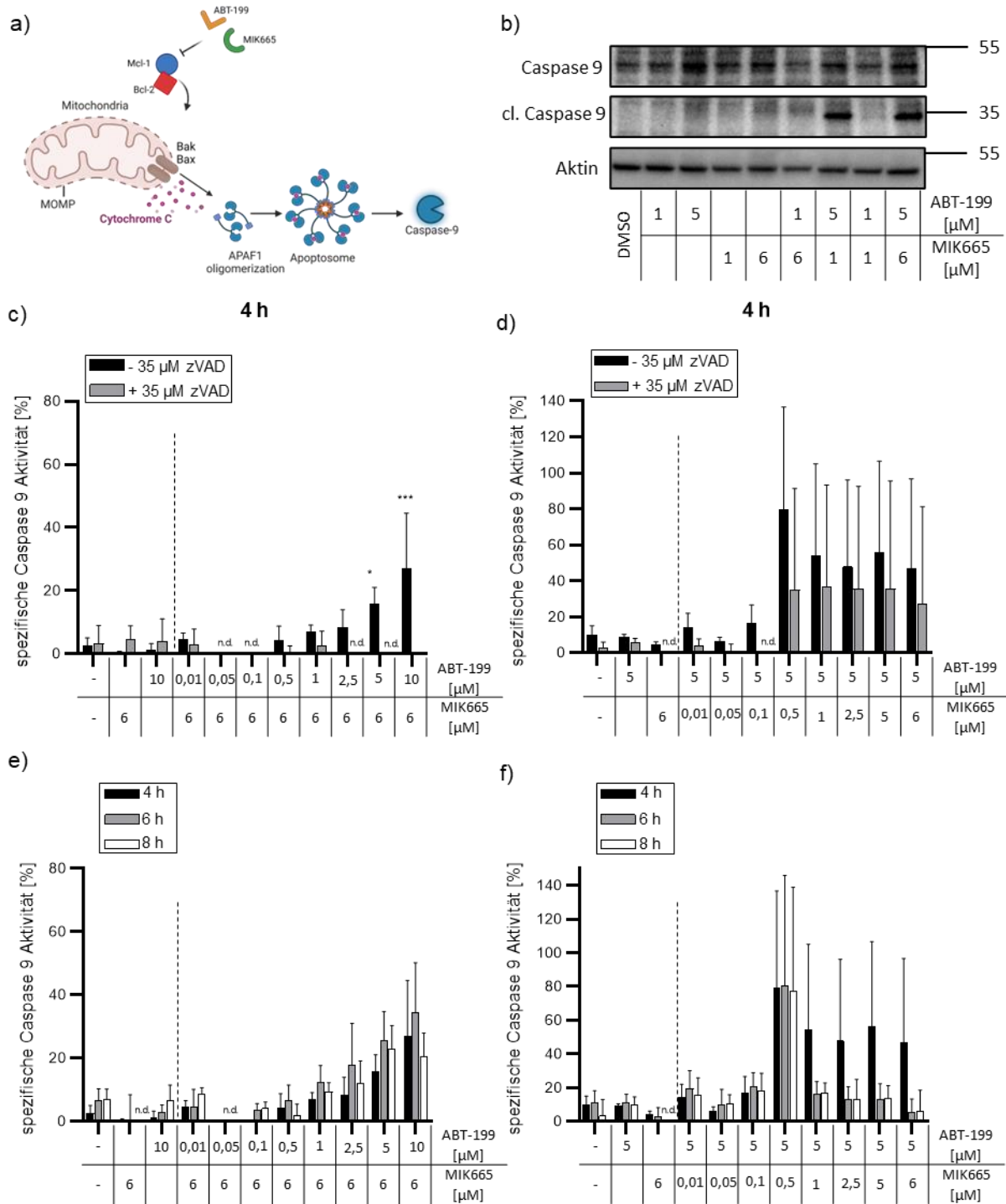


Abbildung 17: Kombination der BH3-Mimetika ABT-199 und MIK665 führt zur Caspase 9 Spaltung. (a) Schematische Darstellung der Einleitung der intrinsischen Apoptose durch BH3-Mimetika. Die Mitglieder der BCL-2 Familie regulieren die Einleitung der intrinsischen Apoptose. Der Einsatz von BH3-Mimetika führt zum Cytochrom c Ausstrom und zur Caspase 9 Spaltung/Aktivität. (b) Western Blot Analyse von (gespaltener) Caspase 9. Die Zellen wurden mit ABT-199 und/oder MIK665 in den angegebenen Konzentrationen für 4 h behandelt. DMSO diente als Kontrolle. (c, d) Aktivitätsassay von Caspase 9 \pm 35 μ M zVAD Ko-Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 4 h behandelt. Für eine Ko-Behandlung mit zVAD wurden die Zellen vor der Behandlung mit den BH3-Mimetika für 20 min mit 35 μ M zVAD vorbehandelt. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 9 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (n = 3). Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. Nach Behandlung für 4 h wurde die Caspase-Aktivität mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

(e, f) Aktivitätsassay von Caspase 9 nach bis zu 8 h Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 9 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (n = 3). Nach Behandlung wurde die Caspase-Aktivität mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. Aus Gründen der visuellen Klarheit und Lesbarkeit sind die p Werte der Diagramme E und F in der folgenden Tabelle 4 dargestellt. Die dargestellte Spaltung der Caspase 9 sowie die Aktivitätssteigerung nach 4 h und 6 h wurden zur Anfertigung einer Publikation verwendet. Ebenfalls wurde die Inhibition der Caspase-Aktivität durch zVAD Ko-Behandlung verwendet. [108].

Tabelle 4: p-Werte des Caspase 9 Aktivitätsassays nach Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665 für 4 h – 8 h. Die Signifikanzen wurden mittels *One Way Anova* berechnet.

Kombinationsvergleich	Behandlungsdauer	p-Wert
6 µM MIK665 vs. 5 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	4 h	0,0389
6 µM MIK665 vs. 10 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	4 h	0,0002
6 µM MIK665 vs. 5 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	6 h	0,0051
6 µM MIK665 vs. 10 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	6 h	0,0002
5 µM ABT-199 vs. 0,5 µM MIK665 + 5 µM ABT-199	6 h	0,0044
6 µM MIK665 vs. 5 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	8 h	0,0003
6 µM MIK665 vs. 10 µM ABT-199 + 6 µM MIK665	8 h	0,0008
5 µM ABT-199 vs. 0,5 µM MIK665 + 5 µM ABT-199	8 h	0,0049

Die aktive Caspase 9 kann die Caspase-Kaskade einleiten und die Effektorcaspase 3 aktivieren (Abbildung 18a) [51,112]. Dies wurde wieder mittels Western Blot und einem lumineszenz-basierten Aktivitätsassay bestimmt. Wie erwartet, resultierte die alleinige Behandlung mit 5 µM ABT-199 oder 6 µM MIK665 weder in Spaltung der Caspase 3 noch in einer signifikanten Aktivitätssteigerung (Abbildung 18b – d). Eine Kombination von 5 µM ABT-199 und 1 µM MIK665 sowie 5 µM ABT-199 und 6 µM MIK665 führte zur Spaltung der Caspase 3 nach 4 h Behandlungszeit (Abbildung 18c und d). Weiterhin konnte ebenfalls eine Steigerung der Caspase 3/7 Aktivität um bis zu 620,1% bei Kombination von 6 µM MIK665 mit aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen gezeigt werden (Abbildung 18c). Eine Kombination von 5 µM ABT-199 und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen steigerte die spezifische Caspase 3/7 Aktivität um bis zu 256,0% nach 4 h Behandlungszeit (Abbildung 18d). Diese Ergebnisse wurden auch in *Michalski et al.* publiziert [108].

Durch eine Ko-Behandlung mit zVAD konnte auch hier die Caspase Aktivität blockiert werden (Abbildung 18c und d). Die Caspase 3/7 Aktivität steigerte sich über einen Zeitraum von 8 h,

sowohl bei Behandlung mit konstanter MIK665 (6 μM) als auch mit konstanter ABT-199 (5 μM) Konzentration (Abbildung 18e und f) [108].

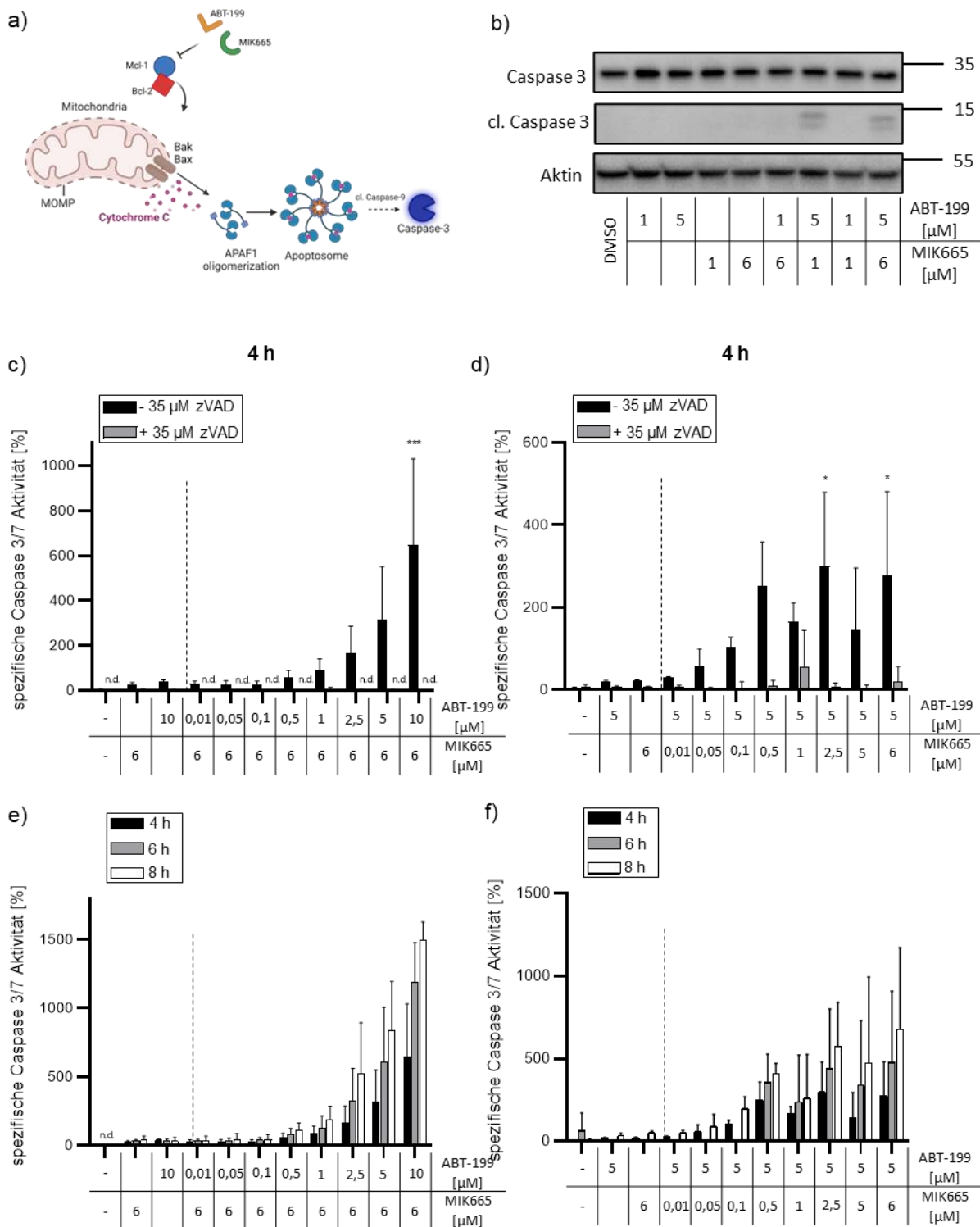


Abbildung 18: Kombination der BH3-Mimetika ABT-199 und MIK665 führt zur Caspase 3 Spaltung. (a) Schematische Darstellung der Einleitung der intrinsischen Apoptose durch BH3-Mimetika. Die Mitglieder der BCL-2 Familie regulieren die Einleitung der intrinsischen Apoptose. Der Einsatz von BH3-Mimetika führt zum Cytochrom c Ausstrom, zur Caspase 9 Aktivität und folgend zur Spaltung/Aktivität von Caspase 3. (b) Western Blot Analyse von (gespaltener) Caspase 3. Die Zellen wurden mit ABT-199 und/oder MIK665 in den angegebenen Konzentrationen für 4 h behandelt. DMSO

diente als Kontrolle. (c, d) Aktivitätsassay von Caspase 3/7 \pm 35 μ M zVAD Ko-Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 4 h behandelt. Für eine Ko-Behandlung mit zVAD wurden die Zellen vor der Behandlung mit den BH3-Mimetika für 20 min mit 35 μ M zVAD vorbehandelt. Nach Behandlung für 4 h wurde die Caspase-Aktivität mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (n = 3). Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert. Die dargestellte Spaltung der Caspase 3 sowie die Aktivitätssteigerung ohne Ko-Behandlung mit zVAD wurden zur Anfertigung einer Publikation verwendet [108]. (e, f) Aktivitätsassay von Caspase 3/7 nach bis zu 8 h Behandlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 4 h – 8 h behandelt. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (n = 3). Nach Behandlung für bis zu 8 h wurde die Caspase-Aktivität mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. Aus Gründen der visuellen Klarheit und Lesbarkeit sind die p-Werte der Diagramme E und F in der folgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: p-Werte des Caspase 3/7 Aktivitätsassays nach Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665 für 4 h – 8 h. Die Signifikanzen wurden mittels *One Way Anova* berechnet.

Kombinationsvergleich	Behandlungsdauer	p-Wert
6 μ M MIK665 vs. 10 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	4 h	0,0002
5 μ M ABT-199 vs. 2,5 μ M MIK665 + 5 μ M ABT-199	4 h	0,0191
5 μ M ABT-199 vs. 6 μ M MIK665 + 5 μ M ABT-199	4 h	0,0352
6 μ M MIK665 vs. 5 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	6 h	0,0027
6 μ M MIK665 vs. 10 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	6 h	<0,0001
6 μ M MIK665 vs. 2,5 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	8 h	0,0118
6 μ M MIK665 vs. 5 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	8 h	<0,0001
6 μ M MIK665 vs. 10 μ M ABT-199 + 6 μ M MIK665	8 h	<0,0001

Um die Möglichkeit einer kombinierten Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Apoptose zu untersuchen, wurde auch die Aktivität der Caspase 8 analysiert. Es konnte jedoch keine signifikante Beteiligung der extrinsischen Apoptose nach Behandlung mit BH3-Mimetika festgestellt werden (Abbildung 19a und b). Diese Ergebnisse wurden auch in *Michalski et al.* publiziert [108].

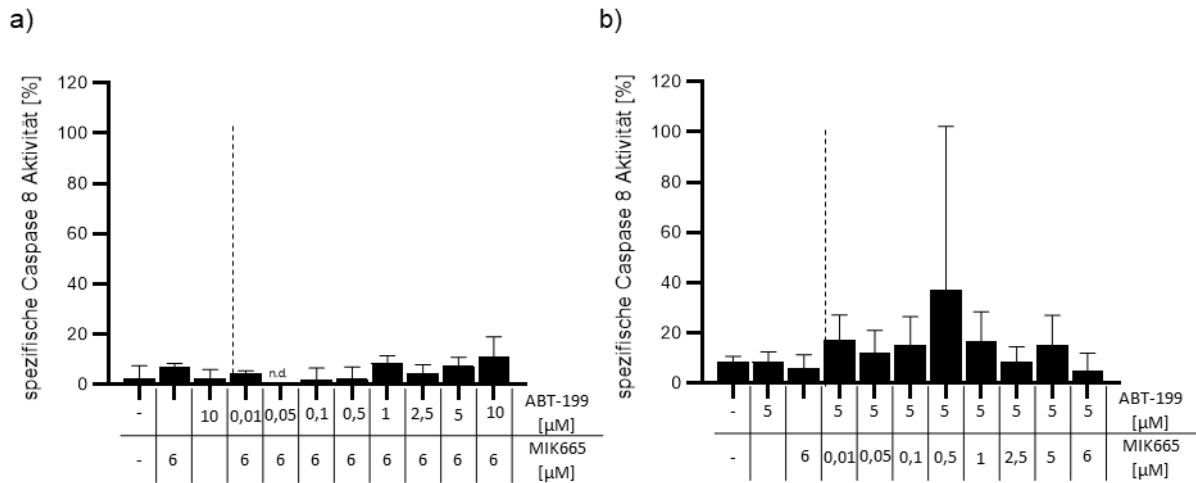


Abbildung 19: Keine Kombination der intrinsischen und extrinsischen Apoptose. Die Zellen wurden mit den angegebenen ABT-199 und/oder MIK665-Konzentrationen für 4 h behandelt. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 8 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. Die gestrichelte Linie trennt die Monotherapie von der BH3-Kombinationsbehandlung. (**a**, **b**) Aktivitätsassay von Caspase 8. (n = 3). Die dargestellte Caspase 8 Aktivitätsmessung wurde auch in *Michalski et al.* publiziert [108].

Die Aktivierung der Effektorcaspase 3 führt zur Spaltung von essentiellen Proteinen, den so genannten Todessubstraten, wie Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP) (Abbildung 20a) [113,114]. Die kombinierte Behandlung der beiden BH3-Mimetika induzierte eine PARP-Spaltung nach 4 h Behandlungszeit. Bei Applikation von jeweils nur einem der beiden Inhibitoren konnte keine PARP-Spaltung gezeigt werden (Abbildung 20b). Die gezeigte PARP-Spaltung ist dabei konsistent zu unseren bisherigen Ergebnissen und wurde ebenfalls in *Michalski et al.* veröffentlicht.

Zusammengefasst zeigen die Experimente eine Induktion der intrinsischen Apoptose in Huh7-Zellen nach einer Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665. Nur die simultane Inhibition von zwei Proteinen (Bcl-2 und Mcl-1) der BCL-2 Familie kann die Caspase-Kaskade in Huh7 induzieren [108].

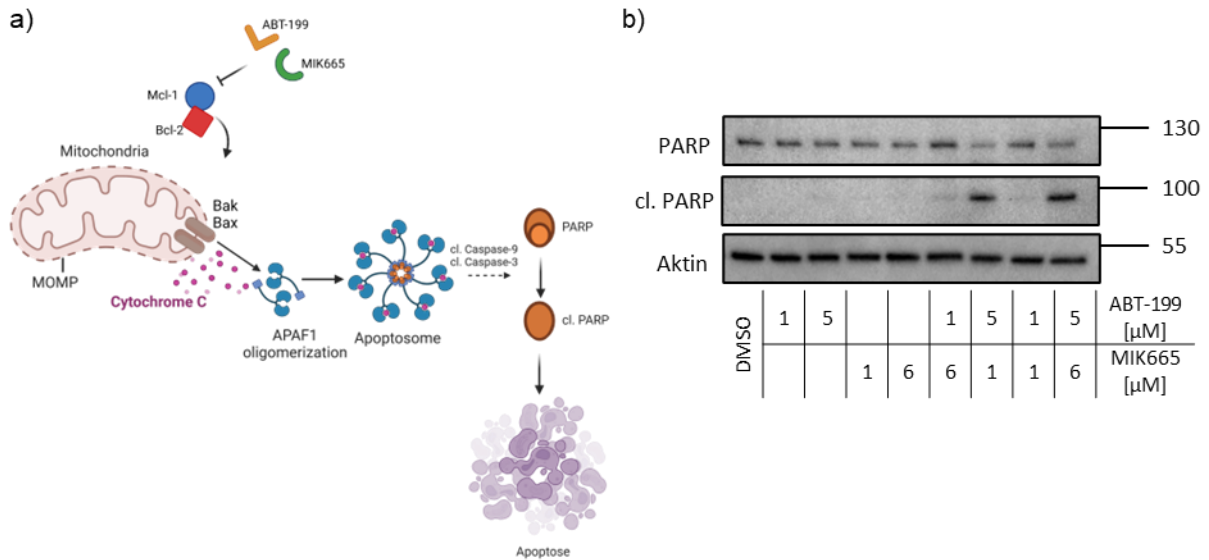


Abbildung 20: Die Kombination von ABT-199 und MIK665 führt zur PARP-Spaltung. (a) Schematische Darstellung der Einleitung der intrinsischen Apoptose durch BH3-Mimetika. Die Mitglieder der BCL-2 Familie regulieren die Einleitung der intrinsischen Apoptose. Der Einsatz von BH3-Mimetika führt zum Cytochrom c Ausstrom, zur Caspase 9 Aktivität, zur Aktivität von Caspase 3 und letztendlich zur Spaltung von PARP (b) Western Blot Analyse von (gespaltenem) PARP. Die dargestellte Spaltung von PARP wurde zur Anfertigung einer Publikation verwendet [108].

