

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Therapeutisches Potenzial der Kombination aus Dimethylfumarat und dem
Bcl-2-Inhibitor ABT-199 beim kolorektalen Karzinom: Synergistische Hemmung der
Tumorprogression durch Autophagie-Modulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Simon Matthias Wagner

2025

Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Therapeutisches Potenzial der Kombination aus Dimethylfumarat und dem
Bcl-2-Inhibitor ABT-199 beim kolorektalen Karzinom: Synergistische Hemmung der
Tumorprogression durch Autophagie-Modulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Simon Matthias Wagner

2025

Dekan:	Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. Kathrin Renner-Sattler
Tag der mündlichen Prüfung:	29.09.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Dimethylfumarat (DMF).....	5
1.1.1	Struktur und Wirkstoffklasse von DMF	5
1.1.2	Klinisches Einsatzgebiet von DMF	5
1.1.3	Experimenteller Einsatz von DMF in der Tumorthherapie.....	6
1.2	Der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax).....	7
1.2.1	Regulation der intrinsischen Apoptose durch die Bcl-2-Familie	7
1.2.2	Inhibition von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen durch BH3-Mimetika.....	8
1.2.3	Klinisches Einsatzgebiet von ABT-199 (Venetoclax)	9
1.2.4	Experimenteller Einsatz von ABT-199 in der Tumorthherapie	9
1.3	Kombination von DMF mit ABT-199.....	10
1.4	Das kolorektale Karzinom	11
1.4.1	Epidemiologie, Ätiologie und Mortalität des kolorektalen Karzinoms	11
1.4.2	Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms	12
1.5	ATP-abhängige Prozesse beim Tumorprogress	14
1.6	Die Rolle der mitochondrialen Atmungskette bei der zellulären Energieversorgung.....	16
1.6.1	Aufbau und Funktion der mitochondrialen Atmungskette.....	16
1.6.2	Das mitochondriale Membranpotential.....	16
1.7	Autophagie.....	17
1.7.1	Auftreten von autophagischen Prozessen.....	17
1.7.2	Die Rolle von LC3 bei der Bildung des Autophagosoms.....	17
1.8	Der Zellzyklus	17
1.8.1	Die Phasen des Zellzyklus	17
1.8.2	Zellzyklus-regulierende Proteine.....	18
1.9	Ziele der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte und Laborbedarf.....	21
2.1.2	Software.....	23
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.4	Antikörper.....	26
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.2.1	Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot-Analysen	26

2.2.2	Proteinbestimmung	27
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.2.4	Western Blot-Analysen.....	28
2.3	Zellbiologische Methoden	29
2.3.1	<i>In vitro</i> Kultivierung der HCT-116-Zelllinie	29
2.3.2	Luminometrische Bestimmung der Zellviabilität	30
2.3.3	Durchflussszytometrische Untersuchung des Zelltods.....	30
2.3.4	Durchflussszytometrische Untersuchung des Mitochondrialen Membranpotentials	31
2.3.5	Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs	32
2.3.6	Durchflussszytometrische Untersuchung der Zellproliferation	32
2.3.7	Durchflussszytometrische Untersuchung des Zellzyklus	33
2.4	Statistische Analysen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Induktion von Zelltod und Autophagie durch ATP-Depletion.....	35
3.2	Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials durch DMF	37
3.3	Hemmung der mitochondrialen Respiration durch DMF	40
3.4	Inhibition der Zellproliferation durch Zellzyklus-Arrest.....	41
3.5	Veränderungen an den zellulären Cyclin- und CDK-Spiegeln.....	44
4	Diskussion	49
4.1	Reduzierte Zellviabilität und zelluläre ATP-Spiegel.....	50
4.2	Zelltod- und Autophagie-Induktion durch DMF und ABT-199.....	52
4.3	Veränderte Mitochondrienfunktion unter DMF-Therapie	54
4.4	Auswirkungen des verminderten ATP-Angebots auf CRC-Zellen	57
4.4.1	Beeinträchtigung der Zellproliferation durch DMF und ABT-199	57
4.4.2	Zellzyklus-Arrest durch Veränderungen der zellulären Cyclin- und CDK- Spiegel	59
5	Zusammenfassung	64
6	Abkürzungsverzeichnis	66
7	Literaturverzeichnis	67
8	Selbstständigkeitserklärung	81
9	Danksagung	82
10	Lebenslauf	83

1 Einleitung

1.1 Dimethylfumarat (DMF)

1.1.1 Struktur und Wirkstoffklasse von DMF

Dimethylfumarat (DMF) ist ein kleines Molekül mit der Strukturformel $C_6H_8O_4$ und einem Molekulargewicht von 144,13 g/mol. Es zählt somit zur Substanzklasse der *small molecules*. Chemisch handelt es sich bei der Verbindung um einen Diester der Fumarsäure mit dem Alkohol Methanol (Saidu et al. 2019). DMF weist eine Vielzahl an molekularen Wirkmechanismen auf, wie u.a. die Senkung der zellulären Gluthation (GSH)-Spiegel, die Aktivierung von nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) oder die Inhibition von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nf-κB). Dabei wirkt DMF vor allem anti-inflammatorisch und immunmodulatorisch (Froehlich et al. 2019; Brück et al. 2018; Schroeder et al. 2017; Nicolay et al. 2016).

1.1.2 Klinisches Einsatzgebiet von DMF

Die anti-inflammatorische Wirkung von DMF macht man sich bei der klinischen Anwendung des Präparats zunutze. Als erstes DMF-haltiges Präparat wurde Fumaderm® 1994 zur oralen Psoriasis-Therapie in Deutschland zugelassen (Atwan et al. 2015). Mittlerweile ist auch Skilarence® als reines DMF-Medikament zur Behandlung der Psoriasis vulgaris verfügbar (Brück et al. 2018; European Medicines Agency 2017). Auch bei der Therapie der Multiplen Sklerose (MS) spielt DMF eine Rolle. 2013 wurde das Medikament Tecfidera® für die Behandlung der schubförmigen, remittierenden MS von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zugelassen (Ahmadi-Beni et al. 2019; Saidu et al. 2019). Ein Jahr später kam es auch in der Europäischen Union zur Zulassung dieses Medikaments. Aufgrund der schnellen Hydrolyse von DMF zu Monomethylfumarat durch Esterasen kann DMF nach oraler Aufnahme im Plasma nicht quantifiziert werden. Pharmakokinetische Untersuchungen mit Monomethylfumarat nach oraler Verabreichung von 240 mg DMF zeigen eine maximale Plasmakonzentration von 13,2 µM und eine Gesamtexposition entsprechend der AUC (area under the curve) von 61,6 µM*h. Die maximal zulässige Tagesdosis an DMF beträgt 720 mg (European Medicines Agency 2014).

DMF ist bei der therapeutischen Anwendung in der Regel gut verträglich. Zwar treten bei zwei von drei behandelten Personen unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, diese sind aber oft milde und führen meist nicht zum Therapieabbruch. Als häufige unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall, Übelkeit oder Bauchschmerzen, Hautrötungen und Leukozytopenie zu nennen. Kontraindikationen für den Einsatz von DMF sind Schwangerschaft, Stillzeit und Niereninsuffizienz (Atwan et al. 2015; Ahmadi-Beni et al. 2019).

Tabelle 1: Zulassungen von DMF in Deutschland

Handlungsname	Erstzulassung	Indikation	Dosierung
Tecfidera ®	2014	Multiple Sklerose	Anfangsdosis 2x 120 mg/d Erhaltungsdosis 2x 240 mg/d
Skilarence ®	2017	Psoriasis vulgaris	Anfangsdosis 1x 30 mg/d Höchstdosis 3x 240 mg/d
Fumaderm ®	1994	Psoriasis vulgaris	Anfangsdosis 1x 120 mg/d Höchstdosis 3x 240 mg/d

1.1.3 Experimenteller Einsatz von DMF in der Tumorthherapie

Neben der anti-inflammatorischen Wirkung von DMF zeigten sich im experimentellen Ansatz auch weitere bemerkenswerte Effekte, die DMF für die Tumorthherapie interessant machen. Bei der *in vitro* Behandlung von Melanom-Zellen mit DMF konnte die Zellproliferation inhibiert werden und Zelltod induziert werden. *In vivo* zeigte sich ein reduziertes Tumorwachstum im Maus-Modell (Loewe et al. 2006; Kaluzki et al. 2016). Auch bei Glioblastom-Zellen konnte die Zellproliferation durch DMF inhibiert werden (Ghods et al. 2013). DMF konnte das Tumorwachstum von Mamma-Karzinomen im Maus-Modell hemmen (Kastrati et al. 2016). Beim kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL) ließ sich ein Ripoptosom-vermittelter Zelltod der malignen T-Zellen sowie ein reduziertes Tumorwachstum und eine Abnahme der Metastasierung unter DMF-Therapie beobachten (Nicolay et al. 2016; Schroeder et al. 2017; Froehlich et al. 2019; Şener et al. 2025). Diese Daten haben uns dazu veranlasst, eine klinische Studie der Phase II zur DMF-Therapie durchzuführen. Diese Studie belegt die Wirksamkeit von DMF am Patienten. Patienten mit Sézary-Syndrom und hoher NF-kappaB-Aktivität in den malignen Zellen zeigten das beste Ansprechen auf die DMF-Therapie (Nicolay et al. 2023).

Die anti-tumoralen Effekte von DMF konnten bereits bei Zelllinien des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden. Die Viabilität und Zellproliferation von kolorektalen

Karzinom-Zellen nahm unter DMF-Therapie ab und es kam zur Autophagie in verschiedenen Zelllinien. Der beobachtete Zelltod wurde entweder als nekroptotisch oder apoptotisch beschrieben (Xie et al. 2015; Kaluzki et al. 2019).

1.2 Der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax)

1.2.1 Regulation der intrinsischen Apoptose durch die Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Familie spielt eine Schlüsselrolle beim Ablauf des intrinsischen Apoptose-Signalwegs. Die verschiedenen Proteine der Bcl-2-Familien können dabei entweder eine Apoptose-induzierende (pro-apoptotische) oder eine Apoptose-inhibierende (anti-apoptotische) Rolle einnehmen. Entsprechend dieser Funktion und entsprechend der Struktur der Bcl-2-Familienmitglieder werden drei Gruppen von Bcl-2-Proteinen unterschieden. Die Gruppe der anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteine umfasst neben dem Namensgeber der gesamten Proteinfamilie, dem *B-cell lymphoma 2*-Protein (Bcl-2), auch Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-w, Mcl-1 und Bfl-1, welches auch als A1 bekannt ist. Die pro-apoptotischen Familienmitglieder lassen sich aufteilen in die Gruppe der Effektor-Proteine und der BH3-only-Proteine. Zu den Effektor-Proteinen gehören Bax, Bak und Bok. Zu den BH3-only-Proteinen zählt man Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa und Hrk (Banjara et al. 2020; Hafezi und Rahmani 2021).

Alle Bcl-2-Familienmitglieder besitzen Bcl-2 Homologien (BH) in ihrer Proteinstruktur. Die anti-apoptotischen Mitglieder und die Effektor-Proteine weisen bis zu vier dieser Homologien auf (BH1-4). Die BH3-only-Proteine besitzen nur die BH3-Homologie. Die meisten Bcl-2-Proteine sind außerdem über eine Transmembrandomäne in der äußeren Mitochondrienmembran fixiert (Delbridge und Strasser 2015; Kvensakul und Hinds 2015; Shamas-Din et al. 2013).

Bcl-2-Familienmitglieder regulieren sich gegenseitig. Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine antagonisieren die Effektor-Proteine durch Bindung an deren BH3-Domäne. Die pro-apoptotischen BH3-only-Proteine können ihrerseits über die BH3-Domäne an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine binden, wodurch die Effektor-Proteine frei werden (Lessene et al. 2008). Die Effektor-Proteine Bax und Bak oligomerisieren und bilden dadurch Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol, welches dort mit dem Apoptose-auslösenden Faktor-1

(Apaf-1) interagiert und so Caspase 9 aktiviert. In der Folge kommt es zu Aktivierung weiterer Caspasen und damit zur Apoptose (Nirmala und Lopus 2020).

Das Verhältnis von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern ist also entscheidend für den intrinsischen Apoptose-Signalweg. Dieses Verhältnis kann durch übergeordnete Signalwege beeinflusst werden. So verschiebt z.B. zellulärer Stress oder DNA-Schädigung das Verhältnis zugunsten der BH3-only-Proteine und es kommt zur Apoptose (Warren et al. 2019; Lessene et al. 2008, S. 989). Bei Krebszellen sind hingegen häufig die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder überexprimiert, sodass diese malignen Zellen einen Überlebensvorteil besitzen (Hafezi und Rahmani 2021).

1.2.2 Inhibition von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen durch BH3-Mimetika

Der therapeutische Ansatz bei der Therapie mit BH3-Mimetika ist es, das Verhältnis der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine zugunsten der pro-apoptotischen zu verschieben. BH3-Mimetika imitieren dabei die Funktion der BH3-only-Proteine. Durch Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine werden die Effektor-Proteine Bax und Bak frei und es kommt zur Apoptose (Lessene et al. 2008).

Es gibt verschiedene BH3-Mimetika, die mehr oder weniger selektiv an unterschiedliche Bcl-2-Familienmitglieder binden. Das erste BH3-Mimetikum war ABT-737. Dieses hemmt, ebenso wie sein klinisches Derivat ABT-263 (Navitoclax), die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w. Weniger selektiv wirkt GX15-070 (Obatoclax) auf Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-1, Mcl-1 und Bfl-1. Problematisch bei diesen ersten BH3-Mimetika war eine gegenüber der Wirksamkeit vergleichsweise hohe Toxizität. So führte beispielsweise ABT-263 zu einer dosis-abhängigen Thrombozytopenie, sodass suffiziente Konzentrationen zur Krebstherapie im Patienten nicht erreicht werden konnten (Hafezi und Rahmani 2021; Delbridge und Strasser 2015). Ein neueres BH3-Mimetikum und hochselektiver Bcl-2-Inhibitor ist ABT-199 (Venetoclax). Es zeigte eine gute Wirksamkeit und rufte weniger Thrombozytopenie hervor als vergleichbare BH3-Mimetika (Souers et al. 2013).

1.2.3 Klinisches Einsatzgebiet von ABT-199 (Venetoclax)

Die gute Wirksamkeit bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen führte zur Zulassung von ABT-199 zur Behandlung von verschiedenen hämatologischen Malignomen. In den USA findet es seit 2016 als Monotherapie bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) Anwendung (Deeks 2016). In der Kombination mit anderen Wirkstoffen wird ABT-199 dort auch für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) verwendet, wenn Patienten nicht für eine Chemotherapie geeignet sind (Jonas und Pollyea 2019; Richard-Carpentier und DiNardo 2019). In der Europäischen Union ist ABT-199 für die Therapie der CLL und AML zugelassen (European Medicines Agency 2016). Nach der aktuellen S3-Leitlinie zum CLL wird ABT-199 in Deutschland als Erstlinientherapie sowie in der Behandlung von Rezidiven empfohlen (DGHO 2024). Bei Verabreichung der zugelassenen Tageshöchstdosis von 400 mg ABT-199 beträgt die maximale Plasmakonzentration $2,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ und die AUC (area under the curve) $37,8 \pm 19,5 \mu\text{M} \cdot \text{h}$ (European Medicines Agency 2016).

Tabelle 2: Zulassung von ABT-199 in Deutschland

Handlungsname	Erstzulassung	Indikation	Dosierung
Venclyxto®	2016	CLL, AML	Anfangsdosis (CLL) 20 mg/d Anfangsdosis (AML) 100 mg/d Höchstosis 400 mg/d

1.2.4 Experimenteller Einsatz von ABT-199 in der Tumorthherapie

Im experimentellen Rahmen zeigte ABT-199 das Potenzial zur Therapie weiterer Tumorentitäten. ABT-199 induzierte Apoptose in verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und hemmte das Tumorwachstum verschiedener Non-Hodgkin-Lymphome im Maus-Modell (Souers et al. 2013). Beim kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL) konnte ABT-199 Zelltod in primären CTCL-Zellen sowie CTCL-Zelllinien induzieren (Froehlich et al. 2019). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Kombination von ABT-199 und MIK665, einem BH-3-Mimetikum, welches Mcl-1 inhibiert, synergistisch intrinsische Apoptose in HCC-Zellen auslöst (Michalski et al. 2023). In über 200 laufenden oder bereits abgeschlossenen klinischen Studien wird vor allem der Einsatz von ABT-199 bei hämatologischen Malignomen betrachtet. Bei klinischen Studien zur Therapie von soliden Tumoren findet ABT-199 oft als Kombination mit anderen Wirkstoffen wie beispielsweise dem MDM2-Inhibitor

Idasanutlin oder dem monoklonalen Anti-PD-1-Antikörper ABBV-181 Anwendung (Ramesh und Medema 2020).

1.3 Kombination von DMF mit ABT-199

Wie zuvor bereits erwähnt, konnten sowohl DMF als auch ABT-199 Zelltod in primären CTCL-Zellen sowie CTCL-Zelllinien induzieren. DMF führt in CTCL-Zellen über eine Blockade von Thioredoxin 1 (Trx1) zur Inhibition des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Abbildung 1). In der Folge werden die NF- κ B-Zielgene, das zelluläre FLICE-like inhibitory Protein (cFLIPs) und die Inhibitors of Apoptosis (IAPs), nicht mehr exprimiert. Dies resultiert in der Bildung des Ripoptosoms, einer Signalplattform bestehend aus Caspase 8, Receptor-interacting kinase 1 (RIPK1) und Fas-associated death domain (FADD). Über das Ripoptosom kann sowohl apoptotischer als auch nekroptotischer Zelltod vermittelt werden. Unter DMF-Therapie von CTCL-Zellen konnte auch die Freisetzung von Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) aus den Mitochondrien beobachtet werden. Smac trägt über die Inhibition von IAPs ebenfalls zur Ripoptosom-Bildung bei (Schroeder et al. 2017; Nicolay et al. 2016). ABT-199 hemmt als BH3-Mimetikum anti-apoptotische Bcl-2-Proteine (Abbildung 1). Über die daraus resultierende Oligomerisierung von Bax- und Bak-Proteinen kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und somit zur Apoptose-Induktion (Nirmala und Lopus 2020; Lessene et al. 2008).

Die beiden verschiedenen Wirkmechanismen von DMF und ABT-199 lösten Zelltod in CTCL-Zellen aus. Durch die Kombination beider Wirkstoffe zeigte sich ein synergistischer Effekt bei der Zelltodinduktion. Während die Monotherapie mit DMF oder ABT-199 im Maus-Modell im Vergleich nur geringere Effekte zeigte, konnte die Kombination beider Wirkstoffe das Tumorwachstum deutlich reduzieren. Auch die Überlebensrate der Mäuse war unter der Kombinationstherapie am größten (Froehlich et al. 2019).