Um die Wirkung der BH3-Mimetika auf den Metabolismus in Huh7 zu untersuchen wurde der relative ATP-Gehalt nach der Behandlung mittels lumineszenz-basierter Assays bestimmt. Dazu wurden die Huh7-Zellen bis zu 48 h mit 5 μM ABT-199 und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen oder mit 6 μM MIK665 und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen behandelt. Durch Kombination der beiden BH3-Mimetika wurde der ATP-Gehalt reduziert (Abbildung 21a und b). Die Reduktion der ATP-Menge steht dabei im linearen Zusammenhang mit der Wirkstoffkonzentration. So führt eine Kombination von 6 μM MIK665 und 10 μM ABT-199 zu einer Reduktion um bis zu 53,2% (Abbildung 21a). Werden 5 μM ABT-199 und 6 μM MIK665 miteinander kombiniert wird eine Reduktion des ATP-Gehalts um bis zu 27,3% erreicht (Abbildung 21b). Wie eine Behandlung mit DMF führt eine Behandlung mit einer BH3-Mimetika Kombination zur Reduktion des relativen ATP-Gehalts und somit ebenfalls zu einer Energie-Depletion.

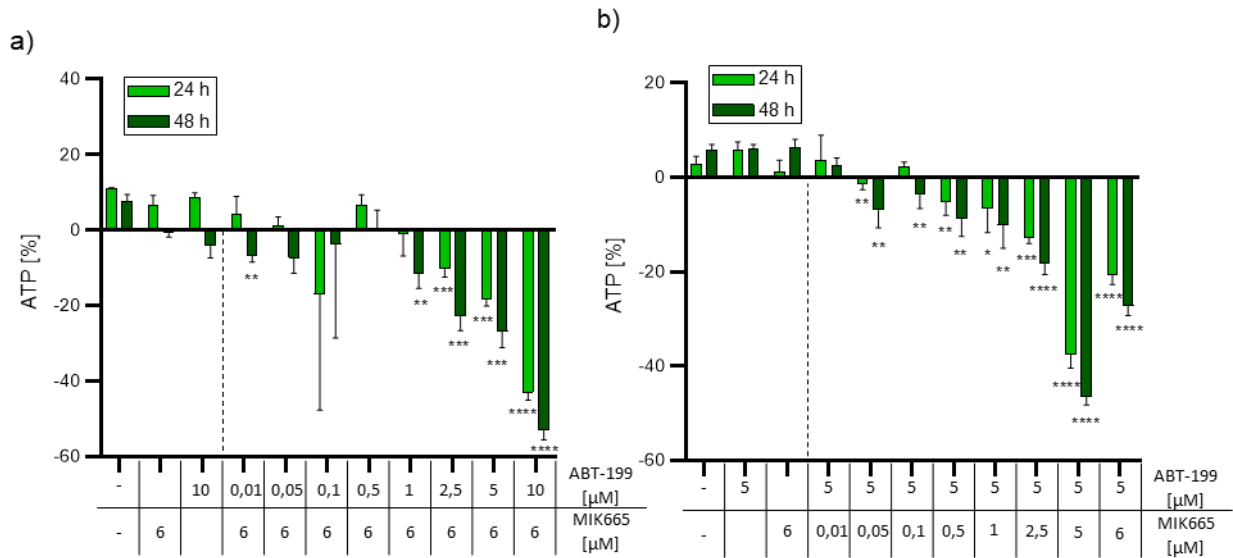


Abbildung 21: Die Behandlung von Huh7 mit BH3-Mimetika reduziert den relativen ATP-Gehalt. Der ATP-Gehalt wurde mittels eines lumineszenz-basierten Assays quantifiziert. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl vitaler Zellen, ATP-produzierender Zellen und dem Lumineszenzsignal. Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. Die Daten zeigen den relativen ATP-Gehalt im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. **(a)** ATP-Gehalt von Huh7 nach Behandlung mit einer gleichbleibenden Konzentration von MIK665 (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen für bis zu 48 h. **(b)** ATP-Gehalt von Huh7 nach Behandlung mit einer gleichbleibenden Konzentration von ABT-199 (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen für bis zu 48 h. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001 verglichen mit der Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert.

3.9 Die Kombination von ABT-199 und MIK665 induziert signifikant Zelltod in Huh7-Zellen

Da die Kombinationsbehandlung von ABT-199 und MIK665 die Caspase-Kaskade auslöst und den relativen ATP-Gehalt reduziert, kann davon ausgegangen werden, dass diese Kombination erfolgreich Apoptose in Huh7-Zellen induziert. Deshalb wurde die Zelltodinduktion durch die Kombinationsbehandlung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Huh7-Zellen wurden entweder mit einer konstanten ABT-199-Konzentration (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen oder umgekehrt mit konstanter MIK665-Konzentration (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen behandelt. Wie aus unseren früheren Ergebnissen hervorgeht, führte die Monobehandlung mit 5 μM ABT-199 oder 6 μM MIK665 nur zu einer geringen Zelltodinduktion. Der spezifische Zelltod einer 5 μM ABT-199-Behandlung lag bei 0% nach 24 h und 48 h und bei 9,1% nach 24 h und 5,93% nach 48 h nach einer 6 μM MIK665-Behandlung (Abbildung 22a und b). In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen führte die Kombination beider BH3-Mimetika in Huh7 zu einem signifikant gesteigerten, dosisabhängigen Zelltod. Mit einer Kombination von 6 μM MIK665 und 10 μM ABT-199 konnte

die Zelltodinduktion um 44,1% nach 24 h und um 38,7% nach 48 h gesteigert werden (Abbildung 22a). Die kombinierte Behandlung von 5 μM ABT-199 und 6 μM MIK665 führte zu einer gesteigerten Zelltodinduktion von 30,5% nach 24 h und 20,6% nach 48 h (Abbildung 22b).

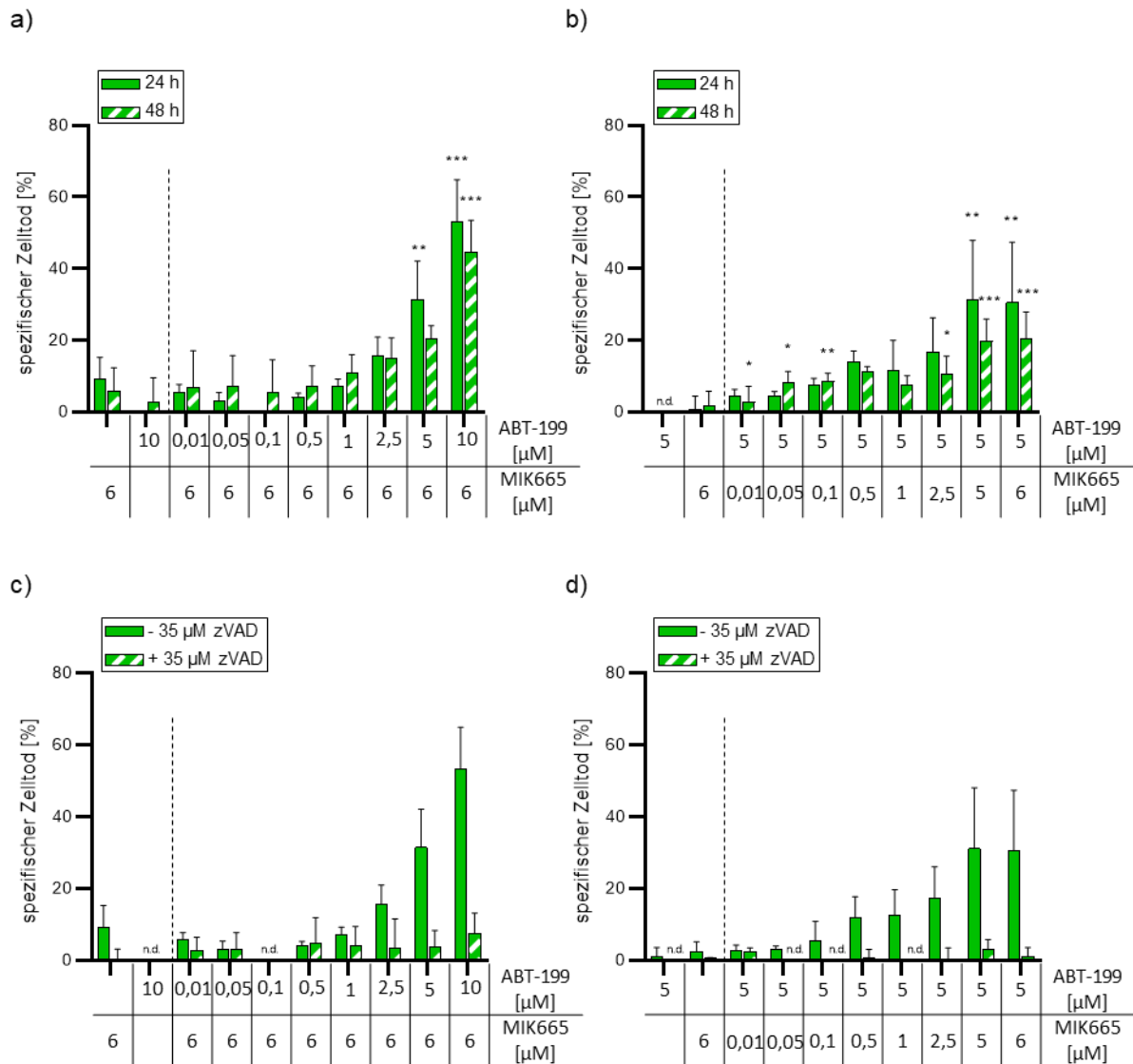


Abbildung 22: Die Behandlung mit einer Kombination aus ABT-199 und MIK665 induziert Zelltod in Huh7. Der spezifische Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie in Huh7-Zellen analysiert. Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. (a) Die Zellen wurden mit einer gleichbleibenden Konzentration von MIK665 (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3). DMSO diente als Kontrolle. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der 6 μM MIK665 Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert. (b) Die Zellen wurden mit einer gleichbleibenden Konzentration von ABT-199 (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001 verglichen mit der 5 μM ABT-199 Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert. (c) Für eine Ko-Behandlung mit zVAD wurden die Zellen vor der Behandlung mit den BH3-Mimetika für 20 min mit 35 μM zVAD vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer gleichbleibenden Konzentration von MIK665 (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen für 24 h behandelt. (n = 3) (d) Für eine Ko-Behandlung mit zVAD wurden die Zellen vor der Behandlung mit den BH3-Mimetika für 20 min mit 35 μM zVAD vorbehandelt.

Anschließend wurden die Zellen mit einer gleichbleibenden Konzentration von ABT-199 (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen für 24 h behandelt. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. Die dargestellte zVAD Ko-Behandlung wurde auch zur Anfertigung einer Publikation verwendet [108].

Weiterhin wurde die Inhibition der Zelltodinduktion durch zVAD untersucht. Die Inhibition der Caspasen 9 und 3/7 durch zVAD konnte bereits in einem Caspase-Aktivitätsassay gezeigt werden (Abbildung 17 und Abbildung 18). Durch die Ko-Behandlung mit zVAD konnte der durch BH3-Mimetika induzierte Zelltod deutlich reduziert werden (Abbildung 22c und d). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur eine Kombination von ABT-199 und MIK665 die intrinsische Apoptose und somit den Zelltod bei niedrigen ABT-199 und MIK665-Konzentrationen induziert. Dies bestätigten ebenfalls unsere Ergebnisse zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Induktion der Caspasen-Kaskade durch ABT-199/MIK665-Kombination. Diese Daten wurden auch zur Anfertigung einer Publikation verwendet [108].

3.10 ABT-199 und MIK665 wirken synergistisch in Huh7-Zellen

Aufgrund der deutlichen Wirkung der Kombination der beiden BH3-Mimetika, wurde untersucht, ob diese Effekte additiv oder synergistisch sind. Daher wurde die mittlere IC_{50} für ABT-199 und MIK665 in Kombination in Huh7 nach 24 h und 48 h analysiert. Für die Kombinationsbehandlungen wurden wie in den vorangegangenen Experimenten die gleichen Konzentrationen ABT-199 (5 μM) und MIK665 (6 μM) zusammen mit aufsteigenden Konzentrationen des jeweils anderen Wirkstoffs verwendet (Abbildung 23a und c). Zur Berechnung wurden die gemessenen Werte logarithmisch interpoliert (Abbildung 23b und d).

Die IC_{50} für MIK665 lag bei 23,6 μM nach 24 h und bei 21,6 μM nach 48 h (Abbildung 24b). Für ABT-199 lag die IC_{50} bei 65,3 μM nach 24 h und 50,9 μM nach 48 h (Abbildung 24a). Die Kombination der beiden Wirkstoffe reduzierte die IC_{50} deutlich. Die IC_{50} von ABT-199 wurde durch die Kombination mit 6 μM MIK665 in Huh7 um bis zu 89,5% reduziert (Abbildung 24a). Bei Kombination mit 5 μM ABT-199 wurde die IC_{50} von MIK665 um bis zu 28,4% herabgesetzt (Abbildung 24b) [108]. Mit Hilfe der Software CompuSyn (Version 1) wurde der Kombinationsindex (CI) nach *Chou et al.* berechnet [99]. Dieser dimensionslose Wert beschreibt eine synergistische ($\text{CI} < 1$), additive ($\text{CI} = 1$) oder antagonistische ($\text{CI} > 1$) Wirkung einer Kombination von Wirkstoffen im Vergleich zu Wirkung einer der beiden Wirkstoffe

allein. Die Analysen zeigen, dass beide Wirkstoffkombinationen zu synergistischen Effekten in Huh7 führen (Abbildung 24c und d). Diese Ergebnisse wurden in *Michalski et al.* publiziert [108].

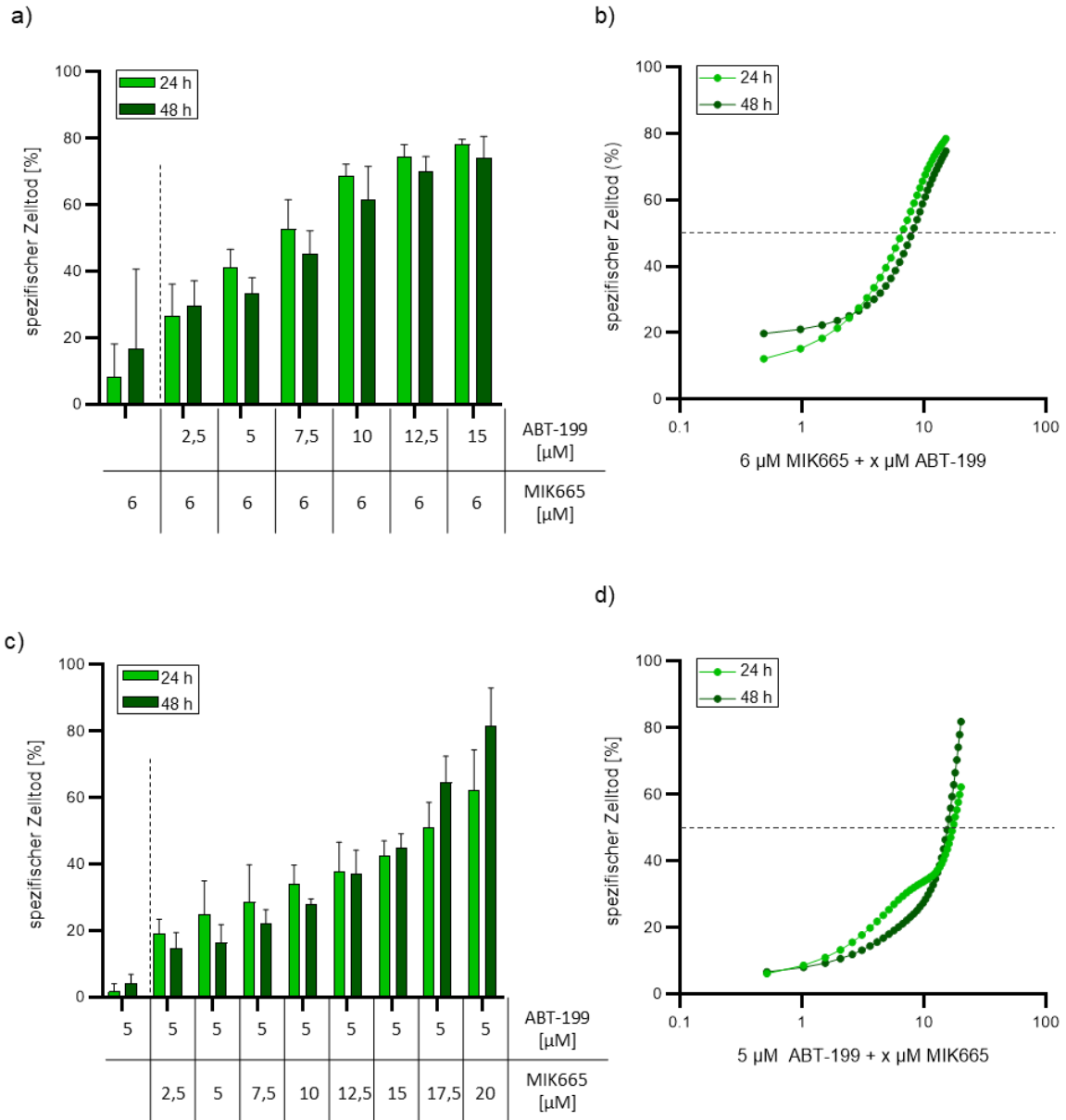


Abbildung 23: Eine BH3-Mimetika Kombination reduziert die IC₅₀ im Vergleich zur Monobehandlung. (a) Die Huh7-Zellen wurden mit einer gleichbleibenden MIK665-Konzentration (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3). DMSO diente als Kontrolle. Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (b) Interpolation des spezifischen Zelltods nach 24 h und 48 h Behandlung mit einer gleichbleibenden MIK665-Konzentration (6 μM) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen. (c) Die Huh7-Zellen wurden mit einer gleichbleibenden ABT-199-Konzentration (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3). DMSO diente als Kontrolle. Die gestrichelte Linie trennt die Monobehandlung von der BH3-Kombinationsbehandlung. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (d) Interpolation des spezifischen Zelltods nach 24 h und 48 h Behandlung mit einer gleichbleibenden ABT-199-

Konzentration (5 μM) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen. Diese Daten wurden in Michalski et al. publiziert [108].

Es kann also schlussgefolgert werden, dass die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 notwendig ist, um effektiv Apoptose in Huh7 Zellen auszulösen. Nur eine kombinierte Inhibition dieser beiden Proteine führt effizient zur Freisetzung von Cytochrom c, zur Induktion der Caspase-Kaskade und schließlich zur Apoptose. Es hat sich gezeigt, dass Kombinationen zweier BH3-Mimetika die Resistenz gegenüber der Zelltodinduktion umgehen können und somit neue therapeutische Optionen zur Behandlung eines HCCs ermöglichen [108].