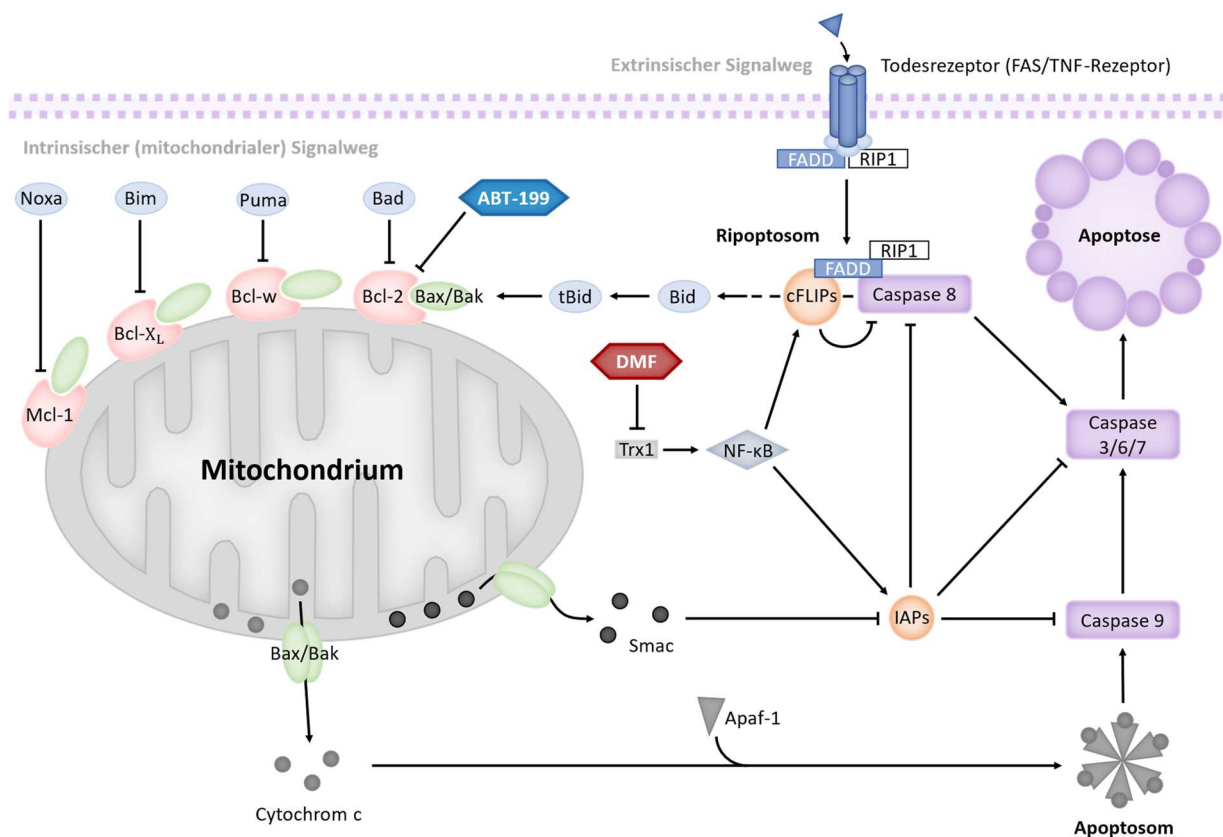


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen zur Zelltodinduktion durch DMF und ABT-199 in CTCL-Zellen. DMF inhibiert nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) über Blockade von Thioredoxin 1 (Trx1). Die Expression von zellulären FLICE-like inhibitory Proteinen (cFLIPs) und Inhibitors of Apoptosis (IAPs) nimmt ab. Die Bildung des Ripoptosoms, bestehend aus Caspase 8, Receptor-interacting kinase 1 (RIPK1) und Fas-associated death domain (FADD), und die Freisetzung von Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) aus den Mitochondrien führt zur Zelltodinduktion. ABT-199 inhibiert Bcl-2. Durch Oligomerisierung von Bax und Bak wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt. Die Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom c und Apoptose-auslösendem Faktor-1 (Apaf-1) führt zur Aktivierung von Caspasen und Zelltodinduktion.

1.4 Das kolorektale Karzinom

1.4.1 Epidemiologie, Ätiologie und Mortalität des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (CRC) zählt zu den häufigsten bösartigen Tumorentitäten weltweit. Betrachtet man das Krankheitsgeschehen geschlechterübergreifend so stellte es im Jahr 2022 mit einer weltweiten Inzidenz von 1,9 Millionen das dritthäufigste Krebsleiden dar. Dies entspricht einem Anteil an den Krebsneuerkrankungen von 9,6 %. Häufiger waren nur das Bronchialkarzinom mit 12,4 % und das Mammakarzinom mit 11,6 % (Bray et al. 2024). Die Inzidenz stieg in den letzten Jahren kontinuierlich. Vor allem in den westlichen Ländern sind hohe Fallzahlen beim kolorektalen Karzinom zu beobachten (Wild et al. 2020).

Die Wahrscheinlichkeit am CRC zu erkranken, beträgt etwa 4 – 5 % und wird von verschiedenen Risikofaktoren beeinflusst. So korreliert das CRC vor allem mit einem hohen Lebensalter und dem Vorhandensein von Co-Morbiditäten, insbesondere den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn. Auch eine genetische Disposition spielt eine Rolle. Einige Risikofaktoren für das Auftreten eines CRC werden durch den individuellen Lebensstil beeinflusst. Übergewicht, wenig körperliche Aktivität sowie der Konsum von viel rotem Fleisch, Alkohol oder Tabak können das Entstehen eines CRC begünstigen (Mármol et al. 2017).

Die meisten CRC entwickeln sich aus Adenomen. Aufgrund einer Sequenz aus mehreren Genmutationen kommt es hierbei zunächst zu adenomatösen Vorstufen, welche dann durch weitere Mutationen karzinomatös entarten (Wild et al. 2020; Mármol et al. 2017). Eine mögliche Abfolge einer solchen Sequenz an Genmutationen wurde durch Vogelstein et al. (1990; 2013; 2015) beschrieben. Zunächst führt eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC (Adenomatous-polypsis-coli) zu einem Wachstumsvorteil gegenüber nicht-mutierten kolorektalen Epithelzellen. Durch Hyperproliferation des mutierten Epithels entsteht so ein langsam wachsendes, kleines Adenom. Als Folge einer weiteren Mutation, die in der Regel das Protoonkogen KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) betrifft, nimmt die Proliferationsrate der Zellen weiter zu, sodass sich ein größeres Adenom bildet, welches dysplastisch verändert ist. Eine dritte Mutation im TP53-Gen führt zum Verlust des Tumorsuppressorproteins p53. Es kommt zur malignen Veränderung des Adenoms und damit zur Entstehung eines Karzinoms.

Das kolorektale Karzinom steht mit 9,3 % an der zweiten Stelle aller krebisbedingten Todesursachen. Im Jahr 2022 war es für über 900.000 Todesfälle weltweit verantwortlich (Bray et al. 2024).

1.4.2 Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms

Kolonkarzinome ohne Fernmetastasen können durch onkologische Resektion kurativ behandelt werden. Ziel der kurativen Therapie des kolorektalen Karzinoms ist eine möglichst vollständige Tumorentfernung. Um die Chancen auf eine erfolgreiche operative Tumorthherapie zu verbessern, kommen Chemotherapie und Bestrahlung adjuvant oder neoadjuvant zum Einsatz (Abbildung 2). Die adjuvante Chemotherapie

erfolgt risikoadaptiert in Abhängigkeit der Tumorgröße und der Anzahl an tumorinfiltrierten Lymphknoten mit Capecitabin/Oxaliplatin (CAPOX) für 3 – 6 Monate oder mit Folinsäure/5-Fluorouracil (5-FU)/Oxaliplatin (FOLFOX) für 6 Monate (André et al. 2020a). Neoadjuvante Ansätze werden derzeit in klinischen Studien beim fortgeschrittenen Kolorektalkarzinom untersucht. Bei einer kleinen Untergruppe von Patienten mit Mismatch-Reparatur-Defizienz hat sich die neoadjuvante Therapie mit dem PD-1-Inhibitor Dostarlimab als sehr wirksam erwiesen (Cercek et al. 2022). Rektumkarzinome im unteren und mittleren Rektumdrittel werden neoadjuvant mit einer Radiochemotherapie (RCT) oder einer alleinigen Radiotherapie (RT) mit 5x5 Gy behandelt. Bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen mit hohem Risiko wird nach der neoadjuvanten RT oder RCT eine weitere Chemotherapie mit FOLFOX oder CAPOX vor der Operation durchgeführt. Dieses Vorgehen wird als totale neoadjuvante Therapie bezeichnet (Bahadoer et al. 2021). Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass eine neoadjuvante Chemotherapie mit FOLFOX einer totalen neoadjuvanten Therapie hinsichtlich der Wirksamkeit gleichwertig ist (Schrag et al. 2023).

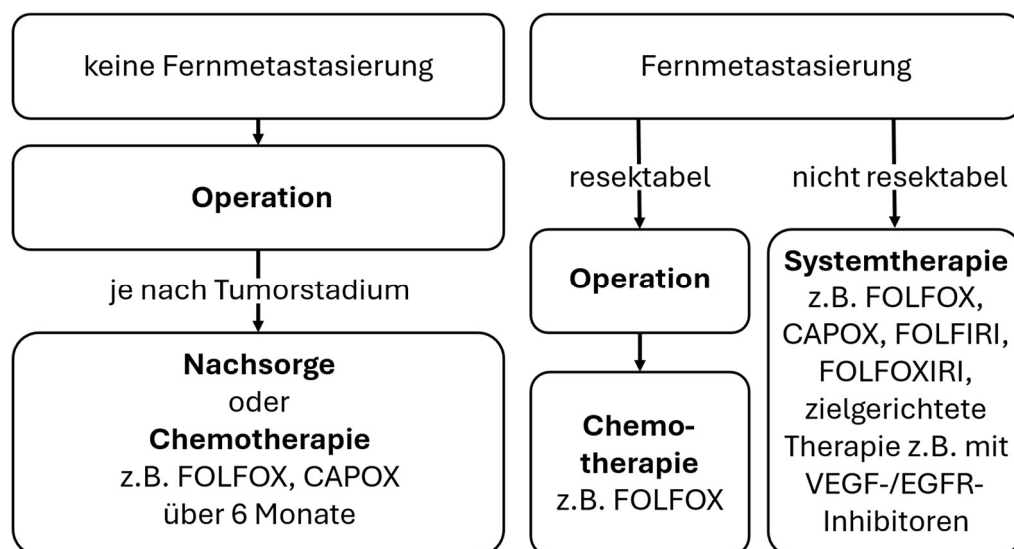


Abbildung 2: Vereinfachter Algorithmus zur Therapie des kolorektalen Karzinoms.

In der palliativen Situation werden Systemtherapien eingesetzt, darunter Monochemotherapien wie Folinsäure/5-FU, Capecitabin oder Irinotecan. Zu den verfügbaren Kombinationschemotherapien gehören FOLFOX, CAPOX, Folinsäure/5-FU/Irinotecan (FOLFIRI), Capecitabin/Irinotecan und Folinsäure/5-FU/Oxaliplatin/Irinotecan (FOLFOXIRI). Zunehmend an Bedeutung gewinnen

zielgerichtete Therapien mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern oder Proteinen. Diese Substanzen richten sich zum Beispiel gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), wie Bevacizumab und Aflibercept, oder gegen den epidermalen Wachstumsrezeptor (EGFR), wie Cetuximab und Panitumumab (Cervantes et al. 2023). Etwa 5% der metastasierten kolorektalen Karzinome weisen eine Mismatch-Reparatur-Defizienz auf. Hier ist der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren, insbesondere des Anti-PD-1-Antikörpers Pembrolizumab, sehr effektiv (André et al. 2020b).

Die konventionellen Chemotherapeutika zeigen oft systemische Nebenwirkungen und ein unzufriedenstellendes Ansprechen des Tumors auf die Therapie. Gleichzeitig kann es jederzeit zu Resistenzbildungen gegen die verwendeten Wirkstoffe kommen, was ein Ansprechen weiter verschlechtert (Xie et al. 2020). Diese Resistenzen limitieren die Effektivität der Therapie und können ein Therapieversagen zur Folge haben. Eine häufige Ursache für die Resistenzbildung von malignen Tumoren ist die erhöhte Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-2, Bcl-xL oder Mcl-1 (Hu et al. 2016). Auch bei den zielgerichteten Therapien gegen EGFR und VEGF lassen sich Arzneimittelresistenzen nicht vermeiden. Außerdem sind diese Medikamente sehr kostenintensiv, führen zu zusätzlichen Nebenwirkungen und zeigen mitunter bei jedem Individuum sehr unterschiedliche Wirksamkeiten (Xie et al. 2020). Trotz der Vielzahl an verfügbaren Präparaten zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist also die Identifikation neuer Substanzen und die indikationsübergreifende Wirkstoffnutzung mit einem Augenmerk auf die Überwindung der Resistenz, sowie ein geringeres Nebenwirkungsspektrum bei gleichzeitig höherer Therapieeffektivität von großer Bedeutung.

1.5 ATP-abhängige Prozesse beim Tumorprogress

Es zählt zu den Merkmalen maligner Zellen, dass sie unlimitiert proliferieren können (Hanahan und Weinberg 2000, 2011). Die Zellproliferation ist ein energieverbrauchender Prozess. Die benötigte Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) kann hierfür auf verschiedenen Wegen bereitgestellt werden. Ein bekannter Stoffwechselweg, der neben ATP auch wichtige Bausteine für die Biosynthese neuer Zellen liefert, ist die Glykolyse (Grumbach und Nguyen 2019).

Für die unlimitierte Zellproliferation ist die Glykolyse deshalb ein wichtiger Bestandteil des Metabolismus maligner Zellen (Leal-Esteban und Fajas 2020; Mosier et al. 2021). Da mitunter die über die Glykolyse bereitgestellte ATP-Menge für die starke Zellproliferation nicht ausreicht, wird der Energiebedarf auch durch eine gesteigerte Funktion der mitochondrialen Atmungskette gedeckt (Ghosh et al. 2020). Es zeigte sich, dass metastatische Krebszellen beim Tumorwachstum mehr auf die ATP-Gewinnung durch die mitochondriale Atmungskette angewiesen sind als primäre Tumorzellen, die hauptsächlich ihr ATP über die Glykolyse bilden (Mosier et al. 2021; Zanutelli et al. 2021).

Neben der unlimitierten Zellproliferation ist die Ausbildung von Metastasen ein Merkmal maligner Zellen (Hanahan und Weinberg 2000, 2011). 90 % der Todesfälle bei soliden Tumoren sind auf die Bildung von Metastasen zurückzuführen (Kramer et al. 2013). Damit sich Metastasen ausbilden, ist die Fähigkeit der Tumorzellen zur Zellmigration notwendig. In einer Metastasierungskaskade lösen sich die Zellen zunächst vom Primärtumor, durchdringen dann die Basalmembran und migrieren schließlich durch die extrazelluläre Matrix (Mosier et al. 2021). Bei verschiedenen Tumorentitäten, wie auch beim kolorektalem Karzinom, hat sich gezeigt, dass die Zellen als kollektiver Zellverband migrieren. Hierbei stehen die Zellen über funktionelle Zell-Zell-Kontakte miteinander in Verbindung. Man vermutet eine verstärkte Invasion, Metastasierung und Therapieresistenz bei Krebsarten, die kollektiv migrieren (Kramer et al. 2013; Mosier et al. 2021). Wie die Zellproliferation stellt die Zellmigration einen energieverbrauchenden Prozess dar (Zanutelli et al. 2021). Auch hier kann das benötigte ATP wieder über Glykolyse und die mitochondriale Atmungskette gewonnen werden. In der Literatur ist von einer gleichwertigen Relevanz dieser beiden Stoffwechselwege zur Energiebereitstellung die Rede (Mosier et al. 2021). Andere Autoren sehen in der mitochondrialen Atmungskette den bevorzugten Stoffwechselweg zur ATP-Produktion bei migrierenden Zellen (Zanutelli et al. 2021).

Viele Arten von malignen Zellen sind auf die Funktion der mitochondrialen Atmungskette angewiesen. Eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette und die ausreichende Bereitstellung von ATP ist für die Tumorerneuerung, das Tumorüberleben und die Metastasierung entscheidend (Ghosh et al. 2020). Die Beeinflussung des zellulären Energiehaushaltes über die Beeinträchtigung der ATP-Produktion durch die mitochondriale Atmungskette stellt

also ein interessantes und vielversprechendes Ziel bei der Therapie von Malignomen dar.

1.6 Die Rolle der mitochondrialen Atmungskette bei der zellulären Energieversorgung

1.6.1 Aufbau und Funktion der mitochondrialen Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette ist der wichtigste Stoffwechselweg zur Produktion von energiereichen Verbindungen in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in eukaryotischen Zellen. Die Atmungskette besteht aus vier Proteinkomplexen, welche in der inneren Mitochondrienmembran verankert sind. Drei dieser vier Komplexe sind Protonen-Pumpen. Ihre Funktion ist der Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum des Mitochondriums. Die Energie für diesen Protonentransport entsteht aus der Oxidation von Reduktionsäquivalenten wie NADH unter dem Verbrauch von Sauerstoff und der Entstehung von Wasser. Die in den Intermembranraum beförderten Protonen fließen anschließend entsprechend dem elektrochemischen Gradienten über die ATP-Synthase zurück in die mitochondriale Matrix. Die ATP-Synthase wandelt bei diesem Prozess ADP zum energiereichen ATP um (Vercellino und Sazanov 2022).

1.6.2 Das mitochondriale Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) ist das Resultat des Protonentransports über die Atmungskette. Es beschreibt das elektrische Potential über der inneren Mitochondrienmembran, welches sich aufgrund der Ladungsungleichheit zwischen dem Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix bildet. Mitochondriale Entkoppler wie beispielsweise FCCP erhöhen die Protonenleitfähigkeit der inneren Mitochondrienmembran. Der Ladungsausgleich zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix kann dadurch effizienter stattfinden, wodurch das $\Delta\Psi_m$ kleiner wird (Cadenas 2018).

1.7 Autophagie

1.7.1 Auftreten von autophagischen Prozessen

Autophagie ist eine mögliche Reaktion auf ein mangelndes Energieangebot in der Zelle. Dies kann z.B. durch Nährstoffmangel, Hypoxie, Infektionen oder den Mangel an Wachstumsfaktoren bedingt sein. Autophagie soll das Überleben der Zelle sichern, indem es Energie aus dem Selbstverdau zelleigener Verbindungen gewinnt (Dikic und Elazar 2018). Hierfür werden Proteine und Organellen durch das Autophagosom aufgenommen. Das Autophagosom verschmilzt mit Lysosomen zum Autolysosom, in welchem die Proteine und Organellen abgebaut werden (Vishnupriya et al. 2020).

1.7.2 Die Rolle von LC3 bei der Bildung des Autophagosoms

Das im Zytosol vorhandene LC3-I verbindet sich mit Phosphatidylethanolamin zu LC3-II, welches sich spezifisch an der autophagosomalen Membran sammelt. Dort bleibt LC3-II bis zur Verschmelzung des Autophagosoms mit Lysosomen zum Autolysosom (Vishnupriya et al. 2020). Es werden drei Isoformen von LC3 unterschieden. Nur die Isoform LC3B-II korreliert mit einem erhöhten Gehalt an autophagischen Vesikeln und wird deshalb zur Analyse der Autophagie empfohlen (Barth et al. 2010).