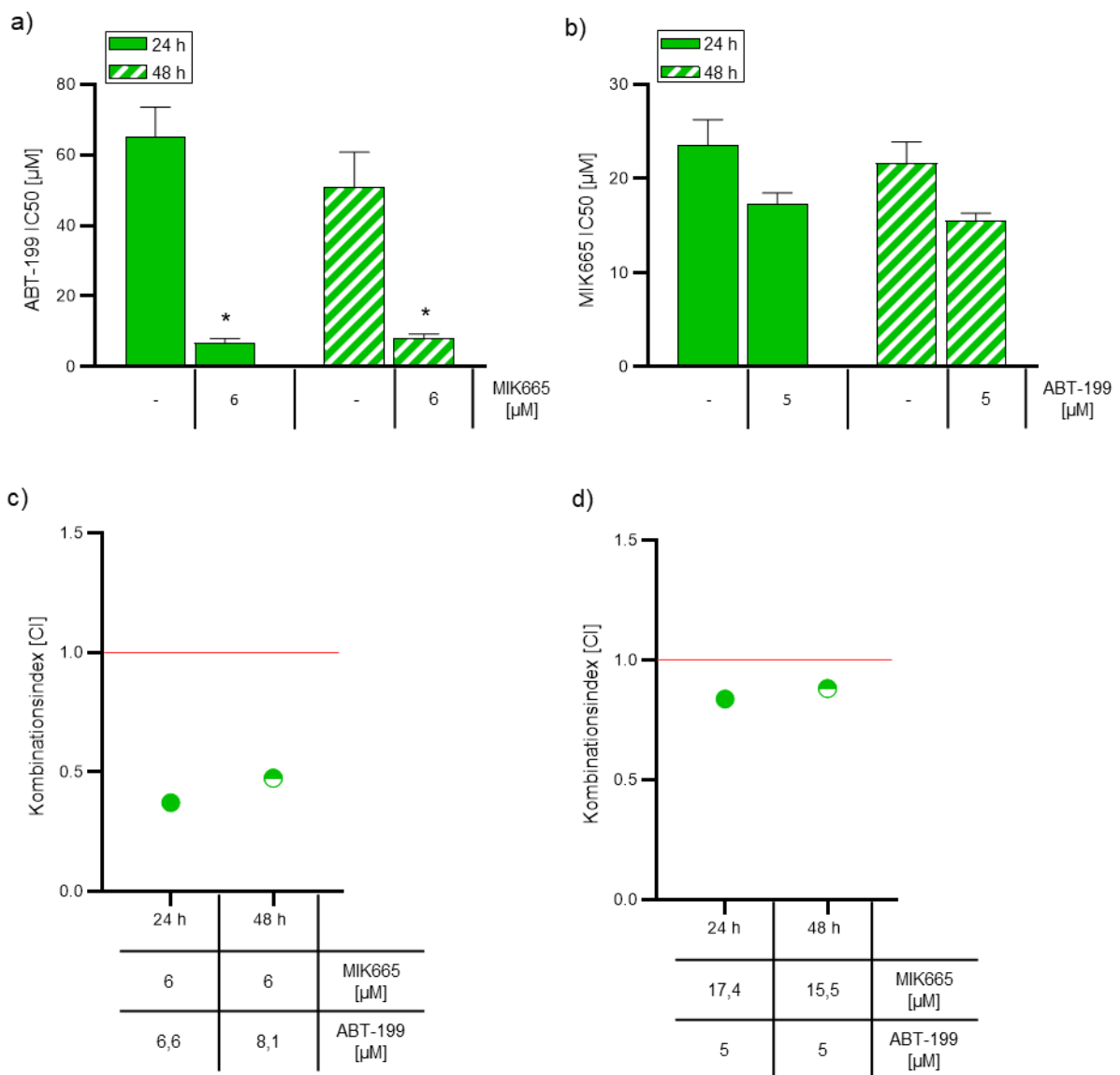


Abbildung 24: Die Kombination von ABT-199 und MIK665 wirkt synergistisch in Huh7. (a, b) Die Graphen zeigen die IC₅₀ der ABT-199 und MIK665 Mono- sowie Kombinationsbehandlung in Huh7. Für

die Monotherapie wurden die Zellen entweder mit aufsteigenden ABT-199 oder MIK665-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. Für die Kombinationstherapie wurden die Zellen entweder mit einer konstanten Konzentration von ABT-199 (5 μ M) und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen oder umgekehrt mit einer konstanten Konzentration von MIK665 (6 μ M) und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3, Mittelwert \pm SD). (*p < 0,05 verglichen mit der Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert. (c, d) Die Graphen zeigen die Dotplots des berechneten Kombinationsindex (CI) der interpolierten IC₅₀ der ABT-199/MIK665-Kombination nach 24 h und 48 h in Huh7. Der CI wurde mittels Compusyn (Version 1) (<http://www.combosyn.com>) berechnet. CI-Werte <1 (rote Linie) weisen auf synergistische Effekte einer Wirkstoffkombination hin. Je kleiner der CI-Wert desto stärker der Synergismus [99]. Diese Daten wurden in *Michalski et al.* veröffentlicht [108].

3.11 Kombination von DMF und BH3-Mimetika inhibiert die Migration in Huh7

Es konnte gezeigt werden, dass eine DMF-Monobehandlung sowie eine BH3-Mimetika Kombination den relativen ATP-Gehalt reduziert. Die Behandlung mit DMF führt ebenfalls zur Inhibition der Migration in HCC-Zelllinien. Dies könnte unter anderem in dem reduzierten ATP-Gehalt begründet sein. Deshalb wurde folgend die Inhibition der Migration nach Behandlung mit einer DMF und BH3-Mimetika Kombination mittels Migrationassay untersucht. Da bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl DMF als auch eine Behandlung mit BH3-Mimetika den Zelltod induzieren, wurden die Zellen vor der Behandlung mit zVAD versetzt. Mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden für bis zu 48 h behandelt und anschließend die Migration mikroskopisch verfolgt.

Die Migration der Huh7-Zellen wurde durch eine Monobehandlung mit ABT-199 oder MIK665 nicht inhibiert (Abbildung 25a und b). Auch eine Kombination der beiden BH3-Mimetika führte zu keiner Migrationsinhibition (Abbildung 25a und b).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 30 μ M DMF die Migration in Huh7 inhibiert. Die Kombination der BH3-Mimetika und DMF führte zu einer deutlichen Reduktion der Migration, sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur DMF-Monobehandlung. Somit kann die DMF-Konzentration mit einer BH3-Mimetika Kombination reduziert werden. Eine Kombination mit 50 μ M DMF, 5 μ M ABT-199 und 6 μ M MIK665 führte zu einem vollständigen Stopp der Migration in Huh7 (Abbildung 25a und b). Eine Kombination aus DMF und ABT-199/MIK665 ist demzufolge in der Lage effektiv die Migration in Huh7 zu inhibieren. Durch die Kombination der Wirkstoffe kann die DMF-Konzentration reduziert werden.

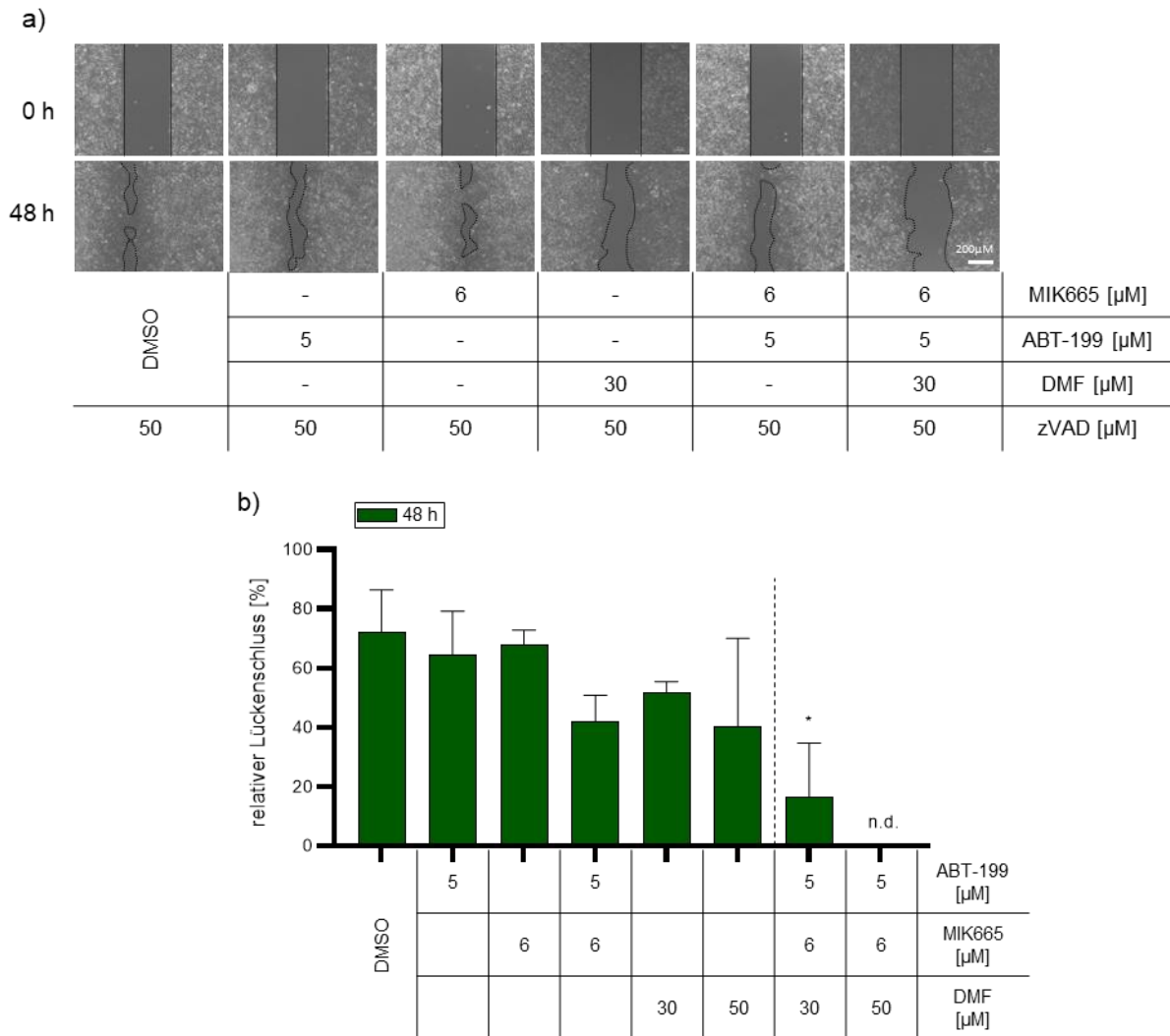


Abbildung 25: Eine Kombination aus BH3-Mimetika und DMF verstärkt die Inhibition der Migration von Huh7. (a) Repräsentative Abbildung eines Migrationsassays von Huh7. (b) Quantifizierung des Lückenschlusses von Huh7 (n = 3). Die gestrichelte Linie trennt die Einzelbehandlung von der Kombinationsbehandlung mit DMF. (*p < 0,05 verglichen mit der DMF-Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert.

3.12 Gesteigerte Zelltodinduktion durch DMF und BH3-Mimetika Kombination

Bei einer Monobehandlung mit DMF werden hohe Dosen benötigt, um Zelltod zu induzieren. Deshalb wurde folgend DMF mit ABT-199 und MIK665 kombiniert. Huh7-Zellen wurden mit 5 µM ABT-199, 6 µM MIK665 und aufsteigenden DMF-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt. Mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurde die Zelltodinduktion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in den bisherigen Ergebnissen konnte nach einer Monobehandlung mit ABT-199 oder MIK665 nur geringe Zelltodraten gemessen werden. Eine Behandlung mit 50 µM DMF führte zu einer Zelltodrate von bis zu 27,5% (Abbildung 26). Bereits eine Kombination von 10 µM DMF sowie 5 µM ABT-199 und

6 μM MIK665 führte zu einer Steigerung des Zelltods um 7,2% im Vergleich zur 50 μM DMF-Monobehandlung nach 24 h. Eine Kombination aus 50 μM DMF, 5 μM ABT-199 und 6 μM MIK665 führte zur einem Zelltodanstieg von bis zu 57,3% im Vergleich zur DMF-Monobehandlung (Abbildung 26). Durch eine Kombination von BH3-Mimetika konnte der durch DMF induzierte Zelltod signifikant gesteigert werden und die benötigte DMF-Konzentration reduziert werden.

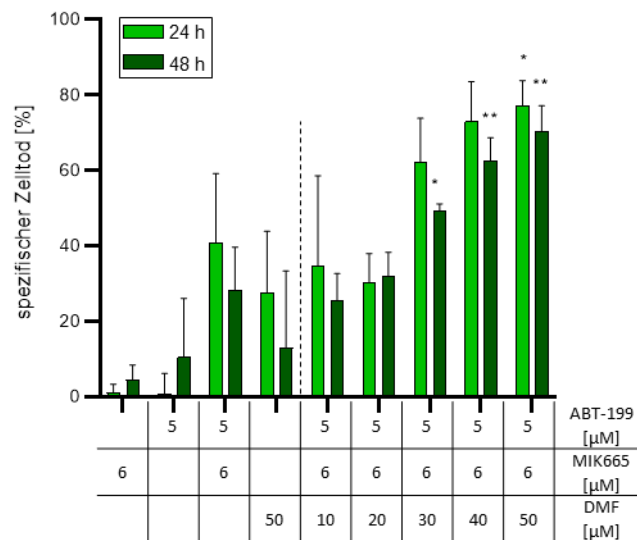


Abbildung 26: Eine Kombination aus BH3-Mimetika und DMF verstärkt die Zelltodinduktion in Huh7. Die Huh7-Zellen wurden mit einer gleichbleibenden MIK665-Konzentration (6 μM) und ABT-199-Konzentration (5 μM) sowie mit aufsteigenden DMF-Konzentrationen für bis zu 48 h behandelt (n = 3). DMSO diente als Kontrolle. Die gestrichelte Linie trennt die Einzelbehandlungen von der Kombinationsbehandlung mit DMF. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (*p < 0,05, **p < 0,01 verglichen mit der DMF-Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels eines student's t-test analysiert.

3.13 DMF in Kombination mit 5-FU induziert verstärkt Zelltod in HCT116

Es konnte gezeigt werden, dass DMF nicht nur den Zelltod induziert, sondern auch die Proliferation und Migration in adhärenen Zellen inhibiert. Migration und Proliferation sind Determinanten für die Bildung von Metastasen [105]. Insbesondere CRC-Erkrankungen sind häufig durch eine unkontrollierte Zellproliferation gekennzeichnet [47]. Daher ist die Rationale meiner Arbeit, DMF mit 5-FU für die Behandlung des CRC zu evaluieren. Ich analysierte, ob die Kombination beider Wirkstoffe zu einer verstärkten Zelltodinduktion führt. Ich untersuchte weiterhin die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und Signalwege.

HCT116 Zellen wurden für bis zu 72 h mit den angegebenen 5-FU oder DMF-Konzentrationen behandelt. Da es sich bei 5-FU um einen bekannten Apoptose-Auslöser handelt, untersuchte ich ebenfalls die Caspase 3/7 Aktivität [115,116]. Ähnlich wie bei der Kombinationsbehandlung mit BH3-Mimetika konnte durch die Kombination von 5-FU und DMF ein Anstieg der Caspase 3/7 Aktivität beobachtet werden (Abbildung 27a). Der größte Anstieg in der Caspase-Aktivität konnte bei einer Konzentration von 2,5 μM 5-FU und 25 μM DMF nach 72 h beobachtet werden (Abbildung 27a). Unter diesen Behandlungsbedingungen stieg die Caspase-Aktivität um 55,3% an. Eine Kombination aus 5-FU und DMF steigerte ebenfalls die PARP-Spaltung im Vergleich zur Monobehandlung mit den beiden Wirkstoffen (Abbildung 27b). Eine Kombination aus 2,5 μM 5-FU und 50 μM DMF zeigte die größten Effekte. Es konnte ebenfalls eine Reduktion der relativen ATP-Mengen durch eine 5-FU/DMF-Kombination gemessen werden. So führte die Kombination von 2,5 μM 5-FU und 50 μM DMF zu einer Reduktion des ATP-Gehalts um bis zu 13,7% im Vergleich zu einer 2,5 μM 5-FU Monobehandlung (Abbildung 27c). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl DMF als auch 5-FU Zelltod induzieren. Mittels Durchflusszytometrie sollte bestimmt werden, ob die Zelltodrate durch eine Kombination aus 5-FU und DMF gesteigert werden kann. Die Zelltodrate konnte um bis zu 26,4% gesteigert werden (Abbildung 27d). Eine Kombination von 1,25 μM 5-FU und 25 μM DMF führte nach 48 h zu einer Zelltodrate von 29,0%. Eine Monobehandlung mit 1,25 μM 5-FU führte hingegen zu einer Zelltodrate von 10,2% und eine Monobehandlung mit 25 μM DMF zu 10,1%. Daraus lässt sich schließen, dass durch eine DMF/5-FU-Kombination die Dosis der beiden Wirkstoffe verringert werden kann.

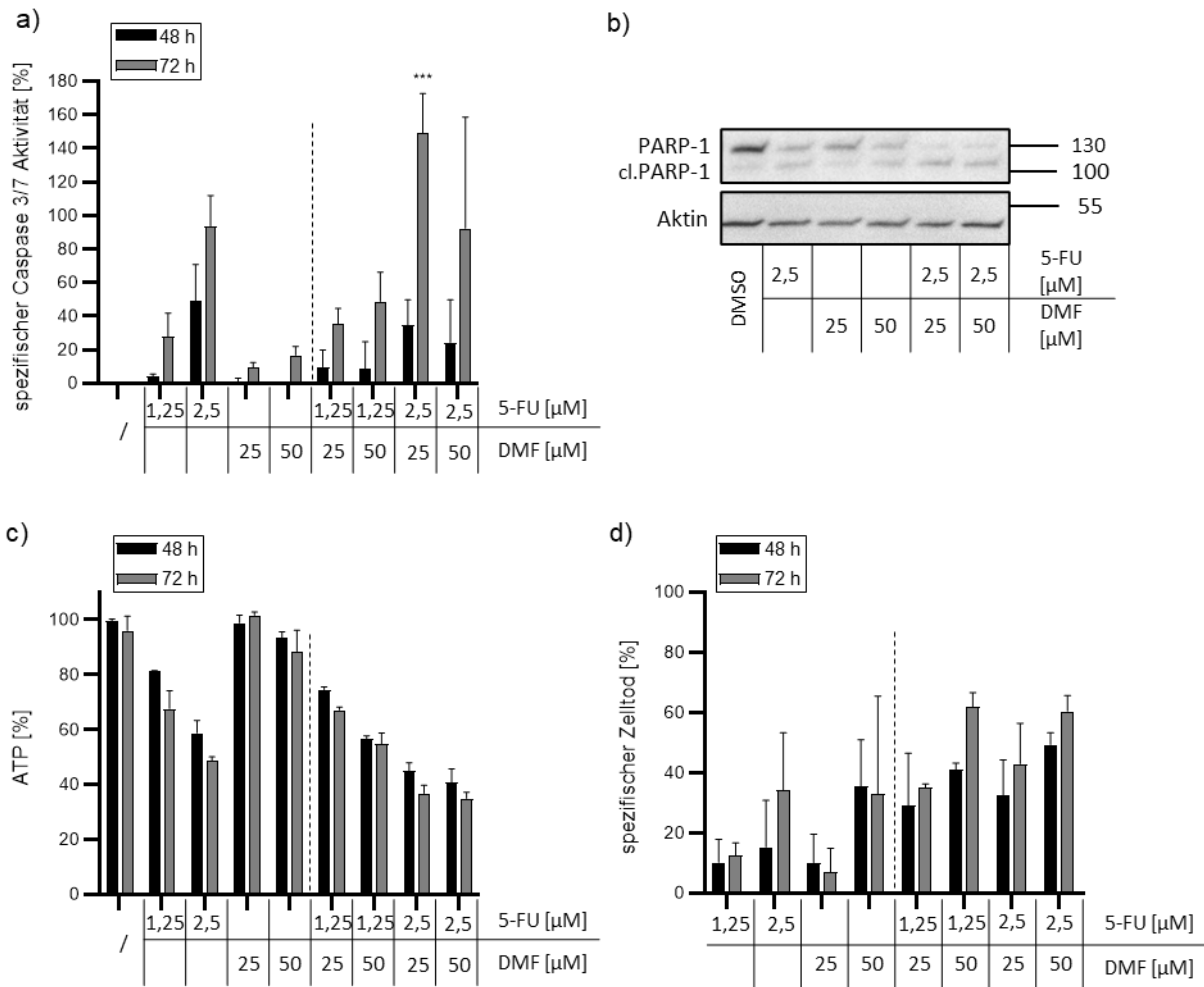


Abbildung 27: DMF in Kombination mit 5-FU führt zu einer gesteigerten Zelltodinduktion. HCT116-Zellen wurden für bis zu 72 h mit den angegebenen 5-FU und/oder DMF-Konzentrationen behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. **(a)** Aktivitätsassay von Caspase 3/7. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für bis zu 72 h behandelt. Die Daten zeigen die spezifische Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (n = 3). Die gestrichelte Linie trennt die Einzelbehandlungen von der Kombinationsbehandlung. **(b)** Western Blot Analyse von (gespaltenem) PARP nach Behandlung mit 5-FU und/oder DMF für 48 h (n = 2). **(c)** ATP-Gehalt von HCT116 nach Behandlung mit 5-FU und/oder DMF für bis zu 72 h (48 h: n = 2; 72 h: n = 1). Die gestrichelte Linie trennt die Einzelbehandlungen von der Kombinationsbehandlung. Die Daten zeigen den relativen ATP-Gehalt im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. **(d)** Spezifischer Zelltod für 5-FU- und DMF-Monobehandlung, sowie 5-FU/DMF-Kombinationsbehandlung (n = 2). Die gestrichelte Linie trennt die Einzelbehandlungen von der Kombinationsbehandlung. Der spezifische Zelltod wurde mit $(\text{Zelltod}_{\text{Behandlung}} - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) / (100 - \text{Zelltod}_{\text{Kontrolle}}) * 100$ berechnet [107]. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 verglichen mit der DMSO-Monobehandlung). Die Ergebnisse wurden mittels *One Way Anova* analysiert.