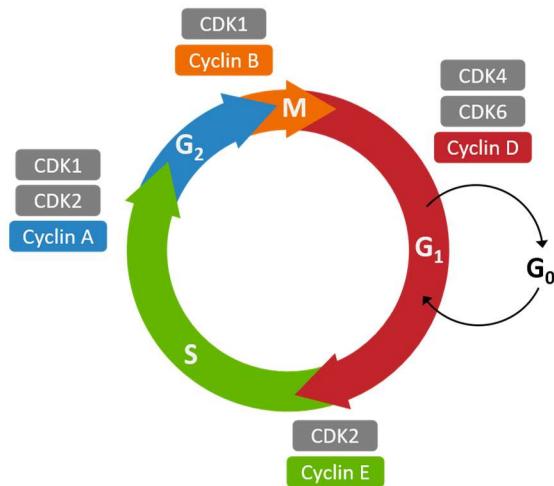
1.8 Der Zellzyklus

1.8.1 Die Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen besteht aus vier Phasen (Abbildung 3A). In der G1-Phase entscheidet sich, ob die Zelle in eine Ruhephase, die G0-Phase, übergeht oder ein Progress in die nächste Zellzyklus-Phase stattfindet. In dieser nächsten, sogenannten S-Phase findet die DNA-Synthese statt. Sie ist mit der vollständigen Duplikation der zellulären DNA abgeschlossen. Die anschließende G2-Phase dient als Kontrollpunkt, bevor die Zelle in die Phase der mitotischen Zellteilung, die M-Phase, übergeht. Das Durchlaufen aller Phasen ist notwendig für weitere Zellteilungen und damit die Proliferation der Zellen (Leal-Esteban und Fajas 2020). Die wichtigen Kontrollpunkte für das Fortschreiten des Zellzyklus sind der G1/S- sowie der G2/M-

Übergang. Die Regulierung dieser Übergänge ist komplex und von der Interaktion verschiedener Proteine abhängig. Den Proteingruppen der Cycline sowie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu (Gao und Liu 2019; Rubin et al. 2020).

A



B

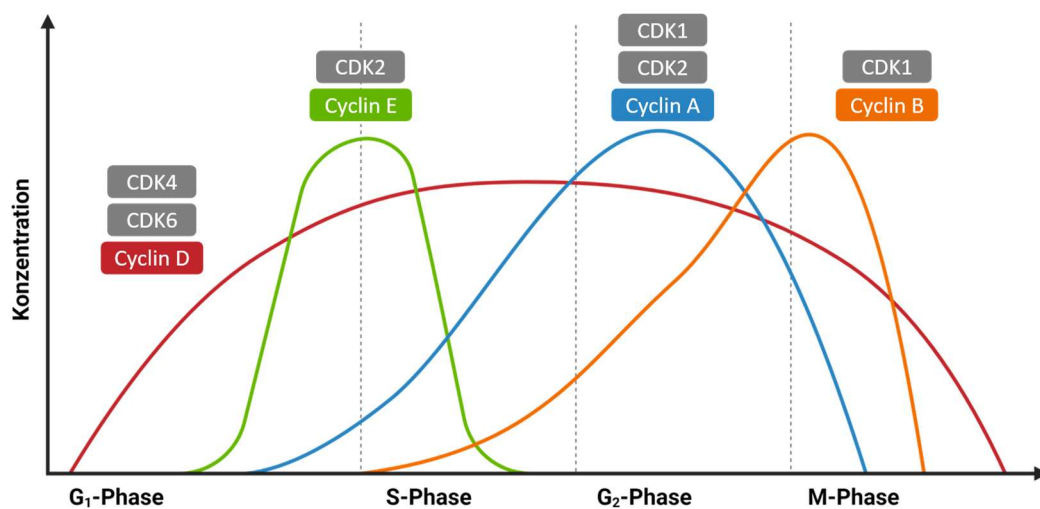


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus mit den relevanten Cyclin-CDK-Komplexen für die jeweilige Zellzyklus-Phase. (A) Zellzyklus-Phasen. (B) Schwankungen der Cyclin-Spiegel im Verlauf des Zellzyklus.

1.8.2 Zellzyklus-regulierende Proteine

Die Interaktion von Cyclinen und CDKs ist essenziell für den Übergang von einer Zellzyklus-Phase in die nächste. Die Cyclin-Spiegel schwanken aufgrund von unterschiedlich stark ausgeprägter Synthese und Abbau dieser Proteine im Verlauf des Zellzyklus (Abbildung 3B). Abhängig von den Cyclin-Spiegel-Schwankungen

kommt es zur zyklischen Aktivierung der CDKs, welche selbst keiner Schwankung in ihren zellulären Proteinspiegeln unterliegen (Leal-Esteban und Fajas 2020). Für das Fortschreiten der G1-Phase ist zunächst der Komplex aus Cyclin D mit CDK4 oder CDK6 notwendig. Zum Übertritt in die S-Phase wird der Cyclin E-CDK2-Komplex benötigt, der auch zur Aufrechterhaltung der S-Phase beiträgt. Ebenfalls an der Aufrechterhaltung der S-Phase beteiligt und wichtig für den Übertritt in die G2-Phase ist Cyclin A zusammen mit CDK1 oder 2 (Rubin et al. 2020; Hume et al. 2020). Für den Übertritt der G2-Phase in die M-Phase und damit die mitotische Zellteilung werden hohe zytoplasmatische Cyclin B-Spiegel benötigt, welche einen Komplex mit CDK1 bilden (Krenning et al. 2014; Müllers et al. 2014).

1.9 Ziele der Arbeit

Das kolorektale Karzinom ist die dritthäufigste Tumorerkrankung weltweit und eine der führenden Ursachen krebsbedingter Todesfälle (Bray et al. 2024). Da bestehende Therapien oft unzureichend wirksam sind und Resistenzen während des Behandlungsverlaufs auftreten, besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieoptionen.

Diese Doktorarbeit untersucht die Wirkstoffe Dimethylfumarat (DMF) und den Bcl-2-Inhibitor ABT-199 mit dem Ziel, ihr therapeutisches Potenzial für das kolorektale Karzinom sowie deren mögliche indikationsübergreifende Anwendung zu bewerten. Im Fokus stehen:

1. **Analyse der zellulären Effekte** von DMF und ABT-199 sowie ihrer Kombination hinsichtlich:
 - Zellviabilität
 - Zelltodmechanismen
 - Autophagie
 - Mitochondrienfunktion
 - Zellproliferation
 - Zellzyklusregulation

2. **Bewertung der Übertragbarkeit** der gewonnenen Erkenntnisse auf das kolorektale Karzinom. Durch diese Untersuchungen soll geklärt werden, ob DMF und ABT-199 – einzeln oder in Kombination – als neue Behandlungsoption für das kolorektale Karzinom und möglicherweise weitere Tumorerkrankungen in Frage kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Analysenwaage Excellence XA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
Aspirationspipette 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
BD LSRFortessa™ Cell Analyser	Becton, Dickinson and Company, USA
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
CO ₂ -Inkubator CB210	Binder GmbH, Deutschland
Combitips® advanced 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Corning® 96-well Mikroplatte (klar, TC-behandelt)	Corning Incorporated, USA
Corning® Erlenmeyer-Schüttelkolben 250 ml	Corning Incorporated, USA
Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile	Corning Incorporated, USA
Costar® Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, USA
Einmal-Rührspatel	BRAND GMBH + CO. KG, Deutschland
Elektrophorese Netzgerät E835	Consort bvba, Belgien
Elektrophorese Netzgerät EV261	Consort bvba, Belgien
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
EMax Plus Mikroplatten Lesegerät	Molecular Devices LLC, USA
Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Research® Plus Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube, with Cell Strainer Snap Cap	Corning Incorporated, USA
Falcon® Gefäße 14 ml, 15 ml, 50 ml	Corning Incorporated, USA

gestopfte Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	nerbe plus GmbH & Co. KG, Deutschland
Grade Whatman 3MM Chr Fließpapier	GE Healthcare, USA
Integra Pipette VOYAGER II 12-Kanal 12,5 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Integra Pipette VOYAGER II 8-Kanal 50 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Integra Pipettenspitzen GripTip 12,5 µl, 125 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Integra Pipettenspitzen GripTip, Filter 12,5 µl, 125 µl	Integra Biosciences GmbH, Deutschland
Kreisschüttler KS 260 basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland
Laborwaage	Satorius Laboratory, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Magnetrührer RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland
MidiTips Premium Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Mini-Wipptisch WT 16	Biometra GmbH, Deutschland
Multipette® M4	Eppendorf AG, Deutschland
PARAFILM® M	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Pipetman (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q Q-POD	Merck KGaA, Deutschland
Schüttelgerät MTS2/4 digital	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland
Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
SevenCompact pH-Meter S220	Mettler-Toledo GmbH, Schweiz
Sicherheitswerkbank HERAsafe® KS 12	Thermo Fisher Scientific, USA
Sprout® Minizentrifuge	Heathrow Scientific® LLC, USA

Steriflip®-GV Filtereinheit	Merck KGaA, Deutschland
TC20™ Automatischer Zellzähler	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
TE77XP Semi-Dry Transfer Einheit	Hoefer, Inc., USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
Universalzentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific, USA
Vortexer Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Wasserbad W	Memmert GmbH + Co. KG, Deutschland
Zählkammern für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Zellen-Schaber mit 2-Positionen-Klinge	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zellkulturflasche T-75 (75 cm ²)	Eppendorf AG, Deutschland
Zellkulturflasche T-75 (75 cm ²)	Corning Incorporated, USA
Zellkulturflasche T-75 (75 cm ²)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zellkulturschale TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland

2.1.2 Software

BZ-X800 Viewer	Keyence Corporation, Japan
FlowJo™ v10.8.0	Becton, Dickinson and Company, USA
FlowLogic™	Inivai Technologies, Australien
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software, LLC, USA
Image Lab 6.1	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Microsoft Excel, Power Point, Word 16.53	Microsoft, USA
SoftMax Pro 6.5.1	Molecular Devices LLC, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
6-Aminohexansäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Accutase® solution	Sigma-Aldrich, Inc., USA

BD Pharmingen™ Annexin V Binding Buffer, 10X concentrate	Becton, Dickinson and Company, USA
BD Pharmingen™ DAPI Solution	Becton, Dickinson and Company, USA
BD Pharmingen™ FITC Annexin V	Becton, Dickinson and Company, USA
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Biomol GmbH, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Calbiochem® Ribonuclease A, Bovine Pancreas (RNase)	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Cell Proliferation Staining Reagent - Green Fluorescence - Cytopainter	Abcam plc, Großbritannien
cOmplete™, Mini, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Dimethyl fumarate 97% (DMF)	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Fertiggel Mini-PROTEAN® TGX™ 12 % (10-well, 50 µl)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Fertiggradientengel Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free 4-15 % (10-well, 50 µl)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&SELL GmbH, Deutschland
Gibco® Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Invitrogen™ Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (TMRE)	Thermo Fisher Scientific, USA
Invitrogen™ UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Inc., USA
McCoy's 5A (Modified) Medium, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, USA
Methanol zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA, Deutschland

Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natronlauge 1 M	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Necrostatin-1	Selleck Chemicals, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Niederlande
Panobinostat (LBH589)	Selleck Chemicals, USA
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Inc., USA
PhosSTOP™ (Phosphatase-Inhibitor)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Re-Blot Plus Strong Stripping-Lösung (10x)	Merck KGaA, Deutschland
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Inc., USA
ROTI®Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck KGaA, Deutschland
Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus vorgefärbter Protein-Größenmarker, 10- 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP)	Selleck Chemicals, USA
Trizma®-Base	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich, Inc., USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Venetoclax (ABT-199)	Selleck Chemicals, USA
Wasserstoffperoxid 30 % ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Z-VAD-FMK	Selleck Chemicals, USA

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

2.1.4 Antikörper

Block-Lösung

5 % Milch oder 5 % BSA in PBST

Die Western Blot Membranen wurden für die Detektion der angegebenen Antigene (Tabelle 1) über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern in einer Block-Lösung inkubiert. Als Block-Lösung diente hier 5 % Milch für CDK1, Cyclin A2 sowie Cyclin E1 oder 5 % BSA für CDK4, CDK6, Cyclin B1, Cyclin D1 und LC3B. Der Sekundärantikörper wurde in der Block-Lösung des Primärantikörpers inkubiert.

Tabelle 3: verwendete Antikörper für Proteindetektion mittels Western Blot

Antigen	ID/Klon	Hersteller	Verdünnung	Stamm
CDK1	9116/POH1	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Maus
CDK4	12790/D9G3E	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Kaninchen
CDK6	13331/D4S8S	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Kaninchen
Cyclin A2	4656/BF683	Cell Signaling Technology, USA	1/2000	Maus
Cyclin B1	4138	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Kaninchen
Cyclin D1	2978/92G2	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Kaninchen
Cyclin E1	4129/HE12	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Maus
LC3B	2775	Cell Signaling Technology, USA	1/1000	Kaninchen
β-Aktin	A3854	Sigma-Aldrich, USA	1/10000	
Kaninchen	A0545	Sigma-Aldrich, USA	1/10000	
Maus	A9044	Sigma-Aldrich, USA	1/10000	

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten für Western Blot-Analysen

RIPA-Puffer

150 mM NaCl, 1,0 % IGEPAL® CA-630, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8,0, versetzt mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden pro Ansatz 1.000.000 HCT-116-Zellen in 5 ml Medium auf eine 10 cm durchmessende Zellkulturschale ausgesät. Für jede Behandlungsbedingung wurden zwei Petrischalen mit Zellen vorbereitet, um eine Ernte der zu lysierenden Zellen nach 24 h und 48 h zu ermöglichen. Die Petrischalen wurden dann über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert, damit die Zellen am Boden anwachsen konnten.

Die Behandlung der Zellen erfolgte am Folgetag. Die Zellen wurden entweder mit dem Vehikel (0,3 % DMSO) als Kontrolle, 10 μ M ABT-199, 25 μ M DMF, 50 μ M DMF, der Kombination von 10 μ M ABT-199 und 25 μ M DMF oder der Kombination von 10 μ M ABT-199 und 50 μ M DMF behandelt. Alle Wirkstoffe wurden in DMSO gelöst und mit Zellmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Nachdem das alte Medium abgesaugt wurde, wurden pro Petrischale 10 ml der entsprechenden Wirkstoffe gegeben. Bis zur Zell-Ernte nach 24 h und 48 h wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Das in den Petrischalen enthaltende Medium wurde in ein 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit einem sterilen Cell-Scraper vom Boden der Petrischale abgelöst und in die entsprechenden FALCON® Reaktionsgefäße überführt. Die Petrischalen wurden mit 1 – 2 ml PBS gespült, welche ebenfalls überführt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden bei 4 °C und 300 xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Aspirationspipette abgesaugt. Die Zellpellets wurden jeweils in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt, welche erneut bei 4 °C und 300 xg für 5 min zentrifugiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 100 μ l RIPA-Puffer gelöst und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße bei 4 °C und 18.000 xg für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, welcher nun das fertige Protein-Lysat enthielt.

Die Lysate wurden bei -20 °C gelagert und bei Verwendung für Protein-Analysen auf Eis wieder aufgetaut.

2.2.2 Proteinbestimmung

BCA-Lösung

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

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Lysaten wurde ein BCA-Test durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von Bovinem Serumalbumin (BSA) von 2000 – 200 ng/ml angefertigt, welche als Standard verwendet wurde. Die zu analysierenden Lysate wurden mit RIPA-Puffer 1/10 verdünnt. Pro BSA- und Lysat-Verdünnung wurden Triplikate mit je 10 μ l in eine

96 Well Platte pipettiert. Im Anschluss wurden 200 µl BCA-Lösung in jedes Well gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wurde am Elisa Reader bei einer Absorption von 495 nm durchgeführt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2x Laemmli-Puffer

120 mM Tris pH 6,8, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, DTT

SDS-Laufpuffer

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

Anhand des gemessenen Gesamtproteins wurden die Lysate mit RIPA-Puffer so eingestellt, dass in jeder Probe 20 µg Protein enthalten waren. Anschließend wurden die Proben mit 2x Laemmli-Puffer verdünnt, für 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und kurz zentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurden 12 %ige und 4 – 15 %ige Fertiggele verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 150 V und 500 mA für 40 – 55 min in 1x SDS-Laufpuffer.

2.2.4 Western Blot-Analysen

Detektionslösung

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

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, pH 10,4

Kathodenpuffer C

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

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mittels eines Semi-Dry-Systems. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert. Die Filterpapiere wurden in den jeweiligen Anoden- bzw. Kathodenpuffern getränkt. Der Aufbau des Semi-Dry-Systems war Anode, 1x Filterpapier in Anodenpuffer A, 2x Filterpapier in Anodenpuffer B, PVDF-Membran, SDS-Gel, 3x Filterpapier in Kathodenpuffer C und schließlich Kathode. Für den Transfer wurde pro Membran eine Spannung von 80 V für 50 min angelegt. Anschließend erfolgte für 1 h unter Schwenken die Inkubation der Membran in der Blockierlösung. Der Primärantikörper (siehe 2.1.4) wurde über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran für 4x 5 min in Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers fand unter Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur statt. Nach vier weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion mit der Detektionslösung, welcher 0,03 % H₂O₂ hinzugefügt wurde. Für die Belichtung der Membran wurde das ChemiDoc™ XRS+ System verwendet. Sollte auf die Membran anschließend ein neuer Antikörper gegeben werden, wurde diese für 20 min in der Strippinglösung inkubiert und im Anschluss für 1 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem neuen Primärantikörper erneut über Nacht bei 4 °C. Als Ladekontrolle diente β -Actin. Die densitometrische Analyse erfolgte mit ImageLab.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 *In vitro* Kultivierung der HCT-116-Zelllinie

HCT-116 Zellkultur Medium

McCoy's 5A (Modified) GlutaMAX™ Medium, 10 % FCS

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von frischem Medium bei 400 xg für 5 min zentrifugiert. Die in Medium resuspendierten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt.

Die *in vitro* Kultivierung der HCT-116-Zelllinie fand in T75-Zellkulturflaschen statt. Die Zellen befanden sich dort in 10 ml Medium und wurden alle 3 - 4 Tage im Verhältnis

1/4 - 1/5 in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazwischen wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Zellkulturflaschen wurden vor dem Passagieren unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz der Zellen und eventuelle Kontaminationen überprüft. Nur bei einer Konfluenz von ca. 80 – 90 % und der Abwesenheit von Kontaminationen wurden die Zellen für die weitere Kultivierung in Betracht gezogen.

Das Passagieren der Zellen fand unter sterilen Bedingungen an der Steril-Bank statt. Das alte Nährmedium wurde abgesaugt, die Zellen für einige Sekunden mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin-EDTA (0,5g/100ml) abgelöst. Nach 2 – 3 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in frischem Medium suspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl für Experimente wurde mittels TC20™ Automated Cell Counter durchgeführt.

Zum Einfrieren wurden Zellen mit Trypsin abgelöst und in Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 400 xg wurden die Zellen in Einfrierlösung resuspendiert. Je 1 x 10⁶ Zellen/ml wurden als Aliquots in Kryogeßäßen im Stickstofftank eingefroren.

2.3.2 Luminometrische Bestimmung der Zellviabilität

Es wurden pro Bedingung Triplikate mit je 10.000 Zellen pro Well auf 96 Well Platten mit undurchsichtigen Wänden ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 25 µM oder 50 µM DMF, 10 µM ABT-199 oder der Kombination von 25 µM oder 50 µM DMF mit 10 µM ABT-199 behandelt. Die Inkubationszeit der Wirkstoffe im Brutschrank betrug 24 h bzw. 48 h. Unter Verwendung des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays (Promega #G7571/2/3) wurde die ATP-Menge in den Zellen unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen luminometrisch bestimmt. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Anne Schroeder (TRON, Mainz).