4 Diskussion

4.1 Derzeitige Behandlungsoptionen für das HCC

Obwohl neue Forschungserkenntnisse zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten geführt haben, ist die Prognose für eine fortgeschrittene HCC-Erkrankung immer noch schlecht [36,38,117,118]. Dies liegt unter anderem daran, dass die Mehrheit der HCC-Erkrankungen erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden [26,115].

Für viele Jahre war der Multikinase-Inhibitor Sorafenib die einzige effektive systemische Therapie für Patienten mit fortgeschrittenem HCC. In der SHARP-Studie verlängerte Sorafenib das OS im Vergleich zum Placebo um fast drei Monate und somit auf insgesamt 10,7 Monate [38]. Eine aktuellere Studie zeigte sogar einen Anstieg des OS auf 14,7 Monate mit Sorafenib-Behandlung (CheckMate-459). Bei der CheckMate-459 Studie wurde die Sorafenib-Behandlung mit einer Nivolumab-Behandlung verglichen [119].

Die Ansprechraten sind jedoch nach wie vor niedrig, und bei den meisten Patienten kommt es zum Fortschreiten der Erkrankung. Aufgrund der genetischen Heterogenität des HCCs zeigen manche Patienten eine Primärresistenz gegenüber Sorafenib. Patienten können allerdings auch im Verlauf der Behandlung Resistenzen entwickeln. Häufige auftretende Mutationen wie z.B. TERT, CTNNB1 und TP53 erschweren zudem die Therapierbarkeit des HCC [120].

Es gibt verschiedene Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Sorafenib führen können. Zu diesen Mechanismen gehören der PI3K/AKT und JAK-STAT Stoffwechselweg, die Aktivierung von Hypoxie-induzierten Signalwegen sowie eine verstärkte Expression von Arzneimittel-Efflux-Transportern [121,122]. Ein weiterer Multikinase-Inhibitor – Lenvatinib – erwies sich als ebenso wirksam wie Sorafenib (REFLECT) und ist als alternative Erstlinientherapie zugelassen (Abbildung 28) [36,123]. Weiterhin zeigte Lenvatinib in einer Kombination mit Pembrolizumab eine vielversprechende anti-Tumor Aktivität mit einem medianen OS von 21,2 Monaten (LEAP-002-Studie) [124].

Die Kombination von Atezolizumab und Bevacizumab als weitere Erstlinientherapie verbesserte das mediane OS (auf 19,2 Monate). Das progressionsfreie Überleben der HCC-Patienten konnte um 2,6 Monate (auf 6,9 Monate) verglichen mit 4,3 Monaten bei Sorafenib-Behandlung verbessert werden (IM-brave150) [125,126]. Kürzlich wurden die Immun-Checkpoint-Inhibitoren Tremelimumab und Durvalumab als zusätzliche Erstlinientherapie von

der FDA und EMA zugelassen (Abbildung 28). Die Tremelimumab/Durvalumab-Kombination war Sorafenib in der Wirksamkeit überlegen. Außerdem konnte die Kombination dieser beiden Wirkstoffe das mediane OS im Vergleich zu Sorafenib um 2,6 Monate steigern (HIMALAYA-Studie) [127,128].

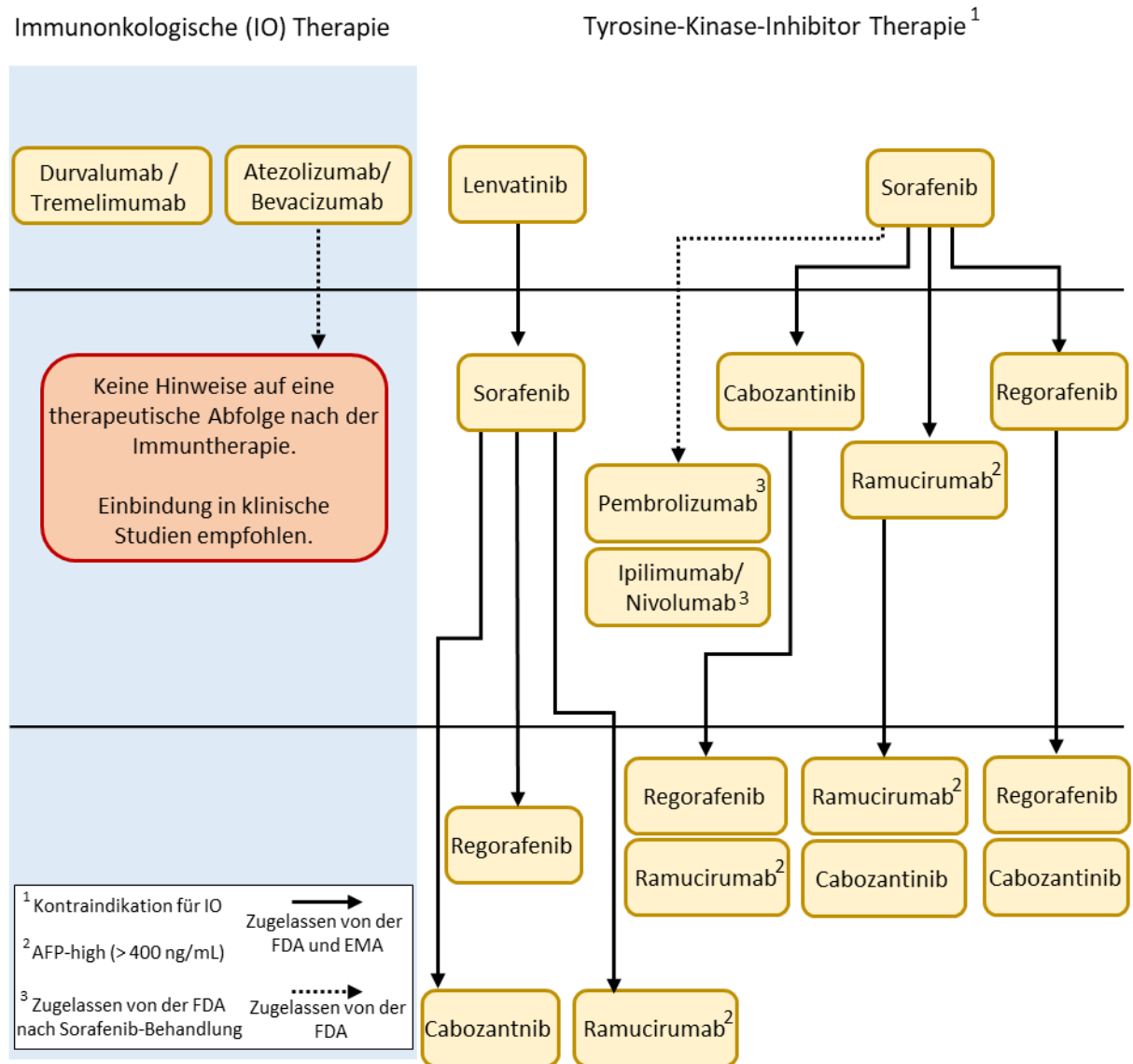


Abbildung 28: Algorithmus der systemischen Therapie bei HCC (BCLC-Stadium C) auf der Grundlage der Zulassung durch EMA und FDA. Nach Tümen et al. [28]

Weiterhin konnte in der CARES-310 Studie gezeigt werden, dass eine Kombination aus Camrelizumab (Anti-PD-1 Immun-Checkpoint-Inhibitor) und Rivoceranib (Tyrosinkinase-Inhibitor mit spezifischer Aktivität gegen VEGFR-2) zu einer signifikant verbesserten Überlebensrate im Vergleich zur Sorafenib-Monotherapie führt [129]. Dies unterstützt das

Konzept einer Kombination aus Immun-Checkpoint-Inhibitoren und VEGF-gerichteten Therapien im HCC.

Nach der deutschen S3-Leitlinie für Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome vom August 2023 soll HCC-Patienten im Child-Pugh-Stadium A und BCLC B oder C, mit Fernmetastasen oder einer Tumorlokalisation, die lokoregionär nicht kontrolliert oder reseziert werden kann eine Atezolizumab/Bevacizumab-Kombination oder eine Durvalumab/Tremelimumab-Kombination als Erstlinientherapie angeboten werden. Patienten mit einer Kontraindikation für eine Immuntherapie soll eine Therapie mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib oder Lenvatinib angeboten werden [37].

Obwohl sich die bestehenden Therapien verbessert haben, sind die Ansprechraten nach wie vor gering und es kommt zum Fortschreiten der Erkrankung bei den meisten Patienten. Es besteht daher ein großer Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten nach dem Versagen oder als Alternative zu bestehenden Therapien [117]. Weiterhin liefern diese Studien auch Hinweise darauf, dass die Kombination verschiedener Wirkstoffe neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet.

Die Therapieoptionen für das HCC haben sich über die letzten Jahre zwar verbessert, dennoch gehört das HCC zu den Tumorentitäten mit der dritthöchsten Sterblichkeitsrate [1]. Bestehende oder erworbene Resistenzen erschweren dabei zusätzlich die Behandlung. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen dringend erforderlich.

4.2 DMF als neue Therapieoption für das HCC

Experimente mit malignen T-Zellen verdeutlichen die antikanzerogene Wirkung von DMF. So konnten wir zeigen, dass DMF Apoptose in CTCL-Zellen induziert. Die Behandlung mit DMF führt dabei zur Inhibition von NF- κ B, indem es eine spezifische Monomethylsuccinylierung an Txr1 durchführt. Dadurch kommt es zur Blockade von Txr1. Die daraus folgende Inhibition von NF- κ B führt in NF- κ B-abhängigen Tumoren zum Zelltod [75]. In einem Xenograft CTCL Maus-Modell konnten wir ebenfalls zeigen, dass DMF die Metastasierung inhibiert [62,76,78]. Interessanterweise konnten wir *in vitro* zeigen, dass die Inhibition der Metastasierung NF- κ B-unabhängig ist (Daten nicht veröffentlicht). Die DMF-abhängigen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnten bisher noch nicht geklärt werden.

In bislang unveröffentlichten Daten konnten wir weiterhin zeigen, dass DMF ebenfalls in soliden, NF- κ B-unabhängigen Tumoren (Mamma-, Pankreas-, Prostata- und Kolonkarzinom) moderaten Zelltod auslöst. Ebenso führte die DMF-Applikation zu einer massiven Inhibition der Migration, der Invasion sowie der Angiogenese. Diese Eigenschaften sind entscheidend für die Bildung von Metastasen [105].

Die Untersuchungen zu den antikanzerogenen Eigenschaften von DMF sollten innerhalb dieser Arbeit auf HCC-Zelllinien ausgeweitet werden. In diesem Zusammenhang sollte DMF als neue Therapieoption für das schwer zu behandelnde HCC untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass DMF den relativen ATP-Gehalt in HCC-Zelllinien reduziert. Die ATP-Reduktion war dabei sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig (Abbildung 9). Kürzlich wurde eine hohe mitochondriale ATP-Produktion als neues therapeutisches Ziel für die Tumorbehandlung vorgestellt. Ein hoher ATP-Gehalt war kohärent mit einem aggressiven Tumorphänotyp. So besaßen diese Zellen verstärkt eine Resistenz gegenüber Medikamenten und wiesen eine erhöhte Fähigkeit zur Zellmigration, Invasion und zur spontanen Metastasierung auf. Umgekehrt wurde die Metastasierung durch eine Reduktion des ATP-Gehalts inhibiert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigten ATP-reiche MDA-MB-231 Mammakarzinom-Zellen *in vivo* einen dramatischen Anstieg in ihrer Fähigkeit zur Metastasierung. Umgekehrt konnte die Metastasierung durch Behandlung mit Bedaquilin, einem Inhibitor der ATP-Synthase, inhibiert werden [130,131]. Die Reduktion des ATP-Gehalts könnte somit als Mechanismus zur Metastasierungs-Inhibition in HCC-Zelllinien fungieren. Andere Mechanismen, welche die Metastasierung inhibieren, sind aber ebenso denkbar. So konnten *Takeda et al.* zeigen, dass DMF die Migration von Melanom-Zellen inhibiert, in dem es die Translokation von NF- κ B in den Nukleus verhindert [101,132].

Ein hoher mitochondrialer ATP-Gehalt kann ebenfalls ein entscheidender Faktor für eine erhöhte Zellproliferation sein. So konnte gezeigt werden, dass in Mammakarzinom-Zellen eine Überexpression von *Anti-ATPase Inhibitory Factor 1* (IF1) sowohl die ATP-Produktion als auch die Proliferation reduziert wird [103]. Durch *Schmitt et al.* konnte gezeigt werden, dass DMF ebenfalls die Proliferation im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (*engl. diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL)) inhibiert [133]. Eine DMF induzierte Proliferationsinhibition konnte ebenfalls in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden [134]. Auch in einem *in vivo* Modell konnte eine DMF-Behandlung das Tumorwachstum inhibieren [76]. Somit konnte gezeigt werden,

dass eine Behandlung mit DMF die Proliferation sowohl *in vitro* (in unterschiedlichen Zelllinien) als auch *in vivo* inhibiert.

Die Proliferation von Zellen ist eng mit dem Zellzyklus verknüpft. *Kaluzki et al.* konnten zeigen, dass DMF einen G0/G1 Arrest in Kolonkarzinomzellen induziert, wodurch es zu einer Proliferationsinhibition kommt [134]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DMF unterschiedlich auf den Zellzyklus der analysierten Zelllinien wirkt. So konnte bei HepG2 keine Veränderung im Zellzyklus durch DMF-Behandlung beobachtet werden. Anders bei Huh7 und Hep3B, bei diesen Zelllinien führte die DMF-Behandlung zu einem deutlichen G2-Arrest (Abbildung 12). Darauf lässt sich schließen, dass die Auswirkungen von DMF auf den Zellzyklus abhängig von der untersuchten Zelllinie ist. Die G2 oder G2/M Phase des Zellzyklus fungiert als entscheidender DNA-Schadens-Checkpoint. Dieser Checkpoint sorgt dafür, dass Zellen mit beschädigten Chromosomen nicht in die mitotische Phase übergehen können [135,136]. Normalerweise wird dieser Arrest genutzt, um die geschädigte DNA zu reparieren. Gelingt dies nicht, kommt es zur Induktion des Zelltods [137]. Ein Zellzyklusarrest in der G2/M Phase kann entweder durch eine Inhibition der CDK1 Aktivierung oder durch Unterdrückung der Chromosomensegregation erfolgen [138].

Wie bereits erwähnt, konnten wir innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass DMF Zelltod in CTCL-Zellen induziert [75]. Aufgrund der guten Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* wurde eine klinische Studie der Phase II in Patienten des Sézary-Syndroms initiiert [75,76]. Dabei wurde Patienten DMF über 24 Wochen oral verabreicht. Beim Sézary-Syndrom tritt unter anderem eine großflächige Hautrötung, sowie damit verbunden ein starker Juckreiz auf. Insgesamt 30,4% der behandelten Patienten zeigten eine Reduktion der Hautbeteiligung. Auch der damit verbundene Juckreiz konnte reduziert werden. Patienten mit einer hohen Tumorlast reagierten besonders gut auf die DMF-Behandlung. Die Tumorlast im Blut der Patienten konnte durch die DMF-Behandlung ebenfalls gesenkt werden. In dieser von uns initiierten klinischen Studie wurde die DMF-Therapie im Allgemeinen gut vertragen und führte überwiegend nur zu leichten Nebenwirkungen [62].

Die Behandlung von HCC-Zelllinien mit DMF führte ebenfalls zu einer moderaten Zelltodinduktion (Abbildung 14). Abhängig von der untersuchten Zelllinie konnte ebenfalls eine Zelltodinduktion durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD beobachtet werden (Abbildung 14). Dies zeigt, dass DMF ebenfalls in HCC-Zellen Apoptose induziert. Somit kann DMF den

Zelltod in soliden, sowie nicht-soliden Tumorentitäten induzieren. *Tsurushima et al.* konnten bereits zeigen, dass DMF ebenfalls in Brustkrebszellen Apoptose induzieren kann [139]. Ferner ist DMF ebenfalls in der Lage Ferroptose in DLBCL zu induzieren [133]. Ferroptose ist eine Art des Zelltods, die mit freiem Fe^{2+} , H_2O_2 und einer Lipidperoxidation einhergeht. Bei der Oxidation von Fe^{2+} und H_2O_2 (auch bekannt als Fenton-Reaktion) entstehen Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$) die einem Lipid Wasserstoff (H) entziehen und ein Lipidradikal ($\text{L}\cdot$) bilden. Dies stellt den Beginn der Lipidperoxidation dar. Anschließend verbinden sich die Lipidradikale mit O_2 zum einem Lipidperoxyradikal ($\text{LOO}\cdot$), welches Wasserstoff aus benachbarten mehrfach ungesättigten Fettsäuren entzieht. Dadurch entstehen zytotoxischen Lipidperoxide (LOOH) und ein neues Lipidradikal, was die Oxidationsreaktion fortführt. Eine Akkumulation von Lipidperoxiden führt zur Einleitung des Zelltods [140].

Die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) spielt bei der Regulation der Ferroptose eine Schlüsselrolle. GPX4 oxidiert Glutathion und reduziert LOOH in die entsprechenden Alkohole (LOH)[141]. Ferroptose-Aktivatoren wie z.B. Erastin oder RSL3 inhibieren GPX4 indem sie die intrazelluläre Eisenanreicherung erhöhen [142]. Eine Inhibition von GPX4 führt somit zur Akkumulation von Lipidperoxiden und dadurch zur Zelltodinduktion[141].

Für das HCC könnten unterschiedliche Zelltodmechanismen infrage kommen. So könnte auch die bereits beschriebene Energie-Depletion zur Einleitung des Zelltods führen [143,144]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Energie-Depletion den Zelltod in Tumorzellen über den PDK1-PI3-K/Akt Signalweg induziert [144]. Weiterhin konnte durch *Liu et al.* gezeigt werden, dass DMF die HCC-Progression über dem SOCS3/JAK1/STAT3 Signalweg inhibiert [102]. Dadurch kann das Fortschreiten der Erkrankung effektiv verhindert werden.

Da DMF nur moderaten Zelltod in HCC-Zellen induziert, sollte DMF noch mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden. Ein vielversprechendes Therapeutikum für eine Kombinationstherapie ist der Bcl-2 Inhibitor ABT-199. In *Froehlich et al.* konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Kombination aus DMF und ABT-199 die Zelltodinduktion in CTCL *in vitro* und *in vivo* deutlich steigern kann [78]. Weiterhin konnte mit dieser Wirkstoffkombination ebenfalls die Proliferation geblockt werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, Metastasen zu bilden, verringert [145]. Es gibt bereits klinische Studien, in denen DMF mit anderen Wirkstoffen kombiniert wird. So laufen derzeit klinische Studien zu Entzündungskrankheiten, zur Behandlung von ischämischen Schlaganfällen, aber auch zur

Therapie eines neu diagnostizierten Glioblastoms (Glioblastoma multiforme) [70,146–149]. Dies lässt darauf schließen, dass sich DMF gut als Kombinationswirkstoff eignet.

DMF ist bereits in klinischer Anwendung und weist im Gegensatz zu gängigen Tumorthapeutika ein geringeres Nebenwirkungsspektrum auf. So ist DMF als neue Option zur Behandlung des HCCs denkbar. DMF könnte unter anderem zur Induktion des Zelltods im HCC eingesetzt werden. Ebenfalls könnte ein Fortschreiten der HCC-Erkrankung durch die Reduktion der Proliferationsrate erreicht werden.

4.3 BH3-Mimetika im HCC und anderen Tumorentitäten

Die beiden BH3-Mimetika ABT-199 und MIK665 präsentieren sich als innovative therapeutische Ansätze zur Bekämpfung des HCCs. Die vorliegenden Forschungsergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die gleichzeitige Hemmung von zwei Mitgliedern der BCL-2-Proteinfamilie in Huh7-Zellen erfolgreich zur Auslösung des programmierten Zelltods führt. Darüber hinaus erwies sich die Kombination von Bcl-2- und Mcl-1-Inhibitoren auch in anderen Zelllinien als wirksame Strategie zur Initiierung der Caspase-Kaskade und somit zur Induktion des Zelltods. In *Michalski et al.* wurden die HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 miteinander verglichen. Zuerst wurde das Expressionsniveau der wichtigsten BCL-2 Proteinfamilienmitglieder untersucht. Es stellte sich heraus, dass Huh7 ein niedriges Bcl-2 Level und ein moderates Mcl-1 Level im Vergleich zu den anderen HCC-Zelllinien aufweist. Dennoch konnten durch eine BH3-Mimetika Kombination gute Zelltodraten erreicht werden, was auf eine Ko-Abhängigkeit von diesen BCL-2 Proteinen deutet.

Ebenso zeigte sich, dass eine Kombination aus ABT-199 und MIK665 synergistisch in Huh7 wirkt (Abbildung 24). Dies konnte auch für die Zelllinien Hep3B und HepG2 gezeigt werden. Es scheint dabei einen Zusammenhang zwischen Expression von BCL-2 Proteinen und der Ansprechrate auf die BH3-Mimetika zu geben. Bei gleichen Konzentrationen war die Zelltodinduktion in Hep3B und HepG2 im Vergleich zu Huh7 gesteigert [108].

Allerdings beruhen Ko-Abhängigkeiten oft auf komplexen Interaktionen zwischen pro- und anti-apoptischen BCL-2 Proteinen. Deshalb kann nicht direkt vom Expressionsmuster auf das Behandlungsansprechen geschlossen werden [87,150,151]. HCC-Zellen exprimieren anti-apoptische Proteine in heterogener Art und Weise [91,152,153]. Die Bestimmung von

Abhängigkeiten mittels *BH3-Profiling* könnte daher Patienten auswählen, die wahrscheinlich gut auf eine BH3-Mimetika Therapie reagieren würden und so die Behandlungsergebnisse verbessern [154].

Die BH3-Mimetika ABT-737 und das Derivat ABT-263 (Navitoclax) inhibieren Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w. Eine Monobehandlung mit ABT-737 konnte keinen Zelltod in HCC-Zelllinien induzieren. Erst eine Kombination mit Sorafenib erhöhte die Zelltodrate und induzierte erfolgreich Apoptose. Sorafenib ist dafür bekannt, Mcl-1 herunter zu regulieren [92].

Eine Kombination aus ABT-737 und Celastrol führte zu einer synergistischen Inhibition der Proliferation und zur Apoptoseinduktion in HCC-Zelllinien. Durch die Behandlung mit Celastrol wird die NOXA-Expression verstärkt. Bei NOXA handelt es sich um einen intrazellulären Mcl-1-Inhibitor [93]. Dies unterstreicht die große Bedeutung, die Mcl-1 für das Überleben von HCC-Zellen spielt. Weiterhin konnte durch *Tutusaus et al.* gezeigt werden, dass ABT-263 die Effektivität von Sorafenib verstärkt. Dieser Effekt ist auf die Bcl-X_L-Inhibition zurückzuführen [153]. Bcl-X_L und Mcl-1 sind häufig im HCC überexprimiert und die HCC-Zellen abhängig von diesen Proteinen [92,155]. Eine gleichzeitige Blockade von Mcl-1 und Bcl-X_L könnte deshalb ebenfalls ein vielversprechender Behandlungsansatz für HCC-Patienten sein. Eine sichere Dosis für einen Bcl-X_L-Inhibitor ist jedoch schwer zu finden. Bcl-X_L ist wichtig für die Thrombopoese und eine Hemmung von Bcl-X_L führt zu einer schweren Thrombopenie, die ein hohes Blutungsrisiko birgt und häufig zu einem Abbruch der Behandlung führt [156,157].

Im Gegensatz zu ABT-263 befindet sich ABT-199 bereits in klinischer Anwendung und zeigt deutlich weniger Nebenwirkungen als ABT-263 [80,84]. Bereits die ersten Studien zu ABT-199 in CLL zeigten vielversprechende Ergebnisse. In einer Phase I Studie (NCT01328626) bei Patienten mit rezidiver oder refraktärer CLL wurden Gesamtansprechraten von 79 % und eine vollständige Ansprechraten von 20 % erreicht [158]. Weitere Studien führten zur Zulassung von ABT-199 bei CLL-Patienten im Jahr 2016 durch die EMA [89]. Es wurde berichtet, dass eine Therapie auf der Grundlage von ABT-199 bei Patienten mit CLL oder AML viel besser vertragen wird und wirksamer ist als eine herkömmliche Chemo-Immuntherapie. Dies wiederum bedeutet eine höhere Lebensqualität für die Patienten [84]. Auch bei einer ABT-199 basierten Therapie führt die Entwicklung von Resistenzen zu Behandlungsschwierigkeiten. Ein Resistenzmechanismus von ABT-199 in CLL-Patienten ist die Hochregulation von Mcl-1 [85].

Viele Tumorentitäten, das HCC eingeschlossen, weisen eine Mcl-1 Überexpression auf [152]. Es scheint sogar so, dass Mcl-1 bei einigen Krebsarten als Schlüsselfaktor für die Resistenz gegen herkömmliche Therapien fungiert [159–161]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine simultane Inhibition von Mcl-1 und Bcl-2 die Sensitivität von AML-Zellen gegenüber ABT-199 wiederherstellt [162]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der selektive Mcl-1 Inhibitor MIK665 eine sinnvolle Kombinationsmöglichkeit für den Bcl-2 Inhibitor ABT-199 darstellt. In einer laufenden klinischen Studie wird derzeit die therapeutische Wirkung einer ABT-199 und MIK665-Kombination (NCT03672695) bei AML untersucht [163]. Die gleiche Kombination zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse in Zellen der lymphoblastischen T-Zell-Leukämie [164].

Mukherjee et al. konnten ebenfalls zeigen, dass eine ABT-199/MIK665-Kombination auch in soliden Tumoren gute Effekte erzielt. Dort führt eine Kombination der beiden BH3-Mimetika zu einer reduzierten Zellviabilität und einer verstärkten Spaltung von PARP in verschiedenen Melanom-Zellen. In einem korrespondierenden Maus-Modell führte die Behandlung mit ABT-199 und MIK665 zu einer Verringerung des Tumolvolumens bei minimaler Toxizität [98]. Darüber hinaus zeigten *Seiller et al.* die Wirksamkeit der gleichen BH3-Mimetika Kombination beim multiplen Myelom [165].

Sowohl ABT-199 als auch MIK665 induzieren Apoptose ohne einen intakten p53 Tumorsuppressor-Signalweg [81,166,167]. So konnte durch *Michalski et al.* gezeigt werden, dass eine Kombination aus ABT-199 und MIK665 ebenfalls in Hep3B (keine p53 Expression) den Zelltod synergistisch induziert [108]. Eine BH3-Mimetika Kombinationsbehandlung könnte deshalb für Patienten mit einer p53-Mutation eine gute Option sein. Insgesamt 25-30% der Patienten mit HCC weisen eine Mutation in p53 auf. Im Vergleich zum Wildtyp-p53 führt eine Mutation zu einem kürzeren medianen OS und rezidivfreiem Überleben [120,168]. Eine Kombination spezifischer BH3-Mimetika ist deshalb ein neuer Ansatz für die Behandlung von HCC.

4.4 DMF in Kombination mit BH3-Mimetika

Neben DMF und BH3-Mimetika als neue mögliche Behandlungsoption für das HCC wurde auch eine Kombination aus DMF und BH3-Mimetika in Huh7-Zellen untersucht. Die Kombination führte dabei unter anderem zur verstärkten Inhibition der Migration im Vergleich zur DMF-

oder ABT-199/MIK665-Behandlung (Abbildung 25). Die Inhibition der Migration könnte, wie schon bei einer DMF-Monobehandlung, auf die Reduktion der relativen ATP-Menge zurückzuführen sein. Eine ABT-199/MIK665-Behandlung führte ebenfalls zu einer Reduktion des ATP-Gehalts in HCC-Zellen (Abbildung 21).

Ebenso konnte durch eine Kombination von DMF mit BH3-Mimetika die Zelltodrate, im Vergleich zur DMF-Monobehandlung, verbessert werden. Durch eine Kombination mit BH3-Mimetika kann dementsprechend die DMF-Konzentration reduziert werden. *Basilotta et al.* konnten zeigen, dass DMF das Bcl-2 Level in CAL27 Zellen reduziert [169]. Durch den Einfluss von DMF auf Bcl-2 könnten somit die Effekte der BH3-Mimetika Kombination verstärkt werden. Durch ein DMF induziertes reduziertes Bcl-2 Level könnte, bei simultaner Behandlung mit BH3-Mimetika, das Gleichgewicht der anti-apoptotischen Proteine verändert und in Richtung Apoptose geschoben werden.

Durch *Tsurushima et al.* konnte gezeigt werden, dass DMF ebenfalls das Bcl-2 und Bcl-X_L-Level in den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549 reduziert. Weiterhin konnten die Effekte von Paclitaxel (Apoptose Induktor) und Adriamycin (DNA Interkalant) durch DMF in Mammakarzinom-Zelllinien verstärkt werden [139]. Durch die Kombination mit DMF wird, in MDA-MB-231, verstärkt Apoptose induziert. Da DMF den Zelltod über eine NF- κ B-Inhibition in CTCL-Zellen induziert und BH3-Mimetika über intrinsische Apoptose wäre eine Kombination dieser beiden Mechanismen denkbar [75,108].

ABT-199 wird derzeit auch mit anderen Wirkstoffkombinationen in klinischen Studien zur Behandlung nicht solider Tumore untersucht [167,170–173]. Unter anderem wird eine ABT-199-Kombination in Verbindung mit einem Zytostatikum sowie einer Antikörpertherapie in Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht [170,173]. ABT-199 wird aber auch in soliden Tumorentitäten als Therapieoption untersucht. Zurzeit wird eine Kombination aus ABT-199 und Enzalutamid in Patienten mit Prostatakarzinom untersucht [174]. Somit kann ABT-199 auch zur Behandlung solider Tumore eingesetzt werden.

Auch MIK665 wird derzeit mit anderen Wirkstoffkombinationen in klinischen Studien analysiert [175,176]. In einer derzeit laufenden klinischen Studie wird MIK665 mit einem anderem Bcl-2 Inhibitor (VOB560) in Lymphomen, Leukämien oder Multiplen Myelomen untersucht [175]. Eine andere Studie untersucht das Zusammenwirken von MIK665 mit

Azacitidin in AML [176]. Da sich sowohl ABT-199 als auch DMF bereits in klinischer Anwendung befinden, wäre eine klinische Studie mit einer ABT-199/MIK665/DMF-Kombination denkbar.

4.5 DMF in Kombination mit 5-FU

Das CRC ist die am dritthäufigsten diagnostizierte Tumorentität und die zweithäufigste Todesursache im Bereich der Tumorerkrankungen weltweit (Abbildung 2) [1]. Nach wie vor sind die Behandlungsoptionen beschränkt. Die Bildung von Resistenzen erschwert zusätzlich die Behandlung [44,49]. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen für das CRC essenziell.

Bereits eine Kombination aus DMF und Oxaliplatin konnte gute Effekte in Kolonkarzinomzellen erzielen. Diese Wirkstoffkombination konnte erfolgreich den Zelltod durch Apoptose und Autophagie induzieren. DMF führte in der CRC-Zelllinie T84 zu einer gesteigerten Caspase 3/7 Aktivität [134]. Auch eine Kombination aus DMF und 5-FU führte zu einer gesteigerten Caspase 3/7 Aktivität und Zelltodinduktion.

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DMF die Proliferation in HCC-Zelllinien inhibiert. In nicht veröffentlichten Daten konnte unsere Arbeitsgruppe weiterhin zeigen, dass DMF ebenfalls die Proliferation in CRC-Zelllinien inhibiert. In *Kaluzki et al.* konnte ebenfalls eine Proliferationsinhibition von CRC-Zellen nach DMF-Behandlung gezeigt werden. Die Proliferationsinhibition konnte durch Kombination von DMF mit Oxaliplatin signifikant gesteigert werden. Demzufolge würde DMF sich als Proliferationsinhibitor, möglicherweise auch in Kombination mit 5-FU, für das CRC anbieten. Durch Mutationen in der Entstehung des CRCs kommt es unter anderem zu einer unkontrollierten Zellproliferation und zum Fortschreiten der Erkrankung [47].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DMF zusammen mit 5-FU Apoptose induziert. Dabei kann durch eine Kombination von DMF und 5-FU die Dosis für beide Wirkstoffe reduziert werden (Abbildung 27). Auch *Singhal et al.* konnten zeigen, dass DMF effektiv Zelltod in CRC-Zellen induziert. Durch eine gleichzeitige HIF-Aktivierung konnte die Zelltodrate nochmals gesteigert werden. Dazu wurde DMF mit dem HIF-Prolylhydroxylase-Inhibitor FG-4592 kombiniert. In einem *in vivo* Xenograft Maus-Model konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine DMF/FG-4592 Kombination das Tumolvolumen und -gewicht deutlich reduziert. In einem

TUNEL-Assay konnte bestätigt werden, dass eine DMF/FG-4592 Kombination auch *in vivo* Apoptose in Tumorzellen induziert [177].

5-FU wird bei der Behandlung von CRC im Endstadium mit einer Kombination aus Folinsäure und Oxaliplatin eingesetzt [48]. Dies bedeutet, dass eine Wirkstoffkombination mit 5-FU bereits Anwendung findet. Gleichzeitig werden derzeit zahlreiche klinische Studien durchgeführt, die 5-FU mit anderen Wirkstoffen kombinieren [178–180].

Durch die Ergebnisse von *Singhal et al.* lässt sich schlussfolgern, dass DMF ebenfalls mit etablierten Tumortherapeutika kombiniert werden kann. Dadurch kann das Therapiespektrum für CRC-Patienten erweitert werden. Dementsprechend scheint eine Kombination aus 5-FU und DMF ebenfalls vielversprechend. Durch diese Kombination kann sowohl Zelltod induziert als auch die Proliferation inhibiert werden. Da sowohl 5-FU als auch DMF bereits in der klinischen Anwendung etabliert sind, eröffnet sich die Möglichkeit einer raschen Translation dieser Erkenntnisse in die klinische Praxis.

5 Zusammenfassung

Leberneoplasien zählen zu den malignen Erkrankungen mit der drittgrößten globalen Mortalitätsrate. Innerhalb dieses Spektrums repräsentiert das HCC die prädominante maligne Entität innerhalb der Leber. Die wachsende Prävalenz von Leberneoplasien kann auf verschiedene Risikofaktoren zurückgeführt werden. Trotz dieser alarmierenden Trends bleiben die therapeutischen Optionen für das HCC begrenzt. Eine zusätzliche Herausforderung stellt die Entwicklung von Therapieresistenzen dar, die die Effektivität der therapeutischen Interventionen weiter erschweren.

Deshalb lag der Schwerpunkt dieser Arbeit darin, DMF als neue mögliche Therapieoption für das HCC zu evaluieren. Dazu wurden insgesamt 3 HCC-Zelllinien (Huh7, HepG2 und Hep3B) mit aufsteigenden DMF-Konzentrationen für bis zu 72 h behandelt. Durch die Behandlung mit DMF konnte der relative ATP-Gehalt in den Zelllinien signifikant reduziert werden. Diese Energie-Depletion wirkte sich maßgeblich auf die HCC-Zelllinien aus. Es konnte sowohl eine Inhibition der Migration als auch der Proliferation festgestellt werden. Der Proliferationsinhibition liegt ein G2-Arrest zugrunde. Weiterhin konnte durch eine Behandlung der HCC-Zellen mit DMF effektiv der Zelltod induziert werden. Dieser ließ sich mittels zVAD blocken, was Apoptose als Zelltodmechanismus aufzeigt.

Die benötigten DMF-Konzentrationen zur Zelltodinduktion in HCC-Zelllinien waren im Vergleich zu CTCL-Zellen relativ hoch. Deshalb sollte DMF noch mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden. Zur Wirkstoffkombination wurden die BH3 Mimetika ABT-199 (Bcl-2-Inhibitor) und MIK665 (Mcl-1-Inhibitor) ausgewählt. Eine Kombination aus NF- κ B Inhibition (DMF) und Bcl-2 Inhibition (ABT 199) konnte bereits *in vitro* und *in vivo* gute Effekte in CTCL-Zellen erzielen. Zuerst wurde die IC_{50} einer BH3-Mimetika Monotherapie in Huh7 gemessen. Die IC_{50} einer ABT-199 oder MIK665 Monotherapie war ebenfalls relativ hoch. Deshalb wurden die beiden BH3-Mimetika miteinander kombiniert. Durch eine Kombination konnte die IC_{50} der beiden Wirkstoffe massiv reduziert werden. Durch die gleichzeitige Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 konnte erfolgreich Apoptose induziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch die Freisetzung von Cytochrom c, der Spaltung und Aktivitätssteigerung der Caspase 9 und der Caspase 3 sowie der Spaltung von PARP bestätigt.

Es folgte eine Wirkstoffkombination aus DMF, ABT-199 und MIK665 in Huh7. Durch die Kombination von DMF mit den beiden BH3-Mimetika konnte die DMF-induzierte Migrationsinhibition verstärkt werden. Gleichzeitig konnte die dafür benötigte DMF-Konzentration reduziert werden. Diese Effekte zeigten sich ebenfalls bei der Zelltodinduktion. Durch eine Kombination von BH3-Mimetika kann die DMF-Konzentration effektiv verringert werden.

Da DMF sowohl die Migration als auch die Proliferation inhibiert, wurden die Untersuchungen auf das CRC ausgeweitet. Das CRC ist die zweithäufigste Todesursache im Bereich der Tumorerkrankungen weltweit. Eine unkontrollierte Zellproliferation führt zum Fortschreiten dieser Erkrankung. Das Zytostatikum 5-FU gehört zu den wichtigsten eingesetzten Wirkstoffen beim CRC. Deshalb wurde DMF ebenfalls mit 5-FU kombiniert. Durch die Kombination konnte sowohl die spezifische Caspase 3/7 Aktivität sowie die PARP-Spaltung gesteigert werden. Die Kombination resultierte ebenfalls in einer Energie-Depletion sowie in einer Steigerung der Zelltodinduktion. Durch eine Kombination von DMF und 5-FU konnten beiden Wirkstoffkonzentrationen reduziert werden.

In dieser Studie wurde erfolgreich aufgezeigt, dass DMF eine neuartige therapeutische Option für die Behandlung vom HCC und CRC darstellt. DMF zeichnet sich insbesondere durch seine bereits etablierte klinische Anwendung und das vergleichsweise geringe Spektrum an Nebenwirkungen im Vergleich zu herkömmlichen Tumorthapeutika aus. Besonders vielversprechend erscheint die Möglichkeit einer Kombination von DMF mit anderen Wirkstoffen.