2.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung des Zelltods

Für die Experimente ohne den Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK wurden pro Bedingung Triplikate mit je 100.000 Zellen pro Well auf 6 Well Platten ausgesät und über Nacht

bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 50 µM DMF, 10 µM ABT-199 oder der Kombination aus 50 µM DMF und 10 µM ABT-199 behandelt. Die Inkubationszeit der Wirkstoffe im Brutschrank betrug 24 h bzw. 48 h. Für die Experimente mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK wurden pro Bedingung je 100.000 Zellen pro Well auf 6 Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,3 % DMSO als Kontrolle, 50 µM DMF, 10 µM ABT-199 oder der Kombination aus 50 µM DMF und 10 µM ABT-199 behandelt und für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Zur Hemmung der Caspase-Aktivität wurden die Zellen 30 min vor der Zugabe der Wirkstoffe mit 50 µM Z-VAD-FMK behandelt. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde zunächst der Zellüberstand in ein 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend nach einmaligem Waschen mit PBS durch Accutase abgelöst, in das entsprechende 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden alle Proben für 5 min bei 4 °C und 300 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Zellpellets in Annexin V Binding Buffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt. Die Zellen wurden mit Annexin V FITC (1:100) und DAPI (1:100) angefärbt, 10 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert und anschließend in FACS-Röhrchen überführt. Für jede Probe wurden 10.000 Einzelevents bzw. Zellen im Pacific Blue- und im FITC-Kanal gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wurde FlowLogic™ verwendet. Zur Berechnung des spezifischen Zelltods wurde folgende Gleichung verwendet: spezifischer Zelltod % = (% experimenteller Zelltod - % spontaner Zelltod)/(100 % - % spontaner Zelltod) × 100.

2.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung des Mitochondrialen Membranpotentials

Es wurden pro Bedingung je 100.000 Zellen pro Well auf 6 Well Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 25 µM oder 50 µM DMF, 10 µM ABT-199 oder der Kombination von 25 µM oder 50 µM DMF mit 10 µM ABT-199 behandelt. Die Inkubationszeit der Wirkstoffe im Brutschrank betrug 24 h bzw. 48 h. Nach der Inkubation wurden unbehandelte Zellen sowie die Hälfte der Zellen, welche mit 25 µM oder 50 µM DMF behandelt worden waren, mit 30 µM des mitochondrialen Entkopplers FCCP versetzt und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACS-Gerät

durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst nach einmaligem Waschen mit PBS mit 5 nM TMRE im Medium angefärbt und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Accutase abgelöst, in ein 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden alle Proben für 5 min bei 4 °C und 300 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Zellpellets in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Für jede Probe wurde die Intensität des Farbstoffes in 10.000 Einzelevents bzw. Zellen im PE-Kanal gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wurde FlowLogic™ verwendet.

2.3.5 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Es wurden pro Bedingung Triplikate mit je 10.000 Zellen pro Well Seahorse XF-Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden am Folgetag mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 25 µM oder 50 µM DMF behandelt. Die Inkubationszeit der Wirkstoffe im Brutschrank betrug 24 h. Die Sensorkartusche wurde entsprechend den Herstellerangaben in Seahorse XF-Kalibriermittel bei 37 °C in einem CO₂-freien Inkubator über Nacht hydratisiert. Für das Testmedium wurden 100 ml XF Base Medium, welches zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, je 1 ml Glucose (1 M), Natriumpyruvat (100 mM) und Glutamin (200 mM) zugefügt und steril filtriert. Um die Seahorse XF Zellkultur-Mikroplatte für die Messung vorzubereiten, wurden die Zellen zweimal mit Testmedium gewaschen. Danach wurde die Platte für 45 – 60 min in einen 37 °C-Inkubator ohne CO₂ gestellt. Während des Messvorgangs erfolgte die Zugabe des ATP-Synthase-Hemmers Oligomycin (1 µM) zum Zeitpunkt von 30 min, gefolgt von der Gabe vom 1,5 µM FCCP, einem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, nach 60 min. Als letztes wurden nach 90 min eine 0,5 µM Mischung des Komplex-I-Inhibitors Rotenon und des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A hinzugefügt. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Anne Schroeder (TRON, Mainz).

2.3.6 Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellproliferation

Zellproliferationsfarbstoff

Cell Proliferation Staining Reagent – Green Fluorescence – Cytopainter

Es wurden pro Bedingung Triplikate mit je 200.000 Zellen pro Well auf 6 Well Platten ausgesät. Zuvor wurde die Zellsuspension mit 0,5 μ M Zellproliferationsfarbstoff angefärbt. Die Zellen inkubierten bei 37 °C über Nacht, bis sie am Boden der Wells angeheftet waren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Triplikaten mit 0,3 % DMSO als Kontrolle, 50 μ M DMF, 10 μ M ABT-199 oder der Kombination der beiden Wirkstoffe in den genannten Konzentrationen behandelt. Die durchflusszytometrischen Messungen am FACS-Gerät wurden nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation im Brutschrank durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst nach einmaligem Waschen mit PBS durch Accutase abgelöst, in ein 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden alle Proben für 5 min bei 4 °C und 300 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Zellpellets in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Für jede Probe wurde die Intensität des Farbstoffes in 10.000 Einzelevents bzw. Zellen im FITC-Kanal gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wurde FlowLogic™ verwendet.

2.3.7 Durchflusszytometrische Untersuchung des Zellzyklus

Es wurden pro Bedingung Triplikate mit je 1.000.000 Zellen auf 10 cm durchmessende Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen in Triplikaten mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 50 μ M DMF, 10 μ M ABT-199 oder der Kombination der beiden Wirkstoffe in den genannten Konzentrationen behandelt. Die Vorbereitungen für die Messungen am FACS-Gerät wurden nach 24 h und 48 h Inkubation im Brutschrank durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst nach einmaligem Waschen mit PBS durch Accutase abgelöst, in ein 15 ml FALCON® Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden alle Proben für 5 min bei 4 °C und 300 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Zellpellets in 300 μ l PBS resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Unter langsamem Vortexen wurden 700 μ l Ethanol (100 %) zugetropft. Die Zellen wurden über Nacht bzw. bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Vor der Messung wurden die Zellen für 5 min bei 6000 rpm an der Tischzentrifuge pelletiert, in PBS gewaschen und erneut pelletiert. Anschließend wurden sie in 400 μ l PBS gelöst, mit 50 μ l RNase (1 mg/ml) versetzt und für 20 min im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von DAPI in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml und Inkubation für 10 min auf Eis wurde jede Probe in ein FACS-Röhrchen

überführt. Für jede Probe wurde die Intensität des Farbstoffes in 50.000 Einzelevents bzw. Zellen im Pacific Blue-Kanal gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wurde FlowJo™ verwendet.

2.4 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel 2018 und GraphPad Prim 8.0.1 verwendet. Die Messwerte wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mittels (Welchs) student t-tests oder mittels Anova-Tests durchgeführt. Bei einem P -Wert von $< 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$, **** $P < 0,0001$. Sofern keine weiteren Angaben gemacht wurden, beziehen sich die angegebenen P -Werte auf die mit DMSO behandelten Zellen, welche als Kontrolle dienten.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von Zelltod und Autophagie durch ATP-Depletion

Zunächst haben wir untersucht, ob die ausgewählten Substanzen in der Lage sind, Zelltod in HCT-116-Zellen zu induzieren. Die Messung des spezifischen Zelltodes erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin V und DAPI. Die Einzelbehandlung der Zellen mit ABT-199 zeigte keine signifikante Zelltodinduktion. Der spezifische Zelltod betrug 0,4 % nach 24 h und 6,5 % nach 48 h (Abbildung 4A). Unter der alleinigen DMF-Gabe konnten wir mit einem spezifischen Zelltod von 10,0 % nach 24 h und 28,0 % nach 48 h eine signifikante Zelltodinduktion beobachten. Die Kombination der beiden Wirkstoffe konnte die höchste Rate des spezifischen Zelltodes induzieren. Der spezifische Zelltod war nach 24 h bei 16,7 % und nach 48 h bei 39,0 % durch die Kombination beider Wirkstoffe (Abbildung 4A).

Die Behandlung der Zellen mit dem irreversiblen Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD führte bei keiner der beiden Monotherapien zu einem signifikanten Unterschied in der Zelltodinduktion (Abbildung 4B). Bei der Kombinationstherapie zeigte sich hingegen ein signifikanter Rückgang der Zelltodinduktion durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Z-VAD. Da Caspasen ein essenzieller Bestandteil des apoptotischen Zelltodweges sind, ist dies ein Hinweis darauf, dass Apoptose bei der Zelltodinduktion durch die Kombination aus ABT-199 und DMF eine Rolle spielt.

Um zu untersuchen, ob auch andere Zelltodarten durch die von uns verwendeten Therapien induziert werden, war der nächste Schritt die Untersuchung der Autophagie. LC3B-II ist zur Bildung des Autophagosoms notwendig und stellt den Goldstandard zum Nachweis von Autophagie dar. Die zellulären LC3B-II-Spiegel wurden durch Western Blot-Analysen bestimmt (Abbildung 4C). Ein signifikanter Anstieg der LC3B-II-Spiegel war unter der Therapiekombination aus 10 μ M ABT-199 und 25 μ M DMF sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Behandlungsdauer zu beobachten. Auch bei der Kombination von ABT-199 mit 50 μ M DMF zeigten sich die LC3B-II-Spiegel nach 24 h und 48 h erhöht. Nach 48 h fielen die relativen LC3B-II-Spiegel für beide Kombinationstherapien höher aus als nach 24 h. DMF führte als Monotherapie in einer Konzentration von 50 μ M zu erhöhten LC3B-II-Spiegeln nach 24 h. Nach 48 h Behandlungsdauer war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.

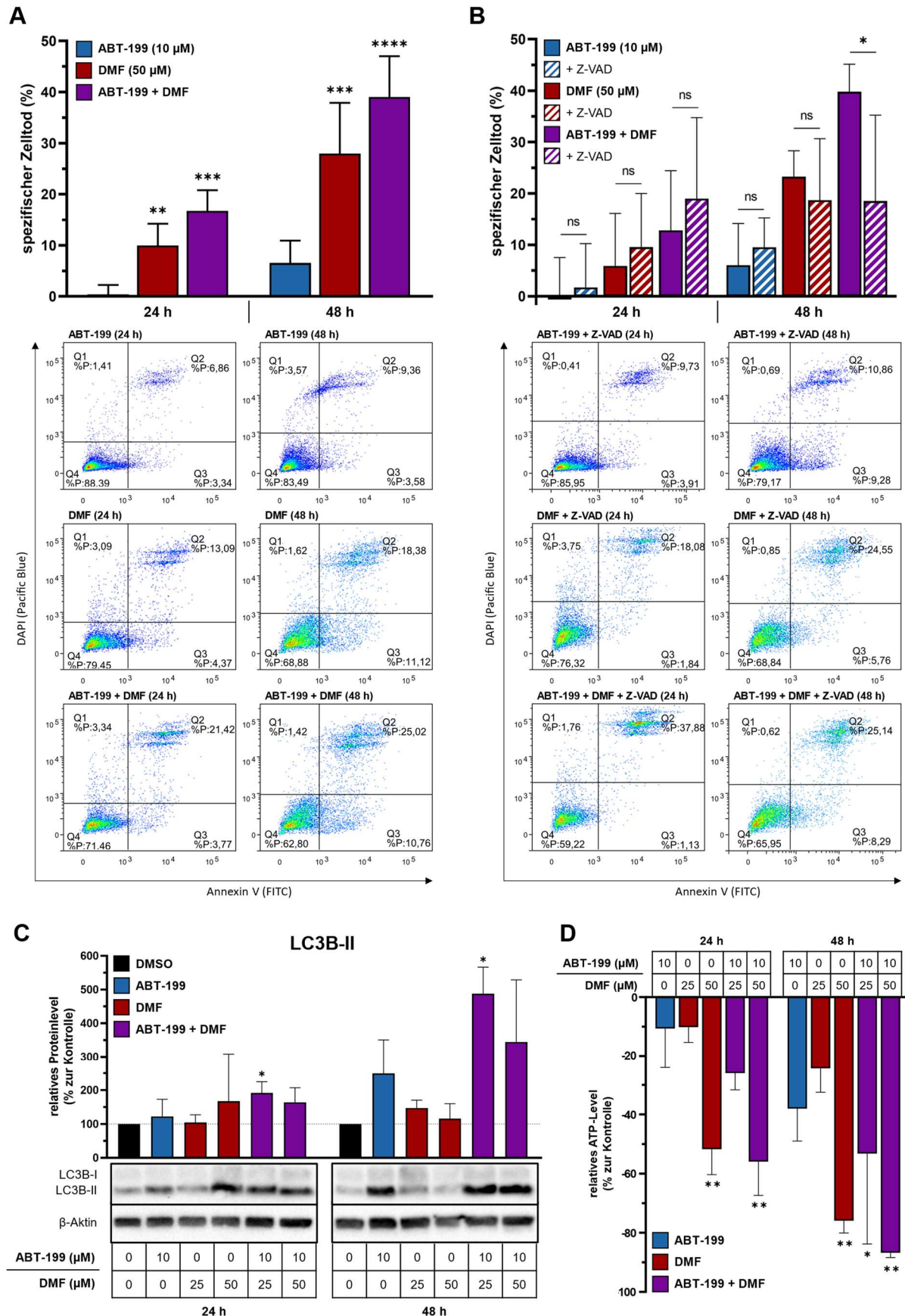


Abbildung 4: (A-B) Induktion des Zelltods in HCT-116-Zellen durch ABT-199, DMF und die Kombination der beiden Wirkstoffe. Durchflusszytometrische Untersuchung des spezifischen Zelltods mittels Annexin V/DAPI-Färbung (A) ohne und (B) mit Caspase-Inhibition durch Z-VAD (50 µM). Die Zellen

Abbildung 4 (Fortsetzung) wurden mit DMSO als Kontrolle, 10 μ M ABT-199, 25 oder 50 μ M DMF oder der Kombination von 10 μ M ABT-199 mit 25 oder 50 μ M DMF für 24 h und 48 h behandelt (n = 3). (C) Induktion der Autophagie in HCT-116-Zellen unter kombinierter ABT-199- und DMF-Therapie. Western-Blot-Analyse der LC3B-Expression in HCT-116-Zellen, die mit DMSO (Kontrolle), 10 μ M ABT-199, 25 oder 50 μ M DMF oder der Kombination von 10 μ M ABT-199 mit 25 oder 50 μ M DMF behandelt wurden. Densitometrische Quantifizierung (n = 3) und repräsentative Western-Blot-Analyse nach 24 h und 48 h. (D) Abnahme von ATP unter DMF, ABT-199 und der Kombination von beiden. Luminometrische Messung der ATP-Menge in HCT-116-Zellen. Relative Abnahme der ATP-Menge im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) in % (n = 2) nach Behandlung mit 10 μ M ABT-199, 25 oder 50 μ M DMF oder der Kombination von 10 μ M ABT-199 mit 25 oder 50 μ M DMF für 24 h und 48 h. *P < 0,05; **P < 0,005.

Unter der ABT-199-Monotherapie bestand nach 24 h ein geringer Unterschied zur Kontrolle. Nach 48 h waren die zellulären LC3B-Spiegel erhöht. Sowohl die Monotherapie mit 10 μ M ABT-199 als auch die mit 50 μ M DMF wiesen auf Autophagie hin. Die Kombinationstherapie konnte Autophagie signifikant induzieren.

Autophagie ist eine mögliche Reaktion auf ein mangelndes Energieangebot in der Zelle. Deshalb haben wir einen luminometrischen Zellviabilitätstest durchgeführt, um die zelluläre ATP-Menge zu bestimmen (Abbildung 4D). Unter allen Behandlungsbedingungen zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der zellulären ATP-Menge im Vergleich zur Kontrolle. Die Monotherapien mit 10 μ M ABT-199 oder 25 μ M DMF reduzierten die ATP-Spiegel nach 24 h jeweils um ca. 10 %. Bei der Kombination beider Wirkstoffe in den jeweiligen Konzentrationen zeigte sich eine Abnahme der ATP-Spiegel um ca. 25 % nach demselben Behandlungszeitraum. Der größte Effekt konnte unter der Kombination aus 10 μ M ABT-199 und 50 μ M DMF beobachtet werden. Die zellulären ATP-Spiegel waren hierbei nach 24 h um ca. 56 % und nach 48 h um ca. 87 % erniedrigt. Die reduzierten zellulären ATP-Spiegel sprechen für eine verminderte Viabilität der HCT-116-Zellen unter Behandlung mit DMF, ABT-199 und der Kombination beider Wirkstoffe. Im Folgenden wurden mögliche Ursachen sowie die Konsequenzen des ATP-Verlustes untersucht.

3.2 Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials durch DMF

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir, welche durch die Wirkstoffe induzierten zellulären Prozesse für die in HCT-116-Zellen beobachteten, erniedrigten ATP-Spiegel verantwortlich sind. Der wichtigste ATP-Lieferant in der Zelle ist die

mitochondriale Atmungskette. Die mitochondriale Atmungskette befördert Protonen über verschiedene Proteinkomplexe in den Intermembranraum des Mitochondriums und baut somit das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) auf. Durch Veränderungen am $\Delta\Psi_m$, lassen sich Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der Atmungskette ziehen. Das $\Delta\Psi_m$ wurde durchflusszytometrisch gemessen, nachdem die für 24 h bzw. 48 h behandelten Zellen mit Tetramethylrhodamine-Ethylester (TMRE) angefärbt wurden. Die mittlere Farbstoffintensität der behandelten Zellen wurde im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Wie in Abbildung 5A dargestellt, resultierte die Behandlung der Zellen mit DMF, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit ABT-199, in einer signifikanten Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$. Hierbei ließ sich eine Abhängigkeit des Effekts von der verwendeten Wirkstoffdosis und der Inkubationsdauer beobachten. 50 μM DMF führten zu einer stärkeren Hyperpolarisation als 25 μM . Zudem war die Hyperpolarisation nach 48 h ausgeprägter als nach 24 h. Die Monotherapie mit ABT-199 hatte keinen Einfluss auf das $\Delta\Psi_m$.

Unsere Hypothese ist, dass DMF die ATP-Synthase modifiziert und dadurch inhibiert. Der Protonenfluss kann nicht mehr entsprechend dem durch die Atmungskette aufgebauten Protonengradienten stattfinden. Als Folge kommt es zu Akkumulation von Protonen im Intermembranraum der Mitochondrien und damit zur Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$. Eine weitere Folge ist die verminderte mitochondriale ATP-Produktion über die ATP-Synthase, was die erniedrigten zellulären ATP-Spiegel erklärt.

In Abbildung 5B wurde FCCP als Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette eingesetzt. Dieser führt zu einer Porenbildung in der inneren mitochondrialen Membran und somit zu einem Protonenfluss an der ATP-Synthase vorbei. Der Fluss findet entsprechend des Protonengradienten zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix statt. Die DMF-behandelten Zellen wurden hierfür nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h mit 30 μM FCCP versetzt. Zur Kontrolle der Funktion des mitochondrialen Entkopplers erfolgte außerdem eine Monotherapie von zuvor unbehandelten Zellen mit FCCP.

FCCP führte bei unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Hypopolarisation des $\Delta\Psi_m$. Bei zuvor mit DMF-behandelten Zellen konnte FCCP die DMF-induzierte Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ wieder reduzieren. Die Hypopolarisation des $\Delta\Psi_m$ unter

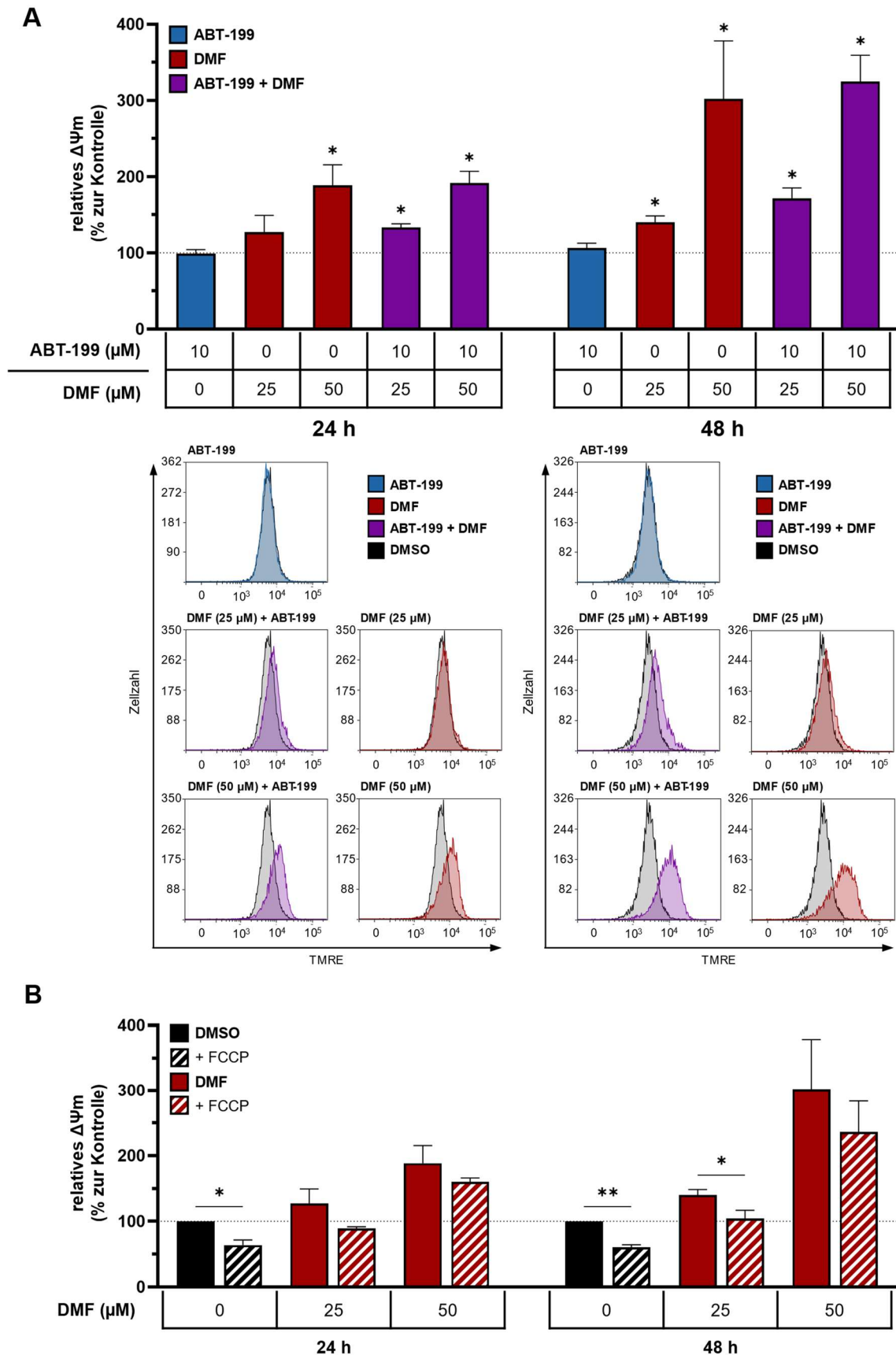


Abbildung 5: (A) DMF-induzierte Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Durchflusszytometrische Analyse von $\Delta\Psi_m$ in HCT-116-Zellen, relative Änderungen in % ($n = 3$) nach Behandlung mit 0,15 % DMSO als Kontrolle, 10 μM ABT-199, 25 oder 50 μM DMF oder der Kombination

Abbildung 5 (Fortsetzung) von 10 μM ABT-199 mit 25 oder 50 μM DMF (wie angegeben) für 24 h und 48 h. Quantifizierung der durchflusszytometrischen Daten (oben) und FACS-Histogramme (unten). (B) Reduktion der DMF-induzierten Hyperpolarisation von $\Delta\Psi\text{m}$ durch den mitochondrialen Entkoppler FCCP. Dargestellt sind relative $\Delta\Psi\text{m}$ in % ($n = 3$) nach Behandlung mit 0,15 % DMSO (Kontrolle), 25 oder 50 μM DMF jeweils in Gegenwart oder Abwesenheit des mitochondrialen Entkopplers FCCP (30 μM) für 24 h und 48 h. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$.

FCCP zeigt, dass FCCP als Entkoppler der Atmungskette funktioniert. Der Protonengradient zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix kann nun effektiver abgebaut werden als dies nur über die ATP-Synthase möglich wäre. Als Folge sinkt das $\Delta\Psi\text{m}$. Die Reduktion der DMF-induzierten Hyperpolarisation durch FCCP stützt die Hypothese, dass DMF die ATP-Synthase hemmt. Der Protonenfluss kann unter Einsatz des mitochondrialen Entkopplers FCCP unabhängig von der ATP-Synthase erfolgen, wodurch das $\Delta\Psi\text{m}$ im Vergleich zur DMF-Monotherapie sinkt.

3.3 Hemmung der mitochondrialen Respiration durch DMF

Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette durch DMF zeigt sich auch im reduzierten mitochondrialen O_2 -Verbrauch. Die basale Respiration war unter DMF-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von DMF. Um die verschiedenen Sequenzen der Atmungskette zu charakterisieren, wurden verschiedene Wirkstoffe hinzugefügt, welche einen definierten Einfluss auf die Atmungskette haben (Abbildung 6A, B).

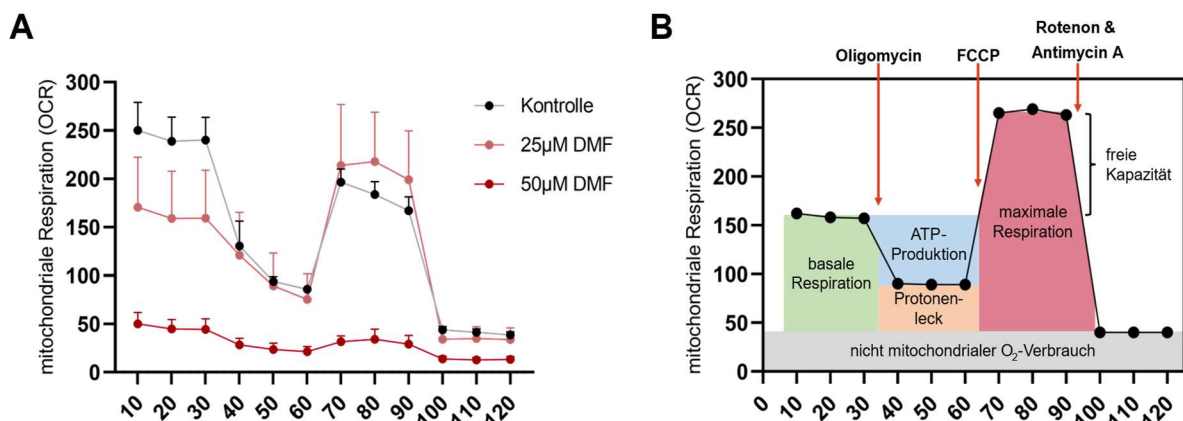


Abbildung 6: Reduzierter zellulärer O_2 -Verbrauch unter DMF durch Hemmung der mitochondrialen Respiration. Messung des O_2 -Verbrauchs in HCT-116-Zellen im Seahorse-Experiment nach Behandlung mit 0,15 % DMSO (Kontrolle), 25 μM oder 50 μM DMF für 24 h. (A) Mitochondriale Respiration entsprechend dem Kurvenverlauf der O_2 -Verbrauchsrate (OCR). Ergebnis einer Messung mit Triplikaten ($n = 1$). (B) Schematische Darstellung der mitochondrialen Respiration. Die Basalatmung wurde nach Subtraktion der nicht-mitochondrialen Atmung ermittelt. Die ATP-Produktion und das Protonenleck wurden durch Zugabe von Oligomycin erfasst. Die maximale Atmung wurde durch Zugabe von FCCP berechnet. Die freie Kapazität wurde durch Subtraktion der Basalatmung von der maximalen Atmung gemessen.

Oligomycin hemmt die ATP-Synthase. Durch diese Hemmung wird die gesamte mitochondriale Atmungskette in ihrer Aktivität beeinträchtigt, was in einer verminderten mitochondrialen Respiration resultiert. Nach Zugabe von 1 μM Oligomycin zum Zeitpunkt von 30 min konnte eine Abnahme des O_2 -Verbrauchs unter allen Bedingungen beobachtet werden. Die Differenz zwischen basaler Respiration und Respiration nach Oligomycin-Gabe fiel dabei für die DMSO-behandelten Zellen am größten aus.

FCCP ist ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette. Der Protonenfluss zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix kann unter FCCP-Einfluss unabhängig von der ATP-Synthase stattfinden. Hierdurch kommt es zu einer maximal gesteigerten Aktivität der Atmungskette mit maximalem O_2 -Verbrauch. Unter 1,5 μM FCCP, welches nach 60 min hinzugefügt wurde, stieg der O_2 -Verbrauch unter 25 μM DMF sowie der Kontrolle deutlich. Die mit 50 μM DMF behandelten Zellen zeigten nur einen minimalen Anstieg der mitochondrialen Respiration.

Abschließend wurde nach 90 min eine 0,5 μM Mischung des Komplex-I-Inhibitors Rotenon und des Komplex-III-Inhibitors Antimycin A hinzugefügt. Durch diese Kombination wird die mitochondriale Respiration vollständig gehemmt. Der noch verbleibende O_2 -Verbrauch lässt sich auf Prozesse außerhalb der Mitochondrien zurückführen. Die Verwendung dieser beiden Wirkstoffe führte unter allen Behandlungsbedingungen zu einer kompletten Abnahme des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs, so dass der nicht-mitochondriale O_2 -Verbrauch gemessen werden konnte.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass DMF über eine Inhibition der mitochondrialen Atmungskette den O_2 -Verbrauch der HCT-116-Zellen reduziert.

3.4 Inhibition der Zellproliferation durch Zellzyklus-Arrest

DMF modifiziert die ATP-Synthase in ihrer Funktionalität. Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die geringeren ATP-Spiegel auf die Zellen haben. Als wichtiger Energielieferant ist ATP essenziell für die Zellproliferation. Diese wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden die Zellen vor der Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen mit einem Cell Proliferation Staining Reagent

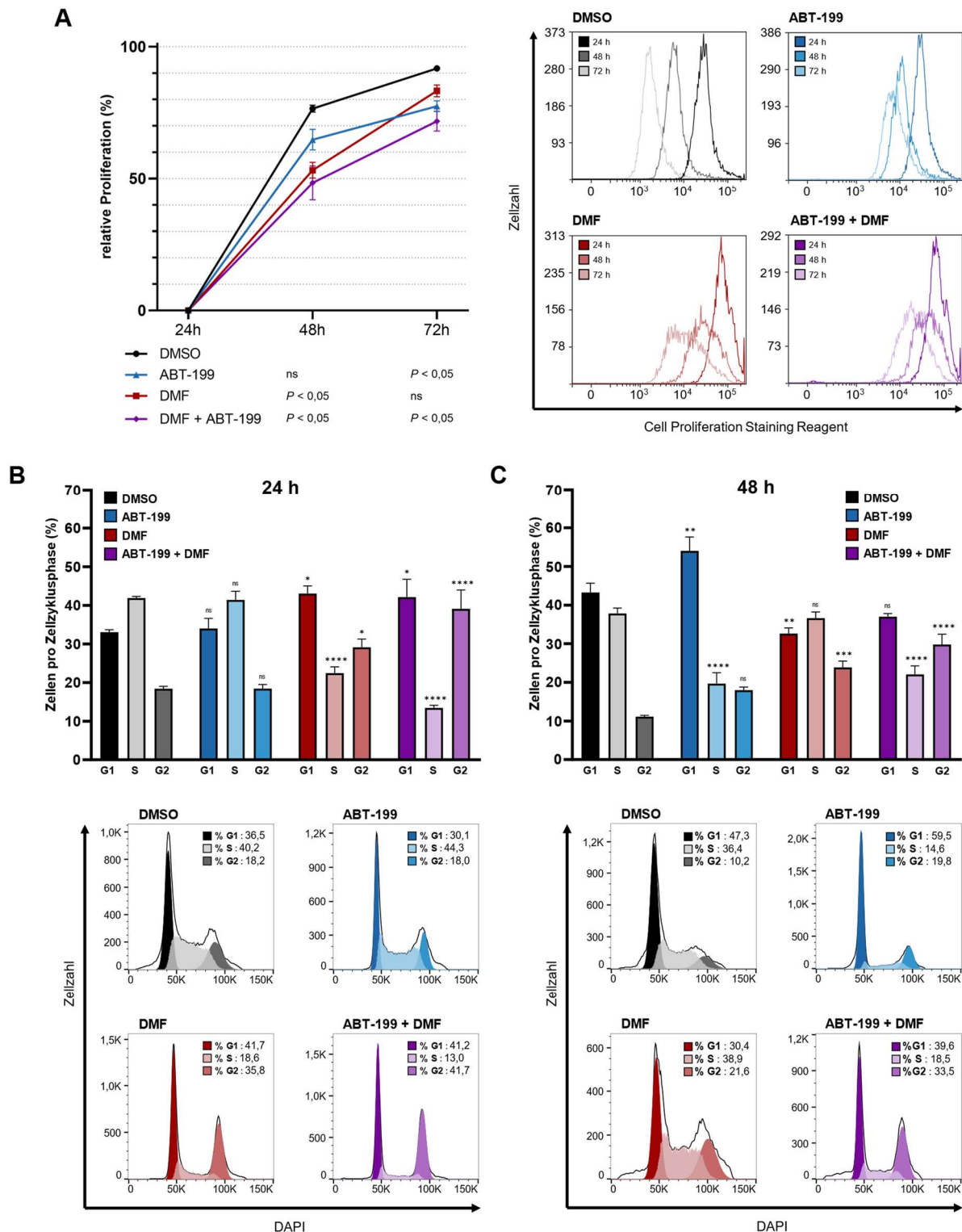


Abbildung 7: (A) Reduzierte Zellproliferation durch ABT-199, DMF und deren Kombination. Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellproliferation in HCT-116-Zellen nach Behandlung mit 0,3 % DMSO (Kontrolle), 10 μ M ABT-199, 50 μ M DMF oder der Kombination beider Wirkstoffe für bis zu 72 h. Relative Zellproliferation in % bezogen auf den Messwert nach 24 h ($n = 3$, links) und repräsentative Messungen (rechts). (B-C) Zellzyklus-Arrest durch ABT-199, DMF und deren Kombination. Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellzyklusverteilung in HCT-116-Zellen, nach Behandlung mit 0,15 % DMSO (Kontrolle), 10 μ M ABT-199, 50 μ M DMF oder der Kombination beider Wirkstoffe. Quantifizierung der Zellen in jeder Zellzyklusphase ($n = 3$, oben) und repräsentative Messungen (unten) nach (B) 24 h und (C) 48 h. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$.

angefärbt, welches sich im Zytosol anreichert und mit jeder Zellteilung in etwa gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Mit zunehmender Proliferation nimmt die Farbstoffintensität also immer weiter ab. Die Farbstoffintensität wurde nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Der nach 24 h gemessene Wert, wurde als Ausgangswert für die nachfolgende Proliferation verwendet.

Sowohl die beiden Monotherapien als auch die Kombination der beiden Wirkstoffe hatten eine verminderte Zellproliferation zur Folge (Abbildung 7A). Durch die Monotherapie mit ABT-199 war die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h um 11,8 % und nach 72 h signifikant um 14,4 % vermindert. Unter der alleinigen DMF-Gabe zeigte sich bereits nach 48 h mit 23,3 % Proliferationsinhibition ein signifikanter Effekt. Nach 72 h Behandlungsdauer betrug die Proliferationsinhibition noch 8,5 %. Die Kombination beider Wirkstoffe konnte die Zellproliferation am stärksten vermindern. Diese war nach 48 h signifikant um 28,2 % und nach 72 h signifikant um 20,0 % erniedrigt.

Folglich resultieren die durch die Medikamente hervorgerufenen erniedrigten ATP-Spiegel in einer verminderten Zellproliferation. Die Kombinationstherapie hat hierbei einen größeren Effekt als die Monotherapien. Interessant ist, dass die nach 48 h durch DMF hervorgerufene ausgeprägte Proliferationsinhibition nach 72 h kaum noch zu beobachten ist. Wir führen dies auf die kurze Halbwertszeit von DMF zurück (Schroeder et al. 2017).

Neben den erniedrigten, zellulären ATP-Spiegeln wollten wir weitere Ursachen identifizieren, die für die verminderte Proliferation der HCT-116 Zellen unter den gewählten Behandlungen verantwortlich sind. Werden Zellen beim Fortschreiten des Zellzyklus gehindert, arretieren sie in einer der Zellzyklus-Phasen und können somit nicht weiter proliferieren.

Zur Untersuchung des Zellzyklus wurde die DNA der behandelten Zellen nach 24 h und 48 h mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Da die Zellen abhängig von der Zellzyklus-Phase, in welcher sie sich befinden, unterschiedliche Mengen an DNA aufweisen, konnte so durchflusszytometrisch bestimmt werden, wie viele Zellen sich in welcher Phase des Zellzyklus befinden.

Abbildung 7B zeigt einen signifikanten, kombinierten G1- und G2-Phasen-Arrest sowie eine signifikant erniedrigte S-Phase bei den mit DMF oder der Kombinationstherapie

behandelten Zellen nach 24 h. Vor allem bei der Kombinationstherapie überwiegte der G2-Phasen-Arrest. Die durch die Kombinationstherapie hervorgerufenen Veränderungen am Zellzyklus waren stärker ausgeprägt als die durch die DMF-Monotherapie. Nach der Einzelbehandlung mit ABT-199 für 24 h ließen sich keine Veränderungen am Zellzyklus beobachten.

Nach 48 h Behandlungsdauer normalisierte sich der Zellzyklus unter DMF-Monotherapie (Abbildung 7C). Es bestand noch ein signifikanter G2-Phasen-Arrest. Die S-Phase war gegenüber der Kontrolle unverändert und die G1-Phase signifikant erniedrigt. Im Falle der Kombinationstherapie konnte auch nach 48 h noch ein signifikanter G2-Phasen-Arrest sowie eine signifikant erniedrigte S-Phase beobachtet werden. Die ABT-199-Monotherapie resultierte in einem signifikanten G1-Phase-Arrest und signifikant erniedrigter S-Phase.