6 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
AKT	Proteinkinasen B
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase <i>eng. AMP-activated protein kinase</i>
APAF-1	<i>engl. Apoptotic Protease-activating Factor 1</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
ATCC	<i>engl. American Type Culture Collection</i>
Bak	<i>engl. BCL2 antagonist/killer 1</i>
Bax	<i>engl. Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>engl. B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-B	<i>engl. B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member B</i>
BCLC	<i>engl. Barcelona-Clinic-Liver Cancer</i>
Bcl-W	<i>engl. B-cell lymphoma W</i>
Bcl-X _L	<i>engl. B-cell lymphoma-extra large</i>
BH3	<i>engl. Bcl-2 homology 3</i>
Bid	<i>engl. BH3 interacting-domain death agonist</i>
Bik	<i>engl. Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	<i>engl. Bcl-2-like protein 11</i>
Bmf	<i>engl. Bcl-2-modifying factor</i>
Bok	<i>engl. Bcl-2-related ovarian killer protein</i>
CBP–p300	<i>engl. CREBbinding protein–p300 complex</i>
CI	Kombinationsindex <i>engl. Combination Index</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLS	<i>engl. Cell Lines Service</i>
CRC	Kolorektales Karzinom <i>eng. Colorectal Cancer</i>
CTCL	kutanes T-Zell Lymphom <i>engl. cutaneous T cell lymphoma</i>
CXCL1	<i>engl. C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC	<i>engl. deleted in Colorectal Carcinoma</i>

DIABLO	<i>engl. Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI</i>
DLBCL	großzelligen B-Zell-Lymphom <i>engl. diffuse large B-cell lymphoma</i>
DMF	Dimethylfumarat
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur <i>engl. European Medicines Agency</i>
FACS	<i>engl. fluorescence-activated cell sorting</i>
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon
FDA	<i>engl. Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPX4	Glutathionperoxidase 4
HBV	Hepatitis B Virus
HCAR2	Hydroxycarbonsäure-Rezeptor
HCC	hepatozelluläre Karzinom <i>engl. hepatocellular carcinoma</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HRK	<i>engl. activator of apoptosis harakiri</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration <i>engl. half-maximum inhibitory concentration</i>
IF1	<i>engl. Anti-ATPase Inhibitory Factor 1</i>
IO	Immunonkologische Therapie
JAK	Januskinase
Keap1	<i>engl. kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KRAS	<i>engl. Kirsten rat sarcoma virus</i>
Maf	<i>engl. musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
MafK	Kleines Maf-Protein
MAP	<i>engl. mitogen-activated protein</i>
Mcl-1	<i>engl. induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i>
MDSC	<i>engl. Myeloid-derived suppressor cell</i>
MOMP	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran <i>engl. mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF- κ B	<i>engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Noxa	<i>engl. NADPH oxidase activator 1</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Nrf2	<i>engl. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
OS	Gesamtüberleben <i>engl. Overall survival</i>
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase-1
PDGF	<i>engl. platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RB	Retinoblastom-Protein
RT	Raumtemperatur
Sirt1	Sirtuin-1
Smac	<i>engl. Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOCS3	<i>engl. Suppressor of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>engl. Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TOMM20	<i>engl. Translocase of outer mitochondrial membrane 20</i>
TRAIL	<i>engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Trx 1	Thioredoxin 1
TSP-1	Thrombospondin-1

7 Literaturverzeichnis

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
2. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108, doi:10.3322/caac.21262.
3. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
4. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
5. Braicu, C.; Buse, M.; Busuioc, C.; Drula, R.; Gulei, D.; Raduly, L.; Rusu, A.; Irimie, A.; Atanasov, A.G.; Slaby, O.; et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1618, doi:10.3390/cancers11101618.
6. Teixido, C.; Castillo, P.; Martinez-Vila, C.; Arance, A.; Alos, L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells* **2021**, *10*, 2320, doi:10.3390/cells10092320.
7. Al Mahi, A.; Ablain, J. RAS Pathway Regulation in Melanoma. *Dis. Model. Mech.* **2022**, *15*, dmm049229, doi:10.1242/dmm.049229.
8. Inoue-Yamauchi, A.; Jeng, P.S.; Kim, K.; Chen, H.-C.; Han, S.; Ganesan, Y.T.; Ishizawa, K.; Jebiwott, S.; Dong, Y.; Pietanza, M.C.; et al. Targeting the Differential Addiction to Anti-Apoptotic BCL-2 Family for Cancer Therapy. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 16078, doi:10.1038/ncomms16078.
9. Yue, J.; López, J.M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2346, doi:10.3390/ijms21072346.
10. Levine, A.J. P53: 800 Million Years of Evolution and 40 Years of Discovery. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 471–480, doi:10.1038/s41568-020-0262-1.
11. Kunst, C.; Haderer, M.; Heckel, S.; Schlosser, S.; Müller, M. The P53 Family in Hepatocellular Carcinoma. *Transl. Cancer Res.* **2016**, *5*, doi:10.21037/tcr.2016.11.79.
12. Pitolli, C.; Wang, Y.; Candi, E.; Shi, Y.; Melino, G.; Amelio, I. P53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers* **2019**, *11*, 1983, doi:10.3390/cancers11121983.
13. Zhang, C.; Liu, J.; Xu, D.; Zhang, T.; Hu, W.; Feng, Z. Gain-of-Function Mutant P53 in Cancer Progression and Therapy. *J. Mol. Cell Biol.* **2020**, *12*, 674–687, doi:10.1093/jmcb/mjaa040.
14. Liu, S.; Liu, T.; Jiang, J.; Guo, H.; Yang, R. P53 Mutation and Deletion Contribute to Tumor Immune Evasion. *Front. Genet.* **2023**, *14*.
15. Dang, C.V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35, doi:10.1016/j.cell.2012.03.003.
16. Mao, Y.; Liu, X.; Song, Y.; Zhai, C.; Zhang, L. VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but Not PDGF-BB/PDGFR- β Play Important Roles in Promoting Immature and Inflammatory Intraplaque Angiogenesis. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0201395, doi:10.1371/journal.pone.0201395.
17. Ramchandani, D.; Mittal, V. Thrombospondin in Tumor Microenvironment. In *Tumor Microenvironment : Extracellular Matrix Components – Part B*; Birbrair, A., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 133–147 ISBN 978-3-030-48457-6.
18. Rodriguez-Manzaneque, J.C.; Lane, T.F.; Ortega, M.A.; Hynes, R.O.; Lawler, J.; Iruela-Arispe, M.L. Thrombospondin-1 Suppresses Spontaneous Tumor Growth and Inhibits Activation of Matrix Metalloproteinase-9 and Mobilization of Vascular Endothelial Growth Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 12485–12490, doi:10.1073/pnas.171460498.
19. Baylin, S.B.; Jones, P.A. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a019505, doi:10.1101/cshperspect.a019505.

20. Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27–36, doi:10.1093/carcin/bgp220.
21. Audia, J.E.; Campbell, R.M. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a019521, doi:10.1101/cshperspect.a019521.
22. Zhao, Z.; Shilatifard, A. Epigenetic Modifications of Histones in Cancer. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 245, doi:10.1186/s13059-019-1870-5.
23. Shalapour, S.; Karin, M. Pas de Deux: Control of Anti-Tumor Immunity by Cancer-Associated Inflammation. *Immunity* **2019**, *51*, 15–26, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.021.
24. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033, doi:10.1126/science.1160809.
25. Rawla, P.; Sunkara, T.; Muralidharan, P.; Raj, J.P. Update in Global Trends and Aetiology of Hepatocellular Carcinoma. *Współczesna Onkol.* **2018**, *22*, 141–150, doi:10.5114/wo.2018.78941.
26. Singal, A.G.; Lampertico, P.; Nahon, P. Epidemiology and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: New Trends. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 250–261, doi:10.1016/j.jhep.2019.08.025.
27. McGlynn, K.A.; Petrick, J.L.; El-Serag, H.B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **2021**, *73*, 4–13, doi:10.1002/hep.31288.
28. Tümen, D.; Heumann, P.; Gülow, K.; Demirci, C.-N.; Cosma, L.-S.; Müller, M.; Kandulski, A. Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3202, doi:10.3390/biomedicines10123202.
29. Yang, J.D.; Hainaut, P.; Gores, G.J.; Amadou, A.; Plymoth, A.; Roberts, L.R. A Global View of Hepatocellular Carcinoma: Trends, Risk, Prevention and Management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 589–604, doi:10.1038/s41575-019-0186-y.
30. Huang, D.Q.; El-Serag, H.B.; Loomba, R. Global Epidemiology of NAFLD-Related HCC: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 223–238, doi:10.1038/s41575-020-00381-6.
31. Ogunwobi, O.O.; Harricharran, T.; Huaman, J.; Galuza, A.; Odumuwagon, O.; Tan, Y.; Ma, G.X.; Nguyen, M.T. Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma Progression. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 2279–2293, doi:10.3748/wjg.v25.i19.2279.
32. Parkin, D.M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. Estimating the World Cancer Burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* **2001**, *94*, 153–156, doi:10.1002/ijc.1440.
33. Schlosser, S.; Tümen, D.; Volz, B.; Neumeyer, K.; Egler, N.; Kunst, C.; Tews, H.C.; Schmid, S.; Kandulski, A.; Müller, M.; et al. HCC Biomarkers – State of the Old and Outlook to Future Promising Biomarkers and Their Potential in Everyday Clinical Practice. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1016952, doi:10.3389/fonc.2022.1016952.
34. Akinyemiju, T.; Abera, S.; Ahmed, M.; Alam, N.; Alemayohu, M.A.; Allen, C.; Al-Raddadi, R.; Alvis-Guzman, N.; Amoako, Y.; Artaman, A.; et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 1683–1691, doi:10.1001/jamaoncol.2017.3055.
35. Motalebzadeh, J.; Eskandari, E. Transcription Factors Linked to the Molecular Signatures in the Development of Hepatocellular Carcinoma on a Cirrhotic Background. *Med. Oncol.* **2021**, *38*, 121, doi:10.1007/s12032-021-01567-x.
36. Reig, M.; Forner, A.; Rimola, J.; Ferrer-Fàbrega, J.; Burrel, M.; Garcia-Criado, Á.; Kelley, R.K.; Galle, P.R.; Mazzaferro, V.; Salem, R.; et al. BCLC Strategy for Prognosis Prediction and Treatment Recommendation: The 2022 Update. *J. Hepatol.* **2022**, *76*, 681–693, doi:10.1016/j.jhep.2021.11.018.
37. Langer, T. Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome. **2023**.
38. Llovet, J.M.; Montal, R.; Sia, D.; Finn, R.S. Molecular Therapies and Precision Medicine for Hepatocellular Carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 599–616, doi:10.1038/s41571-018-0073-4.

39. Schuster, A.; Schilling, T.; De Laurenzi, V.; Koch, A.F.; Seitz, S.; Staib, F.; Teufel, A.; Thorgeirsson, S.S.; Galle, P.; Melino, G.; et al. $\Delta Np73\beta$ Is Oncogenic in Hepatocellular Carcinoma by Blocking Apoptosis Signaling via Death Receptors and Mitochondria. *Cell Cycle Georget. Tex* **2010**, *9*, 2629–2639, doi:10.4161/cc.9.13.12110.
40. Müller, M.; Schilling, T.; Sayan, A.E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H.; Oren, M.; Koch, A.; Tannapfel, A.; Stremmel, W.; et al. TAp73/ $\Delta Np73$ Influences Apoptotic Response, Chemosensitivity and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 1564–1577, doi:10.1038/sj.cdd.4401774.
41. Müller, M.; Schleithoff, E.S.; Stremmel, W.; Melino, G.; Krammer, P.H.; Schilling, T. One, Two, Three—P53, P63, P73 and Chemosensitivity. *Drug Resist. Updat.* **2006**, *9*, 288–306, doi:10.1016/j.drup.2007.01.001.
42. Mundt, H.M.; Stremmel, W.; Melino, G.; Krammer, P.H.; Schilling, T.; Müller, M. Dominant Negative (ΔN) P63 α Induces Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma by Interference with Apoptosis Signaling Pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 335–341, doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.093.
43. Pflaum, J.; Schlosser, S.; Müller, M. P53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*.
44. Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal Cancer. *The Lancet* **2019**, *394*, 1467–1480, doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
45. Arnold, M.; Sierra, M.S.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Patterns and Trends in Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Gut* **2017**, *66*, 683–691, doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
46. Simon, K. Colorectal Cancer Development and Advances in Screening. *Clin. Interv. Aging* **2016**, *11*, 967–976, doi:10.2147/CIA.S109285.
47. Hossain, M.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kibria, K.M.K.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.; et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* **2022**, *14*, 1732, doi:10.3390/cancers14071732.
48. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. **2019**.
49. Blondy, S.; David, V.; Verdier, M.; Mathonnet, M.; Perraud, A.; Christou, N. 5-Fluorouracil Resistance Mechanisms in Colorectal Cancer: From Classical Pathways to Promising Processes. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 3142–3154, doi:10.1111/cas.14532.
50. Marin, J.J.G.; Macias, R.I.R.; Monte, M.J.; Romero, M.R.; Asensio, M.; Sanchez-Martin, A.; Cives-Losada, C.; Temprano, A.G.; Espinosa-Escudero, R.; Reviejo, M.; et al. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2020**, *12*, 1663, doi:10.3390/cancers12061663.
51. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
52. Castaneda, M.; den Hollander, P.; Kuburich, N.A.; Rosen, J.M.; Mani, S.A. Mechanisms of Cancer Metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *87*, 17–31, doi:10.1016/j.semcancer.2022.10.006.
53. Vandenabeele, P.; Bultynck, G.; Savvides, S.N. Pore-Forming Proteins as Drivers of Membrane Permeabilization in Cell Death Pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, doi:10.1038/s41580-022-00564-w.
54. Dadsena, S.; King, L.E.; García-Sáez, A.J. Apoptosis Regulation at the Mitochondria Membrane Level. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2021**, *1863*, 183716, doi:10.1016/j.bbamem.2021.183716.
55. Adams, J.M.; Cory, S. The BCL-2 Arbiters of Apoptosis and Their Growing Role as Cancer Targets. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 27–36, doi:10.1038/cdd.2017.161.

56. Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P.H. Death Receptor Signaling. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 265–267, doi:10.1242/jcs.01610.
57. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 395–417, doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
58. Schweckendiek, W. [Treatment of psoriasis vulgaris]. *Med. Monatsschr.* **1959**, *13*, 103–104.
59. Majkutewicz, I. Dimethyl Fumarate: A Review of Preclinical Efficacy in Models of Neurodegenerative Diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **2022**, *926*, 175025, doi:10.1016/j.ejphar.2022.175025.
60. Gold, R.; Linker, R.A.; Stangel, M. Fumaric Acid and Its Esters: An Emerging Treatment for Multiple Sclerosis with Antioxidative Mechanism of Action. *Clin. Immunol.* **2012**, *142*, 44–48, doi:10.1016/j.clim.2011.02.017.
61. Warny, M.; Helby, J.; Nordestgaard, B.G.; Birgens, H.; Bojesen, S.E. Lymphopenia and Risk of Infection and Infection-Related Death in 98,344 Individuals from a Prospective Danish Population-Based Study. *PLOS Med.* **2018**, *15*, e1002685, doi:10.1371/journal.pmed.1002685.
62. Nicolay, J. *Phase IIA Study on Therapy With the NF- κ B Inhibiting and Apoptosis Inducing Drug Dimethylfumarate (DMF) in Patients With Cutaneous T Cell Lymphoma (CTCL)*; clinicaltrials.gov/NCT02546440, 2023;
63. Kavian, N.; Mehlal, S.; Jeljeli, M.; Saidu, N.E.B.; Nicco, C.; Cerles, O.; Chouzenoux, S.; Cauvet, A.; Camus, C.; Ait-Djoudi, M.; et al. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. *Front. Immunol.* **2018**, *9*.
64. Toyama, T.; Looney, A.P.; Baker, B.M.; Stawski, L.; Haines, P.; Simms, R.; Szymaniak, A.D.; Varelas, X.; Trojanowska, M. Therapeutic Targeting of TAZ and YAP by Dimethyl Fumarate in Systemic Sclerosis Fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 78–88, doi:10.1016/j.jid.2017.08.024.
65. Liu, X.; Zhou, W.; Zhang, X.; Lu, P.; Du, Q.; Tao, L.; Ding, Y.; Wang, Y.; Hu, R. Dimethyl Fumarate Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Experimental Colitis by Activating Nrf2 and Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *112*, 37–49, doi:10.1016/j.bcp.2016.05.002.
66. Biogen, *The Effect of Tecfidera® (Dimethyl Fumarate, BG00012) on the Gut Microbiota as a Causal Factor for Gastro Intestinal Associated Adverse Events.*; clinicaltrials.gov/NCT02471560, 2021;
67. University Hospital, Bordeaux, *Preliminary Study of the Quality of the Oral Flora in Parkinson's Patients*; clinicaltrials.gov/NCT03827551, 2021;
68. Virginia Commonwealth University, *Phase I Trial of Dimethyl Fumarate, Temozolomide, and Radiation Therapy in Glioblastoma Multiforme*; clinicaltrials.gov/NCT02337426, 2019;
69. MS, T.J.B., MD, *A Randomized Clinical Trial of Dimethyl Fumarate as a Novel Therapeutic Agent for Obstructive Sleep Apnea*; clinicaltrials.gov/NCT02438137, 2017;
70. Biogen, *A Phase 2a, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Study to Evaluate the Efficacy, Safety and Tolerability of BG00012 When Given With Methotrexate to Subjects With Active RA Who Have Had an Inadequate Response to Conventional Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug Therapy*; clinicaltrials.gov/NCT00810836, 2013;
71. Yamazaki, H.; Tanji, K.; Wakabayashi, K.; Matsuura, S.; Itoh, K. Role of the Keap1/Nrf2 Pathway in Neurodegenerative Diseases: Nrf2 and Neurodegenerative Diseases. *Pathol. Int.* **2015**, *65*, 210–219, doi:10.1111/pin.12261.
72. Kastrati, I.; Siklos, M.I.; Calderon-Gierszal, E.L.; El-Shennawy, L.; Georgieva, G.; Thayer, E.N.; Thatcher, G.R.J.; Frasor, J. Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of P65 Protein *. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 3639–3647, doi:10.1074/jbc.M115.679704.
73. Kornberg, M.D.; Bhargava, P.; Kim, P.M.; Putluri, V.; Snowman, A.M.; Putluri, N.; Calabresi, P.A.; Snyder, S.H. Dimethyl Fumarate Targets GAPDH and Aerobic Glycolysis to Modulate Immunity. *Science* **2018**, *360*, 449–453, doi:10.1126/science.aan4665.

74. Park, J.B.; Park, H.; Son, J.; Ha, S.-J.; Cho, H.-S. Structural Study of Monomethyl Fumarate-Bound Human GAPDH. *Mol. Cells* **2019**, *42*, 597–603, doi:10.14348/molcells.2019.0114.
75. Schroeder, A.; Warnken, U.; Röth, D.; Klika, K.D.; Vobis, D.; Barnert, A.; Bujupi, F.; Oberacker, T.; Schnölzer, M.; Nicolay, J.P.; et al. Targeting Thioredoxin-1 by Dimethyl Fumarate Induces Ripoptosome-Mediated Cell Death. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43168, doi:10.1038/srep43168.
76. Nicolay, J.P.; Müller-Decker, K.; Schroeder, A.; Brechmann, M.; Möbs, M.; Géraud, C.; Assaf, C.; Goerdts, S.; Krammer, P.H.; Gülow, K. Dimethyl Fumarate Restores Apoptosis Sensitivity and Inhibits Tumor Growth and Metastasis in CTCL by Targeting NF- κ B. *Blood* **2016**, *128*, 805–815, doi:10.1182/blood-2016-01-694117.
77. Kiessling, M.K.; Klemke, C.D.; Kamiński, M.M.; Galani, I.E.; Krammer, P.H.; Gülow, K. Inhibition of Constitutively Activated Nuclear Factor- κ B Induces Reactive Oxygen Species- and Iron-Dependent Cell Death in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2365–2374, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3221.
78. Froehlich, T.C.; Müller-Decker, K.; Braun, J.D.; Albrecht, T.; Schroeder, A.; Gülow, K.; Goerdts, S.; Krammer, P.H.; Nicolay, J.P. Combined Inhibition of Bcl-2 and NF κ B Synergistically Induces Cell Death in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Blood* **2019**, *134*, 445–455, doi:10.1182/blood.2019001545.
79. Maji, S.; Panda, S.; Samal, S.K.; Shriwas, O.; Rath, R.; Pellicchia, M.; Emdad, L.; Das, S.K.; Fisher, P.B.; Dash, R. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2018; Vol. 137, pp. 37–75 ISBN 978-0-12-815123-5.
80. Souers, A.J.; Levenson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J.; Dayton, B.D.; Ding, H.; Enschede, S.H.; Fairbrother, W.J.; et al. ABT-199, a Potent and Selective BCL-2 Inhibitor, Achieves Antitumor Activity While Sparing Platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202–208, doi:10.1038/nm.3048.
81. Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A.L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G.L.; Gong, J.-N.; Moujalled, D.M.; et al. The MCL1 Inhibitor S63845 Is Tolerable and Effective in Diverse Cancer Models. *Nature* **2016**, *538*, 477–482, doi:10.1038/nature19830.
82. Hafezi, S.; Rahmani, M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. *Cancers* **2021**, *13*, 1292, doi:10.3390/cancers13061292.
83. EMA Venclxyto Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/venclxyto> (accessed on 8 May 2023).
84. Lasica, M.; Anderson, M.A. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 463, doi:10.3390/jpm11060463.
85. Bose, P.; Gandhi, V.; Konopleva, M. Pathways and Mechanisms of Venetoclax Resistance. *Leuk. Lymphoma* **2017**, *58*, 2026–2039, doi:10.1080/10428194.2017.1283032.
86. Tahir, S.K.; Smith, M.L.; Hessler, P.; Rapp, L.R.; Idler, K.B.; Park, C.H.; Levenson, J.D.; Lam, L.T. Potential Mechanisms of Resistance to Venetoclax and Strategies to Circumvent It. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 399, doi:10.1186/s12885-017-3383-5.
87. Diepstraten, S.T.; Anderson, M.A.; Czabotar, P.E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Kelly, G.L. The Manipulation of Apoptosis for Cancer Therapy Using BH3-Mimetic Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2022**, *22*, 45–64, doi:10.1038/s41568-021-00407-4.
88. Townsend, P.A.; Kozhevnikova, M.V.; Cexus, O.N.F.; Zamyatnin, A.A.; Soond, S.M. BH3-Mimetics: Recent Developments in Cancer Therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2021**, *40*, 355, doi:10.1186/s13046-021-02157-5.
89. Deeks, E.D. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76*, 979–987, doi:10.1007/s40265-016-0596-x.
90. Research, C. for D.E. and FDA Approves Venetoclax in Combination for AML in Adults. *FDA* **2019**.
91. Mott, J.L.; Gores, G.J. Piercing the Armor of Hepatobiliary Cancer: Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3) Mimetics and Cell Death. *Hepatology* **2007**, *46*, 906–911, doi:10.1002/hep.21812.