Im Zuge der verschiedenen Behandlungen kommt es also zum Zellzyklus-Arrest, welcher in einer verminderten Zellproliferation resultiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Zellproliferationsbestimmung war auch beim Zellzyklus der Effekt durch die Kombinationstherapie am stärksten ausgeprägt. Ebenso ließ sich auch hier bei den Einzelbehandlungen ein erst später einsetzender Effekt von ABT-199 und eine kurze Wirkungsdauer von DMF beobachten.

3.5 Veränderungen an den zellulären Cyclin- und CDK-Spiegeln

Um besser zu verstehen, wie DMF und ABT-199 in den Zellzyklus eingreifen, wurden Western Blot Analysen der Zellzyklus-regulierenden Cykline und Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) durchgeführt (Abbildung 8A, B).

Nach 24 h ließ sich eine Abnahme der Proteinmenge von Cyclin A2 in allen Bedingungen beobachten. Diese war für die Kombination von 10 μ M ABT-199 mit entweder 25 oder 50 μ M DMF signifikant. Auch die Proteinlevel von Cyclin B1 waren unter der Kombinationstherapie von ABT-199 und 25 μ M DMF signifikant erniedrigt. Für die Monotherapie mit ABT-199 sowie die Kombination mit 50 μ M DMF konnte ebenfalls eine reduzierte Cyclin B1-Menge festgestellt werden. Die Monotherapie mit DMF ergab für 25 μ M eine leichte Erhöhung und für 50 μ M keine Veränderung der zellulären Cyclin B1-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle. Cyclin D1 zeigte sich durch die

ABT-199-Monotherapie signifikant erniedrigt. Unter allen weiteren Bedingungen waren keine oder nur geringe Veränderungen der Proteinlevel von Cyclin D1 feststellbar. Die Menge an Cyclin E1 in den Zellen war durch DMF in beiden verwendeten Konzentrationen sowie auch durch die Kombination von DMF mit ABT-199 erhöht. Im Falle der Kombination von 50 μ M DMF mit ABT-199 war diese Erhöhung signifikant. Die Monotherapie mit ABT-199 hatte keinen Effekt auf die zellulären Cyclin E1-Spiegel.

Nach 48 h war die Cyclin A2-Menge durch Monotherapie mit 25 oder 50 μ M DMF erhöht. ABT-199 als Einzelbehandlung konnte keine Veränderungen der Cyclin A2-Spiegel hervorrufen. Bei der Kombination beider Wirkstoffe zeigte sich Cyclin A2 geringfügig erniedrigt. Die Cyclin B1-Spiegel wurden durch 25 μ M DMF signifikant erhöht. Auch 50 μ M DMF führten zur Erhöhung der Cyclin B1-Spiegel. ABT-199 sowie die Kombination mit 25 oder 50 μ M DMF reduzierten die Cyclin B1-Spiegel leicht. An den Cyclin D1-Spiegeln ließen sich unter allen Behandlungsbedingungen nur geringe Veränderungen beobachten. So führten die DMF-Monotherapien zu einer leichten Erhöhung, ABT-199 sowie die Kombinationstherapien zu einer leichten Erniedrigung der Proteinspiegel. Die Cyclin E1-Spiegel zeigten sich auch nach 48 h unter DMF- oder Kombinationsbehandlung erhöht. Die ABT-199-Monotherapie hatte erneut keinen Effekt auf Cyclin E1.

Die beobachteten Veränderungen an den zellulären Cyclin-Spiegeln liefern Erklärungen für die Effekte der Wirkstoffe auf den Zellzyklus. Cyclin A2 ist wichtig für das Fortschreiten des Zellzyklus in der S-Phase und den Übertritt in die G2-Phase (Hume et al. 2020). Signifikant erniedrigte Cyclin A2-Spiegel unter der Behandlung mit ABT-199 kombiniert mit 25 oder 50 μ M DMF für 24 h resultieren in dem signifikanten G2-Phase-Arrest, welcher unter der Kombinationstherapie nach demselben Behandlungszeitraum zu beobachten war. Analog dazu lässt sich auch der G2-Phasen-Arrest unter der DMF-Monotherapie erklären.

Die durch die Kombinationstherapie hervorgerufene Reduktion von Cyclin B1, welches für den Übergang der G2-Phase zur Mitose benötigt wird, führt ebenso zum G2-Phasen-Arrest (Müllers et al. 2014). Nach 24 h zeigt sich Cyclin D1 unter ABT-199-Monotherapie signifikant erniedrigt. Da Cyclin D1 für den Progress in der G1-Phase des Zellzyklus relevant ist, kommt es durch die Reduktion dieses Proteins zum G1-

Phasen-Arrest (Rubin et al. 2020). Dieser konnte in den Zellzyklus-Analysen unter der Therapie mit 10 μ M ABT-199 jedoch erst nach 48 h beobachtet werden. Interessant

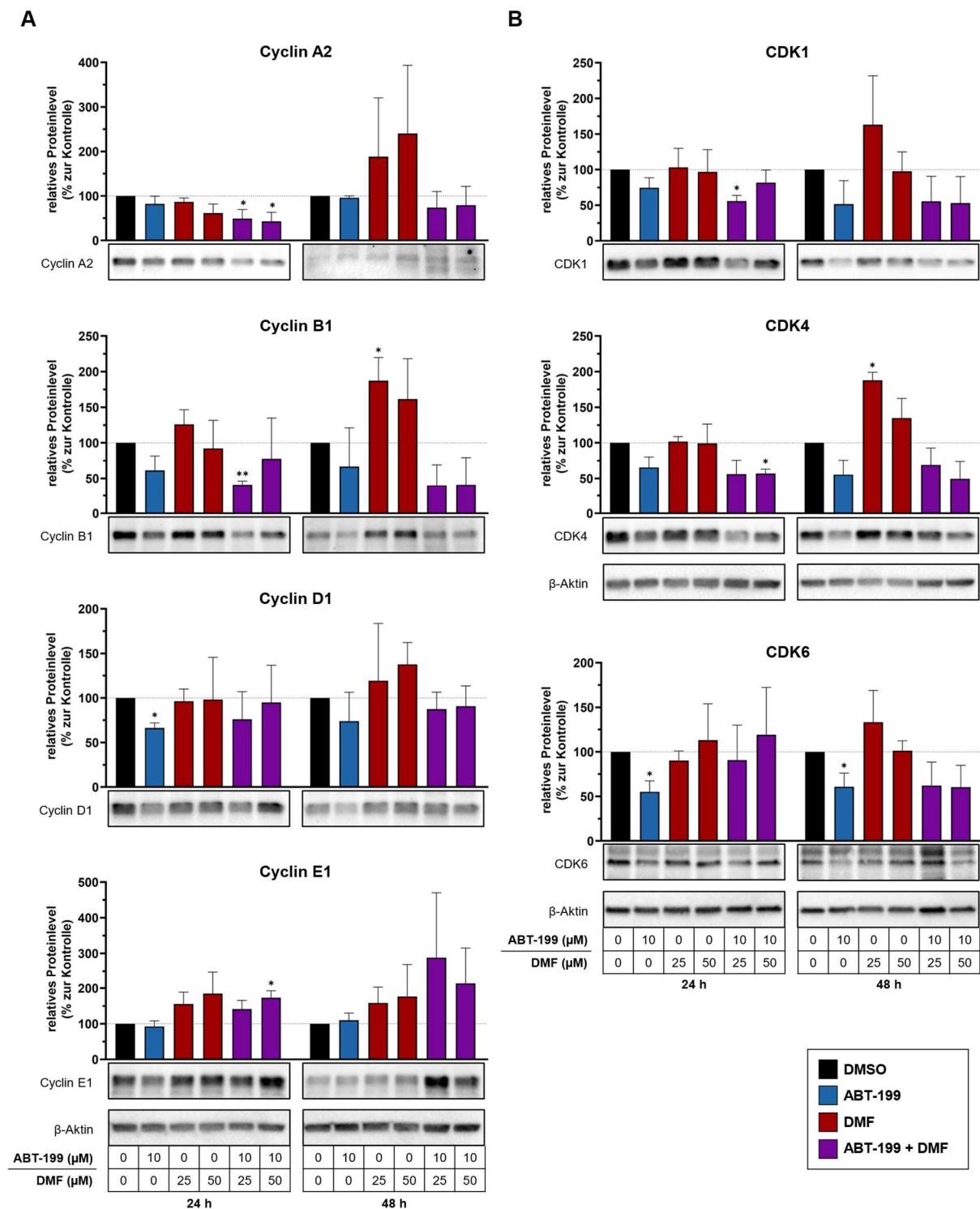


Abbildung 8: Auswirkungen von DMF, ABT-199 und der Kombination beider Wirkstoffe auf die zellulären Cyclin- und CDK-Spiegel. Western Blot Analysen von HCT-116-Zellen, die mit 0,3 % DMSO (Kontrolle), 10 μ M ABT-199, 25 oder 50 μ M DMF oder der Kombination von 10 μ M ABT-199 mit 25 oder 50 μ M DMF für 24 h und 48 h behandelt wurden. Densitometrische Quantifizierung (n = 3) und repräsentative Western Blots für (A) Cyclin A2, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E1 und (B) CDK1, CDK4 und CDK6 nach 24 h und 48 h. * P < 0,05; ** P < 0,005.

ist, dass die Cyclin E1-Spiegel sowohl unter den DMF-Monotherapien als auch unter den Kombinationstherapien erhöht waren.

Wir gehen davon aus, dass Cyclin E1 in der Zelle akkumuliert, da ein weiteres Fortschreiten im Zellzyklus durch erniedrigte Cyclin A2-Spiegel und damit dem G2-Phasen-Arrest nicht möglich ist. Cyclin E1 ist wichtig für den Eintritt und Progress der S-Phase (Leal-Esteban und Fajas 2020). Diese zeigt sich unter DMF- oder Kombinationstherapie nach 24 h signifikant erniedrigt. Durch die erhöhten Cyclin E1-Spiegel befinden sich hier kaum Zellen in der S-Phase.

Wir konnten nach 48 h beobachten, dass sich der Zellzyklus unter DMF-Monotherapie wieder normalisiert, und erklären diese Beobachtung mit der kurzen Halbwertszeit von DMF. Auch in den Western Blot-Analysen der Cycline lässt sich die kurze Wirkungsdauer von DMF erkennen. Alle untersuchten Cyclin-Spiegel waren nach 48 h unter DMF-Behandlung erhöht. Wir vermuten, dass die HCT-116-Zellen auf den zuvor von DMF hervorgerufenen Effekt reagieren und mit einem überschießenden Ablauf des Zellzyklus kompensieren. Im Falle von ABT-199 sowie den Kombinationstherapien lassen sich nach 48 h dieselben Effekte beobachten wie nach 24 h, wenn auch teilweise in abgeschwächter Form. Auch hier scheint die Wirkung auf die Cycline also bereits nachzulassen.

Durch 10 μM ABT-199 waren die Proteinspiegel von CDK1, CDK4 und CDK6 sowohl nach 24 h als auch nach 48 h erniedrigt. Bei CDK6 kam es hierbei nach beiden Behandlungszeiträumen zu einer signifikanten Reduktion. Die Kombination aus ABT-199 und 25 μM DMF zeigte nach 24 h eine signifikante Erniedrigung der CDK1-Spiegel. Bei der Kombination von ABT-199 mit 50 μM DMF konnten die CDK4-Spiegel nach 24 h signifikant reduziert werden. Für CDK6 ließ sich nach 24 h kein Effekt beobachten. Nach 48 h waren die Proteinspiegel aller untersuchten CDKs für beide gewählten Kombinationstherapien erniedrigt. DMF als Monotherapie zeigte nach 24 h keinen Einfluss auf die unterschiedlichen CDK-Spiegel. Nach 48 h zeigte sich eine Erhöhung der CDK1- und CDK6-Spiegel sowie eine signifikante Erhöhung der CDK4-Spiegel unter 25 μM DMF. Die Behandlung der Zellen mit 50 μM DMF führte nach 48 h nur bei CDK4 zu einer Erhöhung der Proteinspiegel, CDK1 und CDK6 waren im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Die signifikante Reduktion der CDK6-Spiegel sowie die Reduktion der CDK4-Spiegel nach 24 h und 48 h unter Behandlung mit 10 μ M ABT-199 resultieren im G1-Phasen-Arrest, welcher nach 48 h beobachtet wurde. Sowohl CDK4 als auch CDK6 interagieren mit Cyclin D1, um das Fortschreiten des Zellzyklus in der G1-Phase zu ermöglichen.

CDK1 kann mit verschiedenen Cyclinen, wie etwa Cyclin A2 oder Cyclin B1, interagieren. Ist es nicht in ausreichender Menge vorhanden, kann es zum Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase kommen (Leal-Esteban und Fajas 2020). Bei der Kombination von ABT-199 mit 25 μ M DMF für eine Behandlungsdauer von 24 h kam es zur signifikanten Reduktion der Proteinspiegel von Cyclin A2, Cyclin B1 sowie CDK1. Übereinstimmend damit konnte bei der Behandlung der Zellen mit ABT-199 und 50 μ M DMF für 24 h ein signifikanter G2-Phasen-Arrest beobachtet werden.

Ein ausgeprägter Zellzyklus-Arrest zeigte sich unter DMF-Monotherapie nur nach 24 h. Aufgrund der kurzen Wirkungsdauer von DMF normalisierte sich der Zellzyklus wieder nach 48 h. Damit übereinstimmend konnten wir die für den Zellzyklus-Arrest verantwortlichen erniedrigten Cyclin A2-Spiegel nur nach 24 h beobachten. Auf die Proteinspiegel der CDKs hatte DMF im selben Behandlungszeitraum keinen Einfluss. Ebenso wie die Cyclin-Spiegel waren auch die CDK-Spiegel nach 48 h unter DMF-Behandlung erhöht. Unsere Hypothese ist, dass die HCT-116-Zellen mit erhöhten Proteinspiegeln auf den zuvor verlangsamten Ablauf des Zellzyklus reagieren, nachdem die Wirkung von DMF abgeklungen ist.

Bei der Behandlung der Kolorektalen Karzinom-Zelllinie HCT-116 mit ABT-199, DMF oder der Kombination beider Wirkstoffe kam es zur Abnahme der zellulären ATP-Spiegel. Die DMF-Behandlung beeinträchtigte die Funktion der mitochondrialen Atmungskette, was sich in der Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ sowie einem reduzierten mitochondrialen O_2 -Verbrauch ausdrückte und zu den reduzierten ATP-Spiegeln führte. Als Folge des ATP-Verlustes war unter allen Behandlungsoptionen eine reduzierte Zellproliferation zu beobachten. Mitverantwortlich für die Proliferationsinhibition waren auch Veränderungen der Cyclin- und CDK-Spiegel und der dadurch hervorgerufene Zellzyklus-Arrest. Als Kompensationsmechanismus der Zellen auf das verminderte Energieangebot zeigte sich die Induktion von Autophagie vor allem durch die Kombinationstherapie aus ABT-199 und DMF.

4 Diskussion

Das Mitochondrium ist als zentraler zellulärer Energielieferant, Signalplattform und Regulator der intrinsischen Apoptose ein attraktives Ziel, um Tumorwachstum und Metastasierung solider Tumore einzudämmen. Da das Mitochondrium diese Funktionen auch in gesunden Zellen ausüben muss, bedarf es gezielter und hoch spezifischer Ansätze, die es ermöglichen, nur bzw. vorwiegend maligne Zellen zu treffen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Fumarsäureester DMF spezifisch Proteine mit freien Thiolgruppen angreifen kann. Diese werden dann über eine Monomethylsuccinylierung modifiziert und dadurch inhibiert (Schroeder et al. 2017). Auf diese Weise führt DMF u.a. zu einer Inhibition des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Da in der Folge wichtige NF- κ B-Zielgene, wie cFLIPs oder IAPs, nicht mehr exprimiert werden, kommt es zum Zelltod in NF- κ B-abhängigen Malignomen (Nicolay et al. 2016; Schroeder et al. 2017; Froehlich et al. 2019). Wir haben in dieser Arbeit auch Veränderungen im Energiehaushalt der Zelle nachgewiesen. DMF induziert eine erniedrigte mitochondriale Atmung, die wahrscheinlich durch eine Monosuccinylierung der F1 α -Untereinheit der ATP-Synthase verursacht wird (siehe Kap. 3.3). Durch die Reduktion des Elektronenflusses in der mitochondrialen Atmungskette kommt es zu einer Abnahme der zellulären ATP-Produktion. ATP ist der wichtigste zelluläre Energieträger und spielt eine entscheidende Rolle beim Ablauf energiebedingender Prozesse in der Zelle. Die ausreichende Bereitstellung von ATP wird für das Überleben, die Proliferation und die Metastasierung von Malignomen benötigt. Dabei sind viele Arten von malignen Zellen auf die Funktion der mitochondrialen Atmungskette angewiesen (Ghosh et al. 2020).

Viele Tumore, so auch das kolorektale Karzinom, weisen eine erhöhte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern auf. Durch die Überexpression dieser Proteine werden maligne Zellen oftmals unempfindlich für Apoptoseinduktion und entwickeln somit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und zielgerichteten Therapien. Gleichzeitig stellen überexprimierte Bcl-2-Proteine ein mögliches Angriffsziel für neue Antitumor-Therapien dar (Hafezi und Rahmani 2021; Michalski et al. 2023). BH3-only-Proteine sind die natürlichen Inhibitoren der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder. Das Verhältnis der beiden Proteingruppen ist entscheidend dafür, ob es zur Apoptoseinduktion kommt. Da bei vielen Tumoren die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine durch Überexpression überwiegen, ist der

therapeutische Ansatz durch Verwendung von BH3-Mimetika das Verhältnis zugunsten der pro-apoptotischen Proteine zu verschieben (Warren et al. 2019). Einige BH3-Mimetika, wie beispielsweise ABT-263 (Navitoclax), GX15-070 (Obatoclax) und ABT-199 (Venetoclax), befinden sich bereits in klinischer Anwendung bzw. wurden in klinischen Studien erprobt (Roberts et al. 2016; Stilgenbauer et al. 2016; Rudin et al. 2012; Gandhi et al. 2011; Wilson et al. 2010; Schimmer et al. 2008; 2014). Besonders hervorzuheben ist der hochselektive Bcl-2-Inhibitor ABT-199, dessen Wirksamkeit insbesondere bei der CLL und AML belegt ist, daher wurde ABT-199 für die Behandlung dieser Krankheitsbilder in der EU und den USA zugelassen (Jonas und Pollyea 2019; Deeks 2016; European Medicines Agency 2016). Inhibiert man in malignen Zellen Bcl-2, kommt es zur Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs über das Mitochondrium. Dieser Mechanismus ist spezifisch für Tumore mit einer Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern. ABT-199 hat daher nur geringe Auswirkungen auf gesunde Zellen (Souers et al. 2013; Davids und Letai 2013). Eine geringe Toxizität zeigte sich auch in klinischen Studien zur CLL (Al-Sawaf et al. 2020; Fischer et al. 2019; Seymour et al. 2018).