92. Hikita, H.; Takehara, T.; Shimizu, S.; Kodama, T.; Shigekawa, M.; Iwase, K.; Hosui, A.; Miyagi, T.; Tatsumi, T.; Ishida, H.; et al. The Bcl-xL Inhibitor, ABT-737, Efficiently Induces Apoptosis and Suppresses Growth of Hepatoma Cells in Combination with Sorafenib. *Hepatol. Baltim. Md* **2010**, *52*, 1310–1321, doi:10.1002/hep.23836.
93. Zhu, H.; Yang, W.; He, L.; Ding, W.; Zheng, L.; Liao, S.; Huang, P.; Lu, W.; He, Q.; Yang, B. Upregulating Noxa by ER Stress, Celastrol Exerts Synergistic Anti-Cancer Activity in Combination with ABT-737 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e52333, doi:10.1371/journal.pone.0052333.
94. Fleischer, B.; Schulze-Bergkamen, H.; Schuchmann, M.; Weber, A.; Biesterfeld, S.; Müller, M.; Krammer, P.; Galle, P. Mcl-1 Is an Anti-Apoptotic Factor for Human Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2006**, doi:10.3892/ijo.28.1.25.
95. Wang, H.; Guo, M.; Wei, H.; Chen, Y. Targeting MCL-1 in Cancer: Current Status and Perspectives. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2021**, *14*, 67, doi:10.1186/s13045-021-01079-1.
96. Michels, J.; Obrist, F.; Vitale, I.; Lissa, D.; Garcia, P.; Behnam-Motlagh, P.; Kohno, K.; Wu, G.S.; Brenner, C.; Castedo, M.; et al. MCL-1 Dependency of Cisplatin-Resistant Cancer Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *92*, 55–61, doi:10.1016/j.bcp.2014.07.029.
97. Institut de Recherches Internationales Servier *An International Phase Ib Multicentre Study to Characterize the Safety and Tolerability of Intravenously Administered S64315, a Selective Mcl-1 Inhibitor, in Combination With Orally Administered Venetoclax, a Selective Bcl-2 Inhibitor in Patients With Acute Myeloid Leukaemia (AML).*; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03672695>, 2023;
98. Mukherjee, N.; Amato, C.M.; Skees, J.; Todd, K.J.; Lambert, K.A.; Robinson, W.A.; Van Gulick, R.; Weight, R.M.; Dart, C.R.; Tobin, R.P.; et al. Simultaneously Inhibiting BCL2 and MCL1 Is a Therapeutic Option for Patients with Advanced Melanoma. *Cancers* **2020**, *12*, 2182, doi:10.3390/cancers12082182.
99. Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681, doi:10.1124/pr.58.3.10.
100. Xie, X.; Zhao, Y.; Ma, C.-Y.; Xu, X.-M.; Zhang, Y.-Q.; Wang, C.-G.; Jin, J.; Shen, X.; Gao, J.-L.; Li, N.; et al. Dimethyl Fumarate Induces Necroptosis in Colon Cancer Cells through GSH Depletion/ROS Increase/MAPKs Activation Pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 3929–3943, doi:10.1111/bph.13184.
101. Takeda, T.; Tsubaki, M.; Asano, R.; Itoh, T.; Imano, M.; Satou, T.; Nishida, S. Dimethyl Fumarate Suppresses Metastasis and Growth of Melanoma Cells by Inhibiting the Nuclear Translocation of NF- κ B. *J. Dermatol. Sci.* **2020**, *99*, 168–176, doi:10.1016/j.jdermsci.2020.07.004.
102. Liu, H.; Feng, X.-D.; Yang, B.; Tong, R.-L.; Lu, Y.-J.; Chen, D.-Y.; Zhou, L.; Xie, H.-Y.; Zheng, S.-S.; Wu, J. Dimethyl Fumarate Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression via Activating SOCS3/JAK1/STAT3 Signaling Pathway. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 4713–4725.
103. García-Ledo, L.; Nuevo-Tapióles, C.; Cuevas-Martín, C.; Martínez-Reyes, I.; Soldevilla, B.; González-Llorente, L.; Cuezva, J.M. Overexpression of the ATPase Inhibitory Factor 1 Favors a Non-Metastatic Phenotype in Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, *7*.
104. Barnum, K.J.; O’Connell, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In *Cell Cycle Control*; Noguchi, E., Gadaleta, M.C., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2014; Vol. 1170, pp. 29–40 ISBN 978-1-4939-0887-5.
105. Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559–1564, doi:10.1126/science.1203543.
106. Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; van Schie, R.C.; LaFace, D.M.; Green, D.R. Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1556, doi:10.1084/jem.182.5.1545.

107. Kaminski, M.; Kiessling, M.; Süß, D.; Krammer, P.H.; Gülow, K. Novel Role for Mitochondria: Protein Kinase C θ -Dependent Oxidative Signaling Organelles in Activation-Induced T-Cell Death. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 3625–3639, doi:10.1128/MCB.02295-06.
108. Michalski, M.; Bauer, M.; Walz, F.; Tümen, D.; Heumann, P.; Stöckert, P.; Gunckel, M.; Kunst, C.; Kandulski, A.; Schmid, S.; et al. Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1666, doi:10.3390/biomedicines11061666.
109. Yasu, T.; Gando, Y.; Nomura, Y.; Kosugi, N.; Kobayashi, M. Determination of Venetoclax Concentration in Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **2022**, bmac027, doi:10.1093/chromsci/bmac027.
110. Rodriguez, J.; Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 Form an Active Holoenzyme. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 3179–3184, doi:10.1101/gad.13.24.3179.
111. Silke, J.; Meier, P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins—Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a008730, doi:10.1101/cshperspect.a008730.
112. Julien, O.; Wells, J.A. Caspases and Their Substrates. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1380–1389, doi:10.1038/cdd.2017.44.
113. Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N.E.; Poirier, G.G. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3976–3985.
114. Fischer, U.; Jänicke, R.U.; Schulze-Osthoff, K. Many Cuts to Ruin: A Comprehensive Update of Caspase Substrates. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 76–100, doi:10.1038/sj.cdd.4401160.
115. Carethers, J.M. Review: Systemic Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Tailoring Therapy to the Tumor. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2008**, *1*, 33–42, doi:10.1177/1756283X08093607.
116. Zhang, J.T.; Zhou, W.L.; He, C.; Liu, T.; Li, C.Y.; Wang, L. 5-Fluorouracil Induces Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Genet. Mol. Res. GMR* **2016**, *15*, 15017326, doi:10.4238/gmr.15017326.
117. Llovet, J.M.; Kelley, R.K.; Villanueva, A.; Singal, A.G.; Pikarsky, E.; Roayaie, S.; Lencioni, R.; Koike, K.; Zucman-Rossi, J.; Finn, R.S. Hepatocellular Carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2021**, *7*, 6, doi:10.1038/s41572-020-00240-3.
118. Galle, P.R.; Forner, A.; Llovet, J.M.; Mazzaferro, V.; Piscaglia, F.; Raoul, J.-L.; Schirmacher, P.; Vilgrain, V. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 182–236, doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019.
119. Yau, T.; Park, J.W.; Finn, R.S.; Cheng, A.-L.; Mathurin, P.; Edeline, J.; Kudo, M.; Han, K.-H.; Harding, J.J.; Merle, P.; et al. CheckMate 459: A Randomized, Multi-Center Phase III Study of Nivolumab (NIVO) vs Sorafenib (SOR) as First-Line (1L) Treatment in Patients (Pts) with Advanced Hepatocellular Carcinoma (aHCC). *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, v874–v875, doi:10.1093/annonc/mdz394.029.
120. Zucman-Rossi, J.; Villanueva, A.; Nault, J.-C.; Llovet, J.M. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 1226–1239.e4, doi:10.1053/j.gastro.2015.05.061.
121. Zhu, Y.; Zheng, B.; Wang, H.; Chen, L. New Knowledge of the Mechanisms of Sorafenib Resistance in Liver Cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 614–622, doi:10.1038/aps.2017.5.
122. Cheng, Z.; Wei-Qi, J.; Jin, D. New Insights on Sorafenib Resistance in Liver Cancer with Correlation of Individualized Therapy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2020**, *1874*, 188382, doi:10.1016/j.bbcan.2020.188382.
123. Kudo, M.; Finn, R.S.; Qin, S.; Han, K.-H.; Ikeda, K.; Piscaglia, F.; Baron, A.; Park, J.-W.; Han, G.; Jassem, J.; et al. Lenvatinib versus Sorafenib in First-Line Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial. *Lancet Lond. Engl.* **2018**, *391*, 1163–1173, doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
124. Finn, R.S.; Kudo, M.; Merle, P.; Meyer, T.; Qin, S.; Ikeda, M.; Xu, R.; Edeline, J.; Ryoo, B.-Y.; Ren, Z.; et al. LBA34 Primary Results from the Phase III LEAP-002 Study: Lenvatinib plus

- Pembrolizumab versus Lenvatinib as First-Line (1L) Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma (aHCC). *Ann. Oncol.* **2022**, *33*, S1401, doi:10.1016/j.annonc.2022.08.031.
125. Finn, R.S.; Qin, S.; Ikeda, M.; Galle, P.R.; Ducreux, M.; Kim, T.-Y.; Kudo, M.; Breder, V.; Merle, P.; Kaseb, A.O.; et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1894–1905, doi:10.1056/NEJMoa1915745.
 126. Cheng, A.-L.; Qin, S.; Ikeda, M.; Galle, P.R.; Ducreux, M.; Kim, T.-Y.; Lim, H.Y.; Kudo, M.; Breder, V.; Merle, P.; et al. Updated Efficacy and Safety Data from IMbrave150: Atezolizumab plus Bevacizumab vs. Sorafenib for Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J. Hepatol.* **2022**, *76*, 862–873, doi:10.1016/j.jhep.2021.11.030.
 127. Abou-Alfa, G.K.; Lau, G.; Kudo, M.; Chan, S.L.; Kelley, R.K.; Furuse, J.; Sukeepaisarnjaroen, W.; Kang, Y.-K.; Van Dao, T.; De Toni, E.N.; et al. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evid.* **2022**, *1*, EVIDoA2100070, doi:10.1056/EVIDoA2100070.
 128. Kelley, R.K.; Sangro, B.; Harris, W.; Ikeda, M.; Okusaka, T.; Kang, Y.-K.; Qin, S.; Tai, D.W.-M.; Lim, H.Y.; Yau, T.; et al. Safety, Efficacy, and Pharmacodynamics of Tremelimumab Plus Durvalumab for Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Randomized Expansion of a Phase I/II Study. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 2991–3001, doi:10.1200/JCO.20.03555.
 129. Qin, S.; Chan, S.L.; Gu, S.; Bai, Y.; Ren, Z.; Lin, X.; Chen, Z.; Jia, W.; Jin, Y.; Guo, Y.; et al. Camrelizumab plus Rivoceranib versus Sorafenib as First-Line Therapy for Unresectable Hepatocellular Carcinoma (CARES-310): A Randomised, Open-Label, International Phase 3 Study. *Lancet Lond. Engl.* **2023**, *402*, 1133–1146, doi:10.1016/S0140-6736(23)00961-3.
 130. Fiorillo, M.; Ózsvári, B.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. High ATP Production Fuels Cancer Drug Resistance and Metastasis: Implications for Mitochondrial ATP Depletion Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*.
 131. Fiorillo, M.; Scatena, C.; Naccarato, A.G.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Bedaquiline, an FDA-Approved Drug, Inhibits Mitochondrial ATP Production and Metastasis in Vivo, by Targeting the Gamma Subunit (ATP5F1C) of the ATP Synthase. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 2797–2817, doi:10.1038/s41418-021-00788-x.
 132. Kastl, L.; Sauer, S.W.; Ruppert, T.; Beissbarth, T.; Becker, M.S.; Süß, D.; Krammer, P.H.; Gülow, K. TNF- α Mediates Mitochondrial Uncoupling and Enhances ROS-Dependent Cell Migration via NF- κ B Activation in Liver Cells. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 175–183, doi:10.1016/j.febslet.2013.11.033.
 133. Schmitt, A.; Xu, W.; Bucher, P.; Grimm, M.; Konantz, M.; Horn, H.; Zapukhlyak, M.; Berning, P.; Brändle, M.; Jarbou, M.-A.; et al. Dimethyl Fumarate Induces Ferroptosis and Impairs NF- κ B/STAT3 Signaling in DLBCL. *Blood* **2021**, *138*, 871–884, doi:10.1182/blood.2020009404.
 134. Kaluzki, I.; Hailemariam-Jahn, T.; Doll, M.; Kaufmann, R.; Balermipas, P.; Zöllner, N.; Kippenberger, S.; Meissner, M. Dimethylfumarate Inhibits Colorectal Carcinoma Cell Proliferation: Evidence for Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy. *Cells* **2019**, *8*, 1329, doi:10.3390/cells8111329.
 135. Calonge, T.M.; O’Connell, M.J. Turning off the G2 DNA Damage Checkpoint. *DNA Repair* **2008**, *7*, 136–140, doi:10.1016/j.dnarep.2007.07.017.
 136. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.
 137. Cuddihy, A.R.; O’Connell, M.J.; CancerInstitute, P. Cell-Cycle Responses to DNA Damage in G2.
 138. Yam, C.Q.X.; Lim, H.H.; Surana, U. DNA Damage Checkpoint Execution and the Rules of Its Disengagement. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*.
 139. Tsurushima, K.; Tsubaki, M.; Takeda, T.; Matsuda, T.; Kimura, A.; Takefuji, H.; Okada, A.; Sakamoto, C.; Ishizaka, T.; Nishida, S. Dimethyl Fumarate Induces Apoptosis via Inhibition of NF- κ B and Enhances the Effect of Paclitaxel and Adriamycin in Human TNBC Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8681, doi:10.3390/ijms23158681.
 140. Yan, H.; Zou, T.; Tuo, Q.; Xu, S.; Li, H.; Belaidi, A.A.; Lei, P. Ferroptosis: Mechanisms and Links with Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, doi:10.1038/s41392-020-00428-9.

141. Li, J.; Cao, F.; Yin, H.; Huang, Z.; Lin, Z.; Mao, N.; Sun, B.; Wang, G. Ferroptosis: Past, Present and Future. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 88, doi:10.1038/s41419-020-2298-2.
142. Tang, D.; Chen, X.; Kang, R.; Kroemer, G. Ferroptosis: Molecular Mechanisms and Health Implications. *Cell Res.* **2021**, *31*, 107–125, doi:10.1038/s41422-020-00441-1.
143. Hansen, E.L.; Sozer, E.B.; Romeo, S.; Frandsen, S.K.; Vernier, P.T.; Gehl, J. Dose-Dependent ATP Depletion and Cancer Cell Death Following Calcium Electroporation, Relative Effect of Calcium Concentration and Electric Field Strength. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0122973, doi:10.1371/journal.pone.0122973.
144. Deng, Q.; Yu, X.; Xiao, L.; Hu, Z.; Luo, X.; Tao, Y.; Yang, L.; Liu, X.; Chen, H.; Ding, Z.; et al. Neolbaconol Induces Energy Depletion and Multiple Cell Death in Cancer Cells by Targeting PDK1-PI3-K/Akt Signaling Pathway. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e804–e804, doi:10.1038/cddis.2013.324.
145. Fares, J.; Fares, M.Y.; Khachfe, H.H.; Salhab, H.A.; Fares, Y. Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 28, doi:10.1038/s41392-020-0134-x.
146. Biogen Efficacy and Safety Study of BG00012 With Methotrexate in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: NCT00810836, 109RA201 Available online: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00810836>.
147. LEO Pharma *A Phase 4 Trial Comparing the Efficacy of Subcutaneous Injections of Brodalumab to Oral Administrations of Fumaric Acid Esters in Adults With Moderate to Severe Plaque Psoriasis*; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03331835>, 2020;
148. Xuanwu Hospital, Beijing *Combination of the Immune Modulator Dimethyl Fumarate With Alteplase in Acute Ischemic Stroke*; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04890366>, 2022;
149. Institute (NCI), V.C.U.C. Dimethyl Fumarate, Temozolomide, and Radiation Therapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: NCT02337426, MCC-13-09950|NCI-2014-02619|HM20003022|P30CA016059 Available online: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02337426>.
150. Soderquist, R.S.; Crawford, L.; Liu, E.; Lu, M.; Agarwal, A.; Anderson, G.R.; Lin, K.H.; Winter, P.S.; Cakir, M.; Wood, K.C. Systematic Mapping of BCL-2 Gene Dependencies in Cancer Reveals Molecular Determinants of BH3 Mimetic Sensitivity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3513, doi:10.1038/s41467-018-05815-z.
151. Certo, M.; Moore, V.D.G.; Nishino, M.; Wei, G.; Korsmeyer, S.; Armstrong, S.A.; Letai, A. Mitochondria Primed by Death Signals Determine Cellular Addiction to Antiapoptotic BCL-2 Family Members. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 351–365, doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027.
152. Sieghart, W.; Losert, D.; Strommer, S.; Cejka, D.; Schmid, K.; Rasoul-Rockenschaub, S.; Bodingbauer, M.; Crevenna, R.; Monia, B.P.; Peck-Radosavljevic, M.; et al. Mcl-1 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma: A Potential Target for Antisense Therapy. *J. Hepatol.* **2006**, *44*, 151–157, doi:10.1016/j.jhep.2005.09.010.
153. Tutusaus, A.; Stefanovic, M.; Boix, L.; Cucarull, B.; Zamora, A.; Blasco, L.; de Frutos, P.G.; Reig, M.; Fernandez-Checa, J.C.; Marí, M.; et al. Antiapoptotic BCL-2 Proteins Determine Sorafenib/Regorafenib Resistance and BH3-Mimetic Efficacy in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 16701–16717, doi:10.18632/oncotarget.24673.
154. Touzeau, C.; Ryan, J.; Guerriero, J.; Moreau, P.; Chonghaile, T.N.; Le Gouill, S.; Richardson, P.; Anderson, K.; Amiot, M.; Letai, A. BH3 Profiling Identifies Heterogeneous Dependency on Bcl-2 Family Members in Multiple Myeloma and Predicts Sensitivity to BH3 Mimetics. *Leukemia* **2016**, *30*, 761–764, doi:10.1038/leu.2015.184.
155. Watanabe, J.; Kushihata, F.; Honda, K.; Sugita, A.; Tateishi, N.; Mominoki, K.; Matsuda, S.; Kobayashi, N. Prognostic Significance of Bcl-xL in Human Hepatocellular Carcinoma. *Surgery* **2004**, *135*, 604–612, doi:10.1016/j.surg.2003.11.015.
156. Chao, D. BCL-XL-Regulated Apoptosis in T Cell Development. *Int. Immunol.* **1997**, *9*, 1375–1384, doi:10.1093/intimm/9.9.1375.

157. Wilson, W.H.; O'Connor, O.A.; Czuczman, M.S.; LaCasce, A.S.; Gerecitano, J.F.; Leonard, J.P.; Tulpule, A.; Dunleavy, K.; Xiong, H.; Chiu, Y.-L.; et al. Navitoclax, a Targeted High-Affinity Inhibitor of BCL-2, in Lymphoid Malignancies: A Phase 1 Dose-Escalation Study of Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antitumour Activity. *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 1149–1159, doi:10.1016/S1470-2045(10)70261-8.
158. Roberts, A.W.; Davids, M.S.; Pagel, J.M.; Kahl, B.S.; Puvvada, S.D.; Gerecitano, J.F.; Kipps, T.J.; Anderson, M.A.; Brown, J.R.; Gressick, L.; et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 311–322, doi:10.1056/NEJMoa1513257.
159. Akgul, C. Mcl-1 Is a Potential Therapeutic Target in Multiple Types of Cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1326–1336, doi:10.1007/s00018-008-8637-6.
160. Beroukhi, R.; Mermel, C.H.; Porter, D.; Wei, G.; Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J.S.; Dobson, J.; Urashima, M.; et al. The Landscape of Somatic Copy-Number Alteration across Human Cancers. *Nature* **2010**, *463*, 899–905, doi:10.1038/nature08822.
161. Glaser, S.P.; Lee, E.F.; Trounson, E.; Bouillet, P.; Wei, A.; Fairlie, W.D.; Izon, D.J.; Zuber, J.; Rappaport, A.R.; Herold, M.J.; et al. Anti-Apoptotic Mcl-1 Is Essential for the Development and Sustained Growth of Acute Myeloid Leukemia. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 120–125, doi:10.1101/gad.182980.111.
162. 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.; et al. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1566–1581, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0140.
163. Institut de Recherches Internationales Servier *An International Phase Ib Multicentre Study to Characterize the Safety and Tolerability of Intravenously Administered S64315, a Selective Mcl-1 Inhibitor, in Combination With Orally Administered Venetoclax, a Selective Bcl-2 Inhibitor in Patients With Acute Myeloid Leukaemia (AML)*; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03672695>, 2022;
164. Li, Z.; He, S.; Look, A.T. The MCL1-Specific Inhibitor S63845 Acts Synergistically with Venetoclax/ABT-199 to Induce Apoptosis in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Leukemia* **2019**, *33*, 262–266, doi:10.1038/s41375-018-0201-2.
165. Seiller, C.; Maiga, S.; Touzeau, C.; Bellanger, C.; Kervoëlen, C.; Descamps, G.; Maillet, L.; Moreau, P.; Pellat-Deceunynck, C.; Gomez-Bougie, P.; et al. Dual Targeting of BCL2 and MCL1 Rescues Myeloma Cells Resistant to BCL2 and MCL1 Inhibitors Associated with the Formation of BAX/BAK Hetero-Complexes. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 316, doi:10.1038/s41419-020-2505-1.
166. Anderson, M.A.; Deng, J.; Seymour, J.F.; Tam, C.; Kim, S.Y.; Fein, J.; Yu, L.; Brown, J.R.; Westerman, D.; Si, E.G.; et al. The BCL2 Selective Inhibitor Venetoclax Induces Rapid Onset Apoptosis of CLL Cells in Patients via a TP53-Independent Mechanism. *Blood* **2016**, *127*, 3215–3224, doi:10.1182/blood-2016-01-688796.
167. Tam, C.S.; Anderson, M.A.; Pott, C.; Agarwal, R.; Handunnetti, S.; Hicks, R.J.; Burbury, K.; Turner, G.; Di Iulio, J.; Bressel, M.; et al. Ibrutinib plus Venetoclax for the Treatment of Mantle-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1211–1223, doi:10.1056/NEJMoa1715519.
168. Long, J.; Wang, A.; Bai, Y.; Lin, J.; Yang, X.; Wang, D.; Yang, X.; Jiang, Y.; Zhao, H. Development and Validation of a TP53-Associated Immune Prognostic Model for Hepatocellular Carcinoma. *EBioMedicine* **2019**, *42*, 363–374, doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.022.
169. Basilotta, R.; Lanza, M.; Filippone, A.; Casili, G.; Mannino, D.; De Gaetano, F.; Chisari, G.; Colarossi, L.; Motta, G.; Campolo, M.; et al. Therapeutic Potential of Dimethyl Fumarate in Counteract Oral Squamous Cell Carcinoma Progression by Modulating Apoptosis, Oxidative Stress and Epithelial–Mesenchymal Transition. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2777, doi:10.3390/ijms24032777.

170. AbbVie A Phase 1 Study Evaluating the Safety and Pharmacokinetics of ABT-199 in Combination With Bendamustine/Rituximab (BR) in Subjects With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01594229>, 2021;
171. AbbVie A Phase 1b Study of ABT-199 (GDC-0199) in Combination With Azacitidine or Decitabine in Treatment-Naive Subjects With Acute Myelogenous Leukemia Who Are Greater Than or Equal to 60 Years of Age and Who Are Not Eligible for Standard Induction Therapy; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02203773>, 2023;
172. Peter MacCallum Cancer Centre, Australia A Phase 2 Study of ABT-199 in Combination With Ibrutinib in the Treatment of Patients With Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma (AIM Study); <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02471391>, 2023;
173. de Vos, S.; Swinnen, L.J.; Wang, D.; Reid, E.; Fowler, N.; Cordero, J.; Dunbar, M.; Enschede, S.H.; Nolan, C.; Petrich, A.M.; et al. Venetoclax, Bendamustine, and Rituximab in Patients with Relapsed or Refractory NHL: A Phase Ib Dose-Finding Study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2018**, *29*, 1932–1938, doi:10.1093/annonc/mdy256.
174. Roswell Park Cancer Institute Phase Ib/II Study of Enzalutamide With Venetoclax (ABT-199) in Patients With Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer (mCRPC); <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03751436>, 2022;
175. Novartis Pharmaceuticals A Phase Ib, Multicenter Study of VOB560 in Combination With MIK665 in Patients With Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma, Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia, or Relapsed/Refractory Multiple Myeloma.; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04702425>, 2023;
176. Institut de Recherches Internationales Servier Phase I/II, International, Multicentre, Open-Label, Non-Randomised, Non-Comparative, Study Evaluating the Safety, Tolerability and Clinical Activity of Intravenously Administered S64315, a Selective Mcl-1 Inhibitor, in Combination With Azacitidine in Patients With Acute Myeloid Leukaemia (AML); <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04629443>, 2023;
177. Singhal, R.; Mitta, S.R.; Das, N.K.; Kerk, S.A.; Sajjakulnukit, P.; Solanki, S.; Andren, A.; Kumar, R.; Olive, K.P.; Banerjee, R.; et al. HIF-2 α Activation Potentiates Oxidative Cell Death in Colorectal Cancers by Increasing Cellular Iron. *J. Clin. Invest.* *131*, e143691, doi:10.1172/JCI143691.
178. Galectin Therapeutics Inc. Open-Label, Phase 2 Study of GM-CT-01 When Added to a Regimen of Leucovorin, 5-FU, and Avastin as First Line Treatment for Locally Advanced, Unresectable or Metastatic Colorectal Cancer in Subjects Unable to Tolerate Intensive Chemotherapy; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00388700>, 2018;
179. Eli Lilly and Company A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study of Enzastaurin With 5-FU/LV Plus Bevacizumab as Maintenance Regimen Following First Line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00612586>, 2020;
180. Study of Oxaliplatin/5-FU/Leucovorin Plus Vatalanib Versus Oxaliplatin/5-FU/Leucovorin in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. - Full Text View - ClinicalTrials.Gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00056459> (accessed on 27 July 2023).

8 Selbständigkeitserklärung

Ich, Michalski, Marlen geboren am 16.03.1991 in Berlin, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater*innen oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martina Müller-Schilling für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in dem spannenden Forschungsfeld der Gastroenterologie zu verfassen. Außerdem möchte ich mich für die enorme Unterstützung bei den jährlichen Kolloquien bedanken, ohne dessen Input diese Arbeit nicht in dieser Form verfasst worden wäre. Durch Ihre Ermutigung zur zahlreichen Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen konnte ich weiterhin hilfreiches Feedback für mein Forschungsprojekt gewinnen. Es war eine einzigartige und besondere Erfahrung unter Ihrer Leitung meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Besonders danken möchte ich zudem PD Dr. Karsten Gülow, für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie das interessante Thema und die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ich habe deinen Input immer sehr geschätzt, ich habe unglaublich von deiner Erfahrung profitiert. Durch die Zusammenarbeit mit dir konnte ich wirklich viel dazulernen. Ich fand es einfach großartig, dass man wirklich immer das Gespräch mit dir suchen konnte und du dir immer alles angehört und zugehört hast. Ich glaube, ich hätte es mit meinem Doktorvater nicht besser treffen können.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Christian Schulz für seine Mentorentätigkeit während der Anfertigung meiner Dissertation besonderen Dank aussprechen. Ich konnte durch die anschließenden konstruktiven Diskussionen viel dazu lernen. Außerdem möchte ich Prof. Dr. Peter Oefner und Prof. Dr. Kathrin Renner-Sattler für die Unterstützung beim 4. Kolloquium und den daraus folgenden Input für meine Doktorarbeit danken.

Vielen, vielen Dank an das wundervolle und beste Laborteam aller Zeiten. Es war wirklich eine Freude, mit euch zu arbeiten und die kleinen und großen Erfolge zu feiern. Ich habe mich von Anfang an so herzlich aufgenommen bei euch gefühlt. Es war mir nicht klar, dass solche Arbeitsgruppen überhaupt existieren. Ich habe von euch so viel dazulernen können. Es ist einfach großartig, wie man von eurer Erfahrung lernen kann. Vielen Dank auch für euren

stetigen Rückhalt, den emotionalen Support und eure offenen Ohren, wenn es mal nicht so rund lief.

Liebe Lisa, du bist einfach unsere Labor-Mama, sowohl für die naturwissenschaftlichen als auch für die medizinischen Doktoranden. Ich bewundere deine Geduld, es ist so toll einen absoluten Ruhepol im Labor zu haben. Liebe Manu, liebe Olga, vielen Dank für die großartige experimentelle Unterstützung. Es macht einfach so einen wahnsinnigen Unterschied eine erfahrene technische Assistentin an seiner Seite zu haben. Vielen Dank Manu, dass du dich gerade am Ende meiner Arbeit so für mich eingesetzt hast. Das hätte ich selbst einfach nicht mehr geschafft. Deine Mitarbeit an dem Paper war wirklich ein Gewinn. Danke auch an Kirstin für die detaillierte Korrektur meines 4. Berichts und meiner Doktorarbeit, gerade in Bezug auf Rechtschreibung und Grammatik. Das hat mir einfach nochmal wahnsinnig viel Sicherheit gegeben.

Besonderen Dank gilt auch Magdalena Bauer und Franziska Walz. Es war eine Freude, euch bei eurer medizinischen Doktorarbeit zu unterstützen. Ohne euch wäre unser Paper nicht zustande gekommen.

Ein weiter Dank gilt ebenfalls PD Dr. Claudia Kunst, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und für ihren wertvollen Input über die gesamte Arbeitszeit hinweg. Ich betrachte es als großen Gewinn, dass du mich beim Anfertigen meiner Doktorarbeit unterstützt hast. Es ist einfach toll, dass du mit allen Leuten immer auf Augenhöhe kommunizierst.

Herzlichen Dank auch an Marika und Deniz. Die emotionale Unterstützung, die ich durch euch genossen habe, möchte ich wirklich nicht missen. Danke, dass ihr gemeinsam mit mir diese harte Zeit überstanden habt.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meinem Freund Matthias für die Geduld und Unterstützung seit Beginn meines Studiums bedanken. Ohne euch wäre es nicht möglich gewesen und ich hätte vieles nicht geschafft.

Herzlichen Dank!

10 Lebenslauf

<p>Marlen Michalski wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I Gastroenterologie, Endokrinologie, Rheumatologie und Infektiologie Universitätsklinikum Regensburg Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg Tel: + 49 941 944-17173 Fax: + 49 941 944-7123 Email: marlen.michalski@gmail.com</p>	
Werdegang	
Beruflicher Werdegang	2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I am Universitätsklinikums Regensburg
Studium	2010 – 2017 Studium der Biochemie und Molekularen Biologie an der Universität Bayreuth, Schwerpunkt Zellbiologie und Bioorganische Chemie
Titel Dissertation	2023 Untersuchungen zum Dimethylfumarat-induzierten Zelltod in soliden Tumoren und die Auswirkung von Fumarsäureestern auf die Migration maligner Zellen
Titel Masterarbeit	2017 Konvergente Festphasensynthese und Ligation von Glycopeptidthioestern des Proteoglycans Bikunin
Forschung	
Weiterbildung	2019 Versuchstierkunde und Tierschutz (FELASA B)
Forschungsschwerpunkte	Induktion von Zelltod durch Manipulation des Tumormetabolismus Einfluss des Tumormetabolismus auf die Metastasierung von Tumoren sowie die Charakterisierung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen
Stipendien	2019 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2019 Reisestipendium der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern 2022 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
Außerberufliches Engagement	
Ehrenamtliche Tätigkeiten	2019 RiGeL - Graduate Colloquium 2020 RiGeL - Summer Academy 2020 BIOMEDIGS Doktorandensprecher

Publikationen

- **Michalski, M.;** Bauer, M.; Walz, F.; Tümen, D.; Heumann, P.; Stöckert, P.; Gunckel, M.; Kunst, C.; Kandulski, A.; Schmid, S.; et al. Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* 2023, 11, 1666, doi:10.3390/biomedicines11061666.
- Kunst, C.; Schmid, S.; **Michalski, M.;** Tümen, D.; Buttenschön, J.; Müller, M.; Gülow, K. The Influence of Gut Microbiota on Oxidative Stress and the Immune System. *Biomedicines* 2023, 11, 1388, doi:10.3390/biomedicines11051388.

Wissenschaftliche Posterbeiträge und Vorträge

- 129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2023) **Michalski, M.,** Bauer, M., Walz, F., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2023) Simultane Inhibition von Mcl-1 und Bcl-2 durch BH3-Mimetika führt zum synergistischen Zelltod durch Apoptose beim hepatozellulären Karzinom. *Innere Medizin* 2023, 64(Suppl 1)
- 129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2023) Tümen, D., Volz, B., Aschenbrenner, E., Teubner, J.-P., Truong, D.-J. J., Neumeyer, K., Gunckel, M., Pollinger, K., Mester-Pavel, P., **Michalski, M.,** Albert, V., Kunst, C., Gülow, K., Müller-Schilling, M. (2023) Neues Exon-spezifisches Reportersystem zur Quantifizierung und Echtzeit-Analyse der p53 Protein-Isoformen im Hochdurchsatz Screening. *Innere Medizin* 2023, 64(Suppl 1)
- 39. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Bochum (2023) **Michalski, M.,** Bauer, M., Walz, F., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2023) A novel approach of combining BH3-mimetics induces apoptotic cell death in Hepatocellular Carcinoma (HCC) cells. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 61(1)
- American Association for the Study of Liver Disease, The Liver Meeting, Washington D.C. (2022)

Walz, F., **Michalski, M.**, Bauer, M., Mueller-Schilling, M., Gulow, K. (2022) New therapeutical approach for hepatocellular carcinoma: inhibition of Bcl-2 and Mcl-1. *Hepatology* 76 (Suppl 1)

- 30th United European Week, Wien (2022)

Walz, F., **Michalski, M.**, Bauer, M., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2022). Inhibition of Bcl-2 and Mcl-1 effectively induces cell death in Hepatocellular Carcinoma (HCC) cell lines. *European Gastroenterology Journal* 2022, 10 (Suppl 8)

- 76. Gemeinsame Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hamburg (2022)

Walz, F., **Michalski, M.**, Bauer, M., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2022) Inhibition antiapoptotischer Bcl-2 Moleküle als neue therapeutische Option für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(8)

- 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Freising (2022)

Walz, F., **Michalski, M.**, Aschenbrenner, E., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2022) Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 – ein neuer Therapieansatz für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(4)

- 128. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2022)

Michalski, M., Schroeder, A., Müller-Schilling, M., Gulow, K. (2022) Dimethylfumarate (DMF) - A novel Inhibitor for Tumor Cell Migration and Tumor Cell Proliferation. *Internist* 2022, 63(Suppl 3)

Walz, F., **Michalski, M.**, Aschenbrenner, E., Müller-Schilling, M., Gulow, K. (2022) The Combination of Bcl-2 Inhibitor Venetoclax and Mcl-1 Inhibitor MIK665 induces Cell Death in HCC Cells. *Internist* 2022, 63(Suppl 3)

- 38. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Mannheim (2022)

Michalski, M., Schroeder, A., Gunkel, M., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2022) Dimethylfumarate (DMF) inhibits proliferation and migration and induce cell death in solid tumor cells. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(1)

Bauer, M., **Michalski, M.**, Müller-Schilling, M., Gülow, Karsten: (2022) Combination of Mcl-1 (Myeloid-Cell Leukemia 1) and Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) inhibition – A novel treatment approach for Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(1)

- 29th United European Week, virtuell (2021)

Wagner, S., **Michalski, M.**, Müller-Schilling, M., Gülow, K., (2021) Dimethyl fumarate and Bcl-2 inhibitor ABT-199 induce cell death and inhibit cell proliferation in colorectal cancer cells. *European Gastroenterology Journal* 2021, 9 (Suppl 8)

- 75. Gemeinsame Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Leipzig (2021)

Wagner, S., **Michalski, M.**, Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2021) Kombinationstherapie von Dimethylfumarat und Bcl-2-Inhibitor ABT-199 hemmt die Zellproliferation und induziert Zelltod in Kolonkarzinom-Zellen. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(8)

Bauer, M., **Michalski, M.**, Kunst, C., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2021) Inhibition von Mcl-1 (Myeloid-Cell Leukemia 1) und Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) - Ein neuer Therapieansatz bei Hepatozellulärem Karzinom (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(8)

Zwicker, B., **Michalski, M.**, Müller-Schilling, M., Gülow K. (2021) Kombinationstherapien mit Dimethylfumarat (DMF) und Bcl2-Inhibitoren zur Induktion von Zelltod in soliden Tumoren. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(8)

- 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., virtuell (2021) **Michalski, M.**, Wiesner, O., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2021) Dimethylfumarat (DMF) Behandlung inhibiert Proliferation und Migration von hepatozellulären Karzinom-Zelllinien *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(6)

Zwicker, B., **Michalski, M.**, Schroeder, A., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2021) Dimethylfumarat mindert Proliferation und Metastasierung von humanen Kolonkarzinomzelllinien. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(6)

- 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Münster (2021)

Michalski, M., Wiesner, O., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2021) Dimethyl fumarate (DMF) inhibits proliferation and induce specific cell death in hepatocellular carcinoma (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(1)

- 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2020)
Michalski, M., Wiesner, O., Müller-Schilling, M., Gulow, K. (2020) Inhibition of Proliferation and Migration of Hepatoma Cells by Dimethyl Fumarate (DMF) Application. *Internist 2020*, 61(Suppl 1)

Zwicker, B., **Michalski, M.**, Schroder, A., Müller-Schilling, M., Gulow, K. (2020) Dimethylfumarate slows down Growth and Metastasis of Colon Carcinoma Cell Lines. *Internist 2020*, 61(Suppl 1)

- 36. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Mainz (2020)
Michalski, M., Aschenbrenner, E., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2020) Dimethyl fumarate (DMF) inhibits migration and proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 58(1)

- 27th United European Week, Wien (2019)
Michalski, M., Wiesner, O., Müller-Schilling, M., Gülow, K., (2019). Dimethyl fumarate (DMF) inhibits proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells (HCC). *United European Gastroenterology Journal 2019*, 7 (Suppl 8)

- 6th German-Romanian Symposium of Gastroenterology, Regensburg (2019)
Michalski, M., Tümen, D., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Müller-Schilling, M., Gulow, K., (2019). Cell death induction *via* energy depletion in hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 28(Suppl 1)

- 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Passau (2019)
Michalski, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M., Gülow, K., (2019). Induktion einer energetischen Krise durch Dimethylfumarat-Applikation als mögliche neue Therapieoption für das hepatozelluläre Karzinom (HCC)? *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 57(6)

- 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2019)
Michalski, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2019). Induktion des Zelltodes im Hepatocellular carcinoma (HCC) via Energie Depletion. *Internist 2019, 60(Suppl 1)*

- 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Heidelberg (2019)
Michalski, M., Aschenbrenner, Pollinger, K., Müller-Schilling, M., Gülow, K. (2019). Induction of cell death in hepatocellular carcinoma (HCC) via energy depletion? *Zeitschrift für Gastroenterologie, 57(1)*