Da Tumorzellen viele Wege generiert haben Resistenzen zu entwickeln, ist es wichtig, neue Behandlungsoptionen zu identifizieren oder Wirkstoffe indikationenübergreifend einzusetzen. Kombinationen wie die hier vorgestellte aus DMF und ABT-199 sind eine Möglichkeit, Resistenzen durch Wirkstoffkombination zu umgehen und durch additive Wirkung auch das Nebenwirkungsspektrum so gering wie möglich zu halten. Der erfolgreiche Einsatz einer Kombinationstherapie aus DMF und ABT-199 zeigte sich bereits beim kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL) sowie beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL). Hierbei kam es jeweils zu einem synergistischen Effekt bei der Zelltodinduktion (Froehlich et al. 2019; Schmitt et al. 2021).

4.1 Reduzierte Zellviabilität und zelluläre ATP-Spiegel

Wir konnten für das kolorektale Karzinom zeigen, dass DMF den intrazellulären ATP-Gehalt und somit die Zellviabilität von HCT-116-Zellen reduziert. Hierbei kam es zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der zellulären ATP-Spiegel unter DMF-Behandlung. Der Einfluss von DMF auf die Viabilität von CRC-Zellen ist in der Literatur bereits beschrieben. Unter Verwendung von MTT-Assays wurde in Studien eine

Abnahme der Reduktionsäquivalente NADH^+ und NADPH^+ in HCT-116-Zellen und weiteren CRC-Zelllinien beobachtet. NADH^+ speist Elektronen in die Atmungskette ein und NADPH^+ dient als Reduktionsäquivalent im Pentose-Phosphatzyklus. Ein Abfall in der Konzentration dieser beiden Moleküle ist ähnlich wie ATP ein Maß für den zellulären Metabolismus und die Zellviabilität. In den Versuchen zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von DMF (Singhal et al. 2021; Xie et al. 2015). Dies konnten wir mit unseren Daten bestätigen. Eine zeitabhängige Wirkung zeigte DMF auch in einem Kristallviolett Assay, der Proliferation und Viabilität über eine Korrelation mit der Zellmasse bestimmt. Neben verschiedenen CRC-Zelllinien wurden hier auch weitere Tumorentitäten betrachtet. Die Zellviabilität nahm in allen Zelllinien unter Behandlung mit 100 μM DMF ab (Saidu et al. 2017). Die in der Literatur verwendeten Methoden zur Bestimmung der Zellviabilität bei CRC unterscheiden sich von der von uns verwendeten Methode. Eine Analyse der ATP-Spiegel unter DMF-Behandlung, wie auch wir sie vorgenommen haben, ist bisher in der Literatur in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien erfolgt. Hierbei kam es zu einer dosisabhängigen Senkung der zellulären ATP-Spiegel unter DMF-Behandlung (Chen et al. 2021). Somit ist DMF in der Lage die Viabilität von CRC-Zellen und anderen soliden Tumorzellen zu senken. Ein ausreichendes Angebot an ATP sowie den Reduktionsäquivalenten NADH^+ und NADPH^+ ist Voraussetzung für das Überleben, die Proliferation, die Proteinsynthese und den Ablauf weiterer energieverbrauchender Stoffwechselprozesse (Ghosh et al. 2020).

In unseren Experimenten zeigte sich eine zeitabhängige Abnahme der zellulären ATP-Spiegel in HCT-116-Zellen unter 10 μM ABT-199. Beschrieben sind verminderte zelluläre ATP-Spiegel in HCT-116 Bax/Bak *knock-out* Zellen unter 2 μM ABT-199. Zur Bestimmung der ATP-Spiegel wurde hierbei dieselbe Methode verwendet, die auch in dieser Arbeit Anwendung fand (Zeng et al. 2022). In unseren Experimenten war die Viabilität von HCT-116-Zellen unter 10 μM ABT-199 nach 48 h um ca. 38 % reduziert, was wir anhand der entsprechend hohen ATP-Abnahme nachweisen konnten. Perimenis et al. (2016) konnten unter derselben Konzentration von ABT-199 in einem Sulforhodamin B-Assay mit einer anderen CRC-Zelllinie eine Reduktion der Zellviabilität um ca. 30 % beobachten. Mithilfe des Farbstoffs Sulforhodamin B, welcher an zelluläre Protein-Komponenten bindet, wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Die beiden unterschiedlichen Methoden zeigten ein ähnliches Ergebnis.

Dass die Zellviabilität von CRC-Zellen durch die Abnahme der zellulären ATP-Spiegel beeinträchtigt ist, bestätigt sich durch die reduzierte Anzahl lebender Zellen im Sulforhodamin B-Assay unter Behandlung mit ABT-199.

Der Einfluss einer Kombination aus DMF und ABT-199 auf die Zellviabilität von CRC-Zellen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Wir sind die Ersten, die diese Kombinationstherapie und ihre Anwendung beim CRC untersucht haben. Hierbei zeigte sich, dass die Kombinationsbehandlung den jeweiligen Monotherapien überlegen ist und die zellulären ATP-Spiegel am deutlichsten reduzieren konnte. Wie weiter oben geschildert, finden sich in der Literatur Aussagen darüber, dass sowohl DMF als auch ABT-199 als Monotherapie die Viabilität von CRC-Zellen reduzieren kann. Es kommt zur Abnahme von Molekülen, die für das Überleben der Zellen wichtig sind, wie etwa ATP, NADH^+ und NADPH^+ , und zur Reduktion der lebenden Zellen. Bei der Kombination von DMF und ABT-199 sind ähnliche Effekte zu erwarten. Wir konnten in dieser Arbeit eine Abnahme der ATP-Spiegel von CRC-Zellen durch die Kombinationsbehandlung zeigen. Kombinierte man DMF und ABT-199, war dies hinsichtlich der ATP-Reduktion den jeweiligen Monotherapien deutlich überlegen, was diese Kombination zu einer vielversprechenden neuen medikamentösen Option für das CRC macht.

4.2 Zelltod- und Autophagie-Induktion durch DMF und ABT-199

Wir konnten in dieser Arbeit eine signifikante Zelltodinduktion durch die Monotherapie mit DMF sowie durch die Kombinationstherapie aus DMF und ABT-199 beobachten. Bei der Kombinationstherapie konnte durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD eine signifikante Reduktion des programmierten Zelltodes erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass die HCT-116-Zellen durch Apoptose sterben, da Caspasen für diese Art des Zelltodes essenziell sind. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits die Induktion von Zelltod durch die Kombinationstherapie aus DMF und ABT-199 in verschiedenen CTCL-Zelllinien und primären CTCL-Zellen beschreiben (Froehlich et al. 2019). Auch beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom konnte Zelltod durch die Kombination aus DMF und ABT-199 induziert werden (Schmitt et al. 2021). Bei anderen Tumorentitäten wurde der Effekt der Kombinationstherapie auf die Zelltodinduktion bisher nicht

untersucht. In dieser Arbeit wird erstmals die Zelltodinduktion durch die Kombination aus ABT-199 und DMF beim CRC beschrieben.

Dass DMF allein in der Lage ist Zelltod zu induzieren, ist in der Literatur belegt. Kontrovers diskutiert wird jedoch die Art des Zelltods. Unsere Arbeitsgruppe konnte den DMF-induzierten Zelltod beim CTCL als Ripoptosom-vermittelt identifizieren (Schroeder et al. 2017). Beim CRC ist die Induktion von Apoptose, Nekroptose und Zelltod durch oxidativen Stress durch DMF beschrieben (Kaluzki et al. 2019; Xie et al. 2015; Singhal et al. 2021).

In unseren Experimenten führte die Kombination von ABT-199 und DMF zur Induktion von Autophagie in HCT-116-Zellen. In der Literatur gibt es bisher keine Daten zur Autophagie-Induktion durch diese Kombinationstherapie. Die Einzelbehandlung mit DMF zeigte aber bereits das Potential, Autophagie in CRC-Zellen zu induzieren. Xie et al. (2015) konnten unter Behandlung mit 200 μ M DMF erhöhte Spiegel des Autophagie-Markers LC3-II in den CRC-Zelllinien HCT-116, HT-29, CT-26 und SGC-7901 nachweisen. Bei Kaluzki et al. (2019) zeigten sich erhöhte LC3-II-Spiegel in den CRC-Zelllinien HT-29 und T84 bereits unter 100 μ M DMF. Bei derselben DMF-Konzentration wurde die Autophagie ebenfalls mittels Immunfluoreszenz in beiden Zelllinien nachgewiesen. In unseren Experimenten waren die LC3-II-Spiegel unter 50 μ M DMF nach 24 h erhöht. In welchem Ausmaß DMF Autophagie in CRC-Zellen induziert, ist also abhängig von der verwendeten Wirkstoffkonzentration. Interessanterweise kam es bei verschiedenen Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms zur Abnahme der LC3-II-Spiegel und damit der Autophagie unter Behandlung mit 100 μ M oder 200 μ M DMF für 24 h (Liu et al. 2019). Für den Effekt von DMF auf autophagische Prozesse in der Zelle spielt also auch die behandelte Tumorentität eine entscheidende Rolle.

Die Induktion von Autophagie durch BH3-Mimetika wie beispielsweise ABT-199 ist in der Literatur für Melanom- und Lungenkarzinom Zelllinien beschrieben (Gabellini et al. 2017). Bcl-2 und weitere anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder wie Bcl-xL binden an Beclin-1 (Gabellini et al. 2017). Beclin-1 ist ein Protein, welches essentiell für die Bildung des Autophagosoms und damit die Autophagie ist (Lee et al. 2016). Beclin-1 besitzt eine BH3-Domäne an welche Bcl-2-Familienmitglieder binden können. Durch die Bindung an Bcl-2 wird Beclin-1 gehemmt (Oberstein et al. 2007). BH3-Mimetika

hemmen wiederum kompetitiv die Interaktion von Bcl-2 mit Beclin-1. Die Inhibition von Beclin-1 fällt dadurch weg und es kommt zur Autophagie (Maiuri et al. 2007). In Bax/Bak-Knockout-Zellen der HCT-116-Zelllinie waren die LC3-II-Spiegel unter ABT-199-Behandlung erhöht, was auf die Induktion von Autophagie hindeutet. Die Autophagie konnte mittels eines Autophagosom-Inhibitors verhindert werden (Zeng et al. 2022). Auch in unseren Experimenten konnten erhöhte LC3-II-Spiegel in HCT-116-Zellen nach ABT-199-Behandlung für 48 h nachgewiesen werden. Die Erhöhung der LC3-II-Spiegel war jedoch nicht signifikant. Bei Mammakarzinom-Zellen zeigte sich neben erhöhten LC3-II-Proteinspiegeln im Western Blot auch eine erhöhte mRNA-Expression von LC3 in der qRT-PCR (Alhoshani et al. 2020).

Die Literatur deutet also darauf hin, dass sowohl DMF als auch ABT-199 autophagische Prozesse in Zelllinien unterschiedlicher Tumor-Entitäten hervorrufen können. Wir zeigen in der vorliegenden Doktorarbeit erstmals, dass die Kombination der beiden Wirkstoffe signifikant Autophagie in der CRC-Zelllinie HCT-116 induziert. Es ist beschrieben, dass niedrige zelluläre ATP-Spiegel zur Autophagie führen können (Ferro et al. 2020). Welche Rolle der Autophagie bei malignen Tumoren zukommt, wird kontrovers diskutiert. Einerseits verschaffen sich proliferierende Krebszellen einen Überlebensvorteil, indem sie Zellorganellen energiebringend recyceln. Andererseits kann Autophagie auch zum Zelltod führen und so den Tumorprogress inhibieren (Hu et al. 2016). Zelltodinduktion und inhibierte Zellproliferation konnten wir im Rahmen dieser Doktorarbeit beobachten. Die Induktion der Autophagie könnte also einen neuen Behandlungsansatz bieten, insbesondere in Malignomen, bei denen eine Apoptose-Resistenz unter Chemotherapie/zielgerichteter Therapie besteht.

4.3 Veränderte Mitochondrienfunktion unter DMF-Therapie

In dieser Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass es unter der Therapie von HCT-116-Zellen mit 25 oder 50 μM DMF zu einer signifikanten Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi\text{m}$) kommt. Wir haben Hinweise darauf, dass es unter der DMF-Behandlung von HCT-116-Zellen zu einer Modifikation der ATP-Synthase kommt. Eine veränderte Funktion der ATP-Synthase korreliert mit einer Hyperpolarisation des $\Delta\Psi\text{m}$ (Tappenden et al. 2011; Mourier et al. 2014). Die mitochondriale Atmungskette transportiert Protonen aus der mitochondrialen Matrix in

den Intermembranraum der Mitochondrien. Das $\Delta\Psi_m$ ist das Ergebnis dieses Protonentransports. Es beschreibt das elektrische Potential über der inneren Mitochondrienmembran, welches sich aufgrund des Ladungsungleichgewichts zwischen Intermembranraum und Mitochondrienmatrix ausbildet. Die Protonen fließen dann entlang ihres elektrochemischen Gradienten über die ATP-Synthase aus dem Intermembranraum zurück in die Mitochondrienmatrix. Bei diesem Prozess wird ATP durch Phosphorylierung aus ADP gebildet (Vercellino und Sazanov 2022; Cadenas 2018). Ist die ATP-Synthase verändert und damit inhibiert, kann der Protonenfluss nicht mehr entsprechend dem durch die Atmungskette aufgebauten Protonengradienten erfolgen. Als Folge kommt es zu einer Akkumulation von Protonen im Intermembranraum der Mitochondrien und damit zu einer Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$. Ebenso sind die zellulären ATP-Spiegel aufgrund der verminderten ATP-Produktion erniedrigt. (Mourier et al. 2014; Shertzer et al. 2006). Beide Effekte konnten wir unter DMF-Behandlung von HCT-116-Zellen nachweisen.

Als Folge der inhibierten ATP-Synthase kommt schließlich auch der Elektronenfluss über die Atmungskette zum Erliegen. Dadurch werden die oxidativen Signalwege des Mitochondriums gestört. Wie in T-Zellen gezeigt werden konnte, sind diese oxidativen Signalwege besonders wichtig für die Zellproliferation (Kamiński et al. 2012). Durch den Stillstand der gesamten Atmungskette sinkt zunächst der O_2 -Verbrauch (Mourier et al. 2014). Wir konnten in unseren Experimenten diesen reduzierten O_2 -Verbrauch nach Behandlung mit DMF nachweisen. Bei anhaltender Blockade der ATP-Synthase entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese können in höheren Konzentrationen das Mitochondrium schädigen und so zum Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ führen (Mourier et al. 2014; Shertzer et al. 2006). Die Entstehung von ROS unter der Behandlung von CRC-Zellen mit DMF wurde in der Literatur bereits beschrieben (Singhal et al. 2021; Saidu et al. 2017; Xie et al. 2015). Die durch DMF hervorgerufenen Veränderungen am Mitochondrium können demnach unterschiedliche Auswirkungen auf das $\Delta\Psi_m$ haben. Diese sind abhängig von der Wirkstoffkonzentration, der Inkubationszeit, der behandelten Zelllinie und der Tumorentität.

Wir konnten in dieser Arbeit eine signifikante Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ unter DMF-Behandlung zeigen. Im Gegensatz dazu konnte bei verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien eine dosisabhängige Depolarisation des $\Delta\Psi_m$ unter

DMF-Therapie beobachtet werden (Chen et al. 2021). Derselbe Effekt zeigte sich auch bei Zervixkarzinom-Zellen (Han und Zhou 2016). In verschiedenen CTCL-Zelllinien führten 30 μM DMF zur Depolarisation des $\Delta\Psi\text{m}$ (Nicolay et al. 2016). Jedoch zeigte sich die Depolarisation des $\Delta\Psi\text{m}$ nicht nur in anderen Tumorentitäten, sondern auch bei der murinen CRC-Zelllinie CT26. Hierbei wurde eine DMF-Konzentration von 100 μM verwendet, was der doppelten DMF-Konzentration entspricht, welche in dieser Doktorarbeit maximal verwendet wurde (Xie et al. 2015). Bei dem Effekt von DMF auf das $\Delta\Psi\text{m}$ scheinen daher sowohl die behandelte Zelllinie sowie die verwendete Wirkstoffkonzentration eine entscheidende Rolle zu spielen. Wie zuvor von uns erstmals beschrieben, ist die Depolarisation des $\Delta\Psi\text{m}$ dabei auf eine Schädigung der mitochondrialen Integrität zurückzuführen. Eine mitochondriale Schädigung führt häufig zum Zelltod. Interessanterweise ging auch in den oben genannten Studien die Depolarisation des $\Delta\Psi\text{m}$ stets mit einer Induktion des Zelltodes in den entsprechenden Zelllinien einher. Im Falle vom CTCL ist der DMF-abhängige Zelltod auf die Inhibition von Thioredoxin 1 (Trx1) zurückzuführen. Die DMF-abhängige Blockade von Trx1 führt zur Inhibition des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κB . Dadurch werden die NF- κB -Zielgene cFLIP (zelluläres FLICE-like inhibitory Protein) und IAPs (Inhibitors of Apoptosis) nicht mehr exprimiert. Als Folge kommt es zur Spaltung und damit Aktivierung des pro-apoptotischen BH3-only-Proteins Bid. (Schroeder et al. 2017). Bid aktiviert wiederum das Effektor-Protein Bax, welches Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bildet (Kuwana et al. 2002). Durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c sowie zur Depolarisierung des $\Delta\Psi\text{m}$ (Lartigue et al. 2009).

In unseren Experimenten konnten wir eine Abnahme des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs von HCT-116-Zellen unter DMF-Behandlung beobachten. Ein reduzierter O_2 -Verbrauch unter DMF ist in der Literatur bei verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien beschrieben (Chen et al. 2021). In weiteren Studien war die mitochondriale Respiration von murinen Neuroblastom-Zellen und murinen, embryonalen Fibroblasten nach 24 h DMF-Behandlung reduziert (Piroli et al. 2019; Ahuja et al. 2016). Die Abnahme des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs liefert einen weiteren Hinweis auf eine eingeschränkte Funktion der Atmungskette unter DMF, welche wahrscheinlich durch Inhibition der ATP-Synthase vermittelt wird.

Die ATP-Produktion durch Mitochondrien ist wichtig für das Tumorwachstum und zeigt eine Assoziation zur Zellproliferation, der Zelltod-Resistenz und der Metastasierung von Krebszellen (Ferro et al. 2020). In unseren Experimenten zeigten sich unter ABT-199, DMF oder der Kombinationsbehandlung verminderte zelluläre ATP-Spiegel. Die Auswirkungen des verminderten ATP-Angebots auf den Tumorprogress von HCT-116-Zellen werden im Folgenden diskutiert.

4.4 Auswirkungen des verminderten ATP-Angebots auf CRC-Zellen

4.4.1 Beeinträchtigung der Zellproliferation durch DMF und ABT-199

Die Behandlung von HCT-116-Zellen mit 50 μ M DMF bewirkte in unseren Experimenten eine signifikante Proliferationsinhibition. Übereinstimmend mit unserem Ergebnis ist in der Literatur beschrieben, dass DMF dosis-abhängig das Zellwachstum von HCT-116-Zellen sowie weiteren CRC-Zelllinien inhibiert (Singhal et al. 2021). In einer weiteren Studie wurde die Zellproliferation der beiden CRC-Zelllinien HT-29 und T84 mittels Bromdesoxyuridin-Assay bestimmt. Hier zeigte sich ebenfalls eine dosis-abhängige Proliferationsinhibition unter DMF-Behandlung, wobei signifikante Effekte auf die Zellproliferation ab einer Wirkstoffkonzentration von 40 μ M nach 24 h Behandlungsdauer zu beobachten waren (Kaluzki et al. 2019). Darüber hinaus konnte bereits *in vivo* eine Inhibition des CRC-Tumorwachstums durch DMF beobachtet werden. Im Maus-Modell wurden hierfür murine CRC-Zellen CT26 subkutan injiziert und, sobald die Tumore klinisch sichtbar waren, mit DMF behandelt (Saidu et al. 2017). Auch in weiteren Tumorentitäten hat DMF eine proliferationsinhibierende Wirkung. Melanom-Zellen zeigten sich *in vitro* sowie *in vivo* sensibel für die DMF-Behandlung (Kaluzki et al. 2016; Loewe et al. 2006). Die Zellproliferation von Glioblastom- und Zervixkarzinom-Zelllinien konnte durch DMF inhibiert werden (Ghods et al. 2013; Han und Zhou 2016). Außerdem zeigte sich unter DMF-Behandlung ein reduziertes Tumorwachstum beim CTCL im Maus-Modell (Nicolay et al. 2016). Die Zellproliferation ist ein energieintensiver Prozess, der ein ausreichendes ATP-Angebot in den Zellen voraussetzt (Grumbach und Nguyen 2019).

Wie in dieser Doktorarbeit beschrieben, ist das ATP-Angebot in HCT-116-Zellen unter DMF-Behandlung unzureichend, was auf die verminderte ATP-Produktion über die mitochondriale Atmungskette zurückzuführen ist. Hinzu kommt, dass durch DMF auch

Proteine, die für das Fortschreiten des Zellzyklus wichtig sind, herunterreguliert werden. Übereinstimmend mit Kaluzki et al. (2019) sehen wir in dem durch Cyclin- und CDK-Veränderungen hervorgerufenem Zellzyklusarrest einen Grund für die Proliferationsinhibition durch DMF bei CRC-Zellen. Als weitere mögliche Ursachen für die reduzierte Proliferation von CRC-Zellen unter DMF werden die Oxidation von GSH und die Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors-2 α diskutiert (Odom et al. 2009; Singhal et al. 2021).

Wir konnten in der vorliegenden Doktorarbeit zeigen, dass auch 10 μ M ABT-199 signifikant die Zellproliferation von HCT-116-Zellen inhibieren. Der Literatur zufolge weisen HCT-116-Zellen unter Behandlung mit 10 μ M ABT-199 für 24 h eine erhöhte durchflusszytometrisch gemessene Intensität des Zellseneszenz-Markers 5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG) auf. Das deutet auf eine beeinträchtigte Zellproliferation hin (As Sobeai et al. 2022). *In vitro* Studien zeigen auch eine dosis-abhängige Proliferationsinhibition von verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien durch ABT-199 (Alhoshani et al. 2020). *In vivo* konnte das Tumorstadium bei der AML und verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen in Maus-Modellen durch ABT-199 gehemmt werden (Souers et al. 2013). Die eigentliche Funktion von ABT-199 als BH3-Mimetikum liegt in der Inhibition des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und damit der Induktion der Apoptose (Hafezi und Rahmani 2021). Bcl-2 wird in verschiedenen CRC-Zelllinien exprimiert. Wie ausgeprägt diese Expression ist, variiert unter den verschiedenen CRC-Zelllinien (Koehler et al. 2013). Es zeigte sich, dass Bcl-2 beim Tumorstadium vom CRC verloren gehen kann, was die Apoptose-Induktion durch Bcl-2-Inhibitoren wie ABT-199 verhindert (Soderquist et al. 2018). Wie in dieser Doktorarbeit beschrieben, konnte ABT-199 als Monotherapie kaum Zelltod in HCT-116-Zellen induzieren. Es gibt neben der Apoptose-Induktion jedoch auch weitere Effekte von ABT-199 wie beispielsweise die Proliferationsinhibition. Interessanterweise kam es unter einem Knockdown von Bcl-2 in den CRC-Zelllinien HT29 und SW480 zu keiner Veränderung der Zellproliferation (Koehler et al. 2013). Da wir in dieser Doktorarbeit eine signifikante Proliferationsinhibition unter ABT-199 in HCT-116-Zellen beobachten konnten, stellt sich die Frage, ob die Effekte von ABT-199 über die Bcl-2-Inhibition hinausgehen. Alhoshani et al. (2020) führen die Proliferationsinhibition durch ABT-199 bei Mammakarzinomzellen auf reduzierte Cyclin D1-Spiegel und einen dadurch bedingten G1-Zellzyklusarrest zurück. Die

gleichen Beobachtungen konnten auch wir bei HCT-116 unter ABT-199-Behandlung machen. In den durch ABT-199 verminderten ATP-Spiegeln sehen wir einen weiteren Mechanismus, der für die Inhibition der Zellproliferation verantwortlich ist.

In unseren Experimenten konnte die stärkste Proliferationsinhibition durch die Kombination aus DMF und ABT-199 erreicht werden. Die Medikamentenkombination aus DMF und ABT-199 zeigte sich auch bei *in vivo* Studien zum CTCL den jeweiligen Monotherapien überlegen. Im Xenograft-Maus-Modell mit intradermal injizierten SeAx-Zellen, inhibierte die Kombinationstherapie das Tumorwachstum am deutlichsten (Froehlich et al. 2019).

Unsere Ergebnisse im Kontext mit der Literatur zeigen, dass sowohl DMF als auch ABT-199 die Zellproliferation und das Tumorwachstum beim CRC sowie weiteren Tumorentitäten inhibieren. Die Kombination der beiden Wirkstoffe ist überadditiv und übersteigt dabei deutlich den Effekt der Monotherapien.

4.4.2 Zellzyklus-Arrest durch Veränderungen der zellulären Cyclin- und CDK-Spiegel

Einen wichtigen Grund für die Inhibition der Zellproliferation von HCT-116-Zellen durch DMF, ABT-199 oder die Kombination der beiden Wirkstoffe sehen wir im Einfluss dieser Wirkstoffe auf den Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit konnten unter allen gewählten Behandlungsbedingungen Veränderungen am Zellzyklus beobachtet werden. DMF führte nach 24 h zu einem signifikanten, kombinierten G1- und G2-Phasen-Arrest sowie einer reduzierten S-Phase in HCT-116-Zellen. Ein G1-Phasen-Arrest mit reduzierter S-Phase unter DMF-Behandlung für 24 h zeigte sich in der Literatur auch bei der CRC-Zelllinie HT-29. Bei der CRC-Zelllinie T84 hingegen konnte durch DMF kein Zellzyklus-Arrest hervorgerufen werden, weshalb die Autoren eine Zelltodinduktion für die antitumorale Wirkung von DMF in T84-Zellen verantwortlich machen (Kaluzki et al. 2019). In der Literatur ist die Wirkung von DMF auf den Zellzyklus bei weiteren Tumorentitäten beschrieben. DMF bewirkte einen G1-Phasen-Arrest mit reduzierter S-Phase beim Hepatozellulären Karzinom (HCC)-Zellen sowie in Zervixkarzinomzellen (Liu et al. 2019; Han und Zhou 2016). Derselbe Effekt stellte sich auch bei dermalen Lymphendothelzellen dar (Valesky et al. 2016). Bei verschiedenen Melanomzelllinien konnte unter DMF-Konzentrationen von 50 μ M

ebenfalls ein G1-Phasen-Arrest beobachtet werden (Kaluzki et al. 2016). Bei höheren DMF-Konzentrationen von 84 μM oder 100 μM zeigte sich ein G2-Phasen-Arrest (Loewe et al. 2006; Kaluzki et al. 2016). Insgesamt scheint DMF also v.a. einen G1-Phasen-Arrest hervorzurufen.

In den von uns durchgeführten Experimenten führte ABT-199 nach 48 h zu einem signifikanten G1-Phasen-Arrest mit reduzierter S-Phase. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus von verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien gemacht werden. Ein G1-Phasen-Arrest mit reduzierter S-Phase unter 10 μM ABT-199 zeigte sich hier nach 24 h (Alhoshani et al. 2020) sowie nach 72 h (Whittle et al. 2020).

Der Effekt der Kombination von DMF mit ABT-199 auf den Zellzyklus wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. In der vorliegenden Doktorarbeit führte diese Kombinationstherapie zu einem signifikanten G2-Phasen-Arrest mit reduzierter S-Phase nach 24 h und 48 h. Nach 24 h war zusätzlich ein G1-Phasen-Arrest zu beobachten. Der Einfluss der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus der HCT-116-Zellen war insgesamt stärker ausgeprägt als die Einzelbehandlungen mit DMF oder ABT-199.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Veränderungen an den zellulären Cyclin- und CDK-Spiegeln der HCT-116-Zellen unter Therapie mit DMF, ABT-199 oder der Kombination beider Wirkstoffe ursächlich für den beobachteten Zellzyklus-Arrest sind.

Unter DMF-Behandlung konnten wir reduzierte Cyclin A2-Spiegel beobachten. Cyclin A2 ist wichtig für den Progress der S-Phase und den Übertritt in die G2-Phase des Zellzyklus (Hume et al. 2020). DMF führte auch in dermalen Lymphendothelzellen zur Reduktion von Cyclin A. Hier zeigte sich zusätzlich eine Reduktion der Cyclin D1-Spiegel (Valesky et al. 2016), welche auch bei HCC-Zellen (Liu et al. 2019) sowie der CRC-Zelllinie HT-29 zu beobachten war (Kaluzki et al. 2019). In Melanom-Zellen resultierte die DMF-Behandlung in der Reduktion von Cyclin B1 (Kaluzki et al. 2016). Die Cyclin-Veränderungen unter DMF sind also je nach Zelllinie mitunter unterschiedlich ausgeprägt. Dies erklärt die Tatsache, dass in unseren Experimenten unter DMF sowohl G1- als auch G2-Phasen-Arreste beobachtet werden konnten.

Wir konnten zeigen, dass ABT-199 zur Reduktion der zellulären Proteinspiegel von Cyclin D1 und B1 führt. Eine derartige Reduktion von Cyclin D1 ist auch in der Literatur bei verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien beschrieben worden (Alhoshani et al. 2020; Whittle et al. 2020). Hier zeigte sich zusätzlich eine Reduktion der Cyclin E-Spiegel unter ABT-199, welche wir in unseren Experimenten nicht beobachten konnten (Whittle et al. 2020). Die verminderten Cyclin D1 und Cyclin E-Spiegel könnten ursächlich sein für den unter ABT-199 beobachteten G1-Phasen-Arrest, da Cyclin D1 für den Progress des Zellzyklus der G1-Phase und Cyclin E schließlich für den Übertritt in die S-Phase wichtig ist (Rubin et al. 2020; Leal-Esteban und Fajas 2020).

Welche Veränderungen an den zellulären Cyclin-Spiegeln unter der Kombinationstherapie von DMF und ABT-199 auftreten, ist in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Hier zeigten sich Cyclin B1 sowie Cyclin A2 signifikant reduziert. Dies erklärt den beobachteten G2-Phasen-Arrest unter der Kombinationstherapie, da Cyclin B1 für den Übergang der G2-Phase zur Mitose von entscheidender Bedeutung ist (Müllers et al. 2014; Krenning et al. 2014).

Neben den Cyclinen wurden in der vorliegenden Doktorarbeit auch die Veränderungen der CDK-Spiegel untersucht. Hierbei zeigten sich keine Veränderungen der CDK1-, CDK4- sowie CDK6-Spiegel unter DMF-Behandlung nach 24 h. Übereinstimmend damit sind die Ergebnisse aus *in vitro* Studien mit Melanom- und dermalen Lymphendothelzellen (Kaluzki et al. 2016; Valesky et al. 2016). In der CRC-Zelllinie HT-29 waren die CDK6-Spiegel ebenfalls unverändert. Die CDK4-Spiegel stellten sich jedoch unter DMF-Behandlung für 24 h dosis-abhängig reduziert dar (Kaluzki et al. 2019). Entscheidend für den Effekt von DMF auf den Zellzyklus scheinen also eher die Veränderungen an den Cyclin-Spiegeln zu sein.

Wir konnten sowohl in der Monotherapie mit ABT-199 als auch in der Kombinationstherapie mit DMF bei allen untersuchten CDKs reduzierte Proteinspiegel im Western Blot nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse in der Literatur liegen dazu nicht vor. Die Veränderungen an den CDK-Spiegeln tragen zum beobachteten Zellzyklus-Arrest bei. Reduzierte Mengen an CDK4 und CDK6 resultieren im G1-Phasen-Arrest. Verminderte CDK1-Spiegel führen zum G2-Phasen-Arrest (Bertoli et al. 2013).

Die Hemmung des Tumorwachstums über einen induzierten Zellzyklus-Arrest ist ein wichtiger therapeutischer Ansatz, da ein beschleunigter Zellzyklus ein charakteristisches Merkmal maligner Tumoren ist und eine Überexpression von Cyclinen und CDKs bei verschiedenen Krebsarten beobachtet wurde (Malumbres und Barbacid 2009). Wir konnten zeigen, dass DMF und ABT-199 Veränderungen in den zellulären Cyclin- und CDK-Spiegeln verursachen, die zu einem Zellzyklus-Arrest führen. Es gibt Wirkstoffe, die zu vergleichbaren Effekten führen, wie die dualen CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib. Diese haben eine FDA-Zulassung für die Behandlung bestimmter Subtypen von Brustkrebs und sind Gegenstand verschiedener klinischer Studien (Ding et al. 2020). Auch Antikörper gegen VEGF führen zu Veränderungen der Cyclin-Spiegel und dadurch zum Zellzyklus-Arrest, welcher wiederum in einem reduzierten Tumorwachstum resultiert, wie an HCC-Zellen gezeigt wurde (Liu et al. 2017). Anti-VEGF-Antikörper wie Bevacizumab werden bereits in der Therapie des CRC eingesetzt (Mármol et al. 2017). Die in unseren Experimenten verwendeten Wirkstoffe DMF und ABT-199 sind also vielversprechend für die Therapie des CRC, da sie ähnliche Effekte zeigen wie Medikamente, welche in der Krebstherapie bereits regelmäßig Anwendung finden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von DMF und ABT-199 auf CRC-Zellen untersucht. DMF wurde als vielversprechende Substanz identifiziert, die eine signifikante Zelltodinduktion und Hemmung der Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien, einschließlich CRC, bewirken kann. Die Hemmung der Zellproliferation beim CRC ist mit Veränderungen im Zellzyklus verbunden, die durch veränderte Cyclin- und CDKs-Spiegel hervorgerufen werden. Ebenso wurde unter der DMF-Behandlung eine Abnahme der zellulären ATP-Spiegel beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass DMF die ATP-Synthase modifiziert und dadurch den Ablauf der mitochondrialen Atmungskette hemmt. Diese Veränderungen können das Tumorwachstum beeinflussen, da ATP für wichtige zelluläre Prozesse benötigt wird.

ABT-199, ein weiterer vielversprechender Wirkstoff, hat sich ebenfalls als wirksam bei der Hemmung der Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien, darunter auch CRC, erwiesen. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch die Hemmung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und die Induktion von Apoptose vermittelt. Darüber

hinaus kann ABT-199 den Zellzyklus beeinflussen, insbesondere durch die Induktion eines G1-Phasenarrests.

Besonders bemerkenswert ist, dass die Kombinationstherapie von DMF und ABT-199 zu einer verstärkten Zelltodinduktion und Hemmung der Zellproliferation führt, die über die Wirkung der Einzeltherapien hinausgeht. Die Kombination induziert einen G1- und G2-Phasenarrest im Zellzyklus und führt zu einer signifikanten Autophagie-Induktion in den Krebszellen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass DMF und ABT-199 vielversprechende Ansätze für die Behandlung des CRC sein könnten. Insbesondere in ihrer Kombination hemmen sie das Wachstum von Krebszellen, beeinflussen den Zellzyklus und induzieren Zelltod sowie Autophagie. Diese Erkenntnisse könnten als Grundlage für weitere Forschung und klinische Studien dienen und möglicherweise neue Behandlungsmöglichkeiten für verschiedene Krebsarten, einschließlich des kolorektalen Karzinoms, eröffnen.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit die dritthäufigste maligne Tumorentität und zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (Bray et al. 2024). Aufgrund häufiger Resistenzbildungen gegen etablierte medikamentöse Therapien beim CRC, ist die Identifikation neuer Behandlungsoptionen wichtig. Dimethylfumarat (DMF) ist ein für die Behandlung der Psoriasis und der Multiplen Sklerose zugelassenes Medikament, welches darüber hinaus in Studien antitumorale Wirkungen zeigte. In einer klinischen Phase-II-Studie zur DMF-Therapie konnte die Wirksamkeit bei CTCL nachgewiesen werden. Es wurde jedoch ein unterschiedliches Ansprechen der Patienten auf die DMF-Therapie beobachtet und Resistenzen traten auf (Nicolay et al. 2023). Aus diesem Grund haben wir uns in der vorliegenden Arbeit für eine Kombinationstherapie aus DMF und ABT-199 entschieden. Der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 hat ebenfalls krebshemmende Eigenschaften, welche bereits bei der Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) genutzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von DMF, ABT-199 sowie der Kombination beider Wirkstoffe auf das CRC *in vitro* zu untersuchen und somit zu evaluieren, ob diese Wirkstoffe als Monotherapie oder in Kombination als indikationsübergreifende neue Behandlungsoption beim CRC in Frage kommen.

Hierfür wurde die humane CRC-Zelllinie HCT-116 verwendet. Die Zellviabilität wurde anhand der ATP-Spiegel luminometrisch bestimmt. Der mitochondriale O₂-Verbrauch wurde mittels Seahorse gemessen. Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), der Zelltod, die Zellproliferation sowie der Zellzyklus wurden durchflusszytometrisch analysiert. Veränderungen an zellulären Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Autophagie-Markern wurden auf Proteinebene im Western Blot untersucht.

Unter der Behandlung von HCT-116-Zellen mit DMF, ABT-199 oder der Kombination beider Wirkstoffe zeigte sich eine reduzierte Zellviabilität, gemessen anhand der ATP-Menge in den Zellen. Der Grund für die reduzierten ATP-Spiegel unter DMF-Behandlung war eine eingeschränkte Funktion der mitochondrialen Atmungskette, welche sich in der Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ sowie einem reduzierten mitochondrialen O₂-Verbrauch ausdrückte. Als Folge des erniedrigten ATP-Angebots konnten wir eine reduzierte Zellproliferation unter allen Behandlungsoptionen

beobachten. Die Proliferationsinhibition war unter der Kombinationstherapie am stärksten ausgeprägt mit einer um 28,2 % reduzierten Zellproliferation nach 48 h. Für die Proliferationsinhibition war auch ein Zellzyklusarrest verantwortlich, welcher durch Veränderungen der Cyclin- und CDK-Spiegel hervorgerufen wurde. Die Kombinationstherapie konnte in HCT-116-Zellen Zelltod und Autophagie induzieren, die als Reaktion der Zellen auf das verminderte ATP-Angebot auftritt.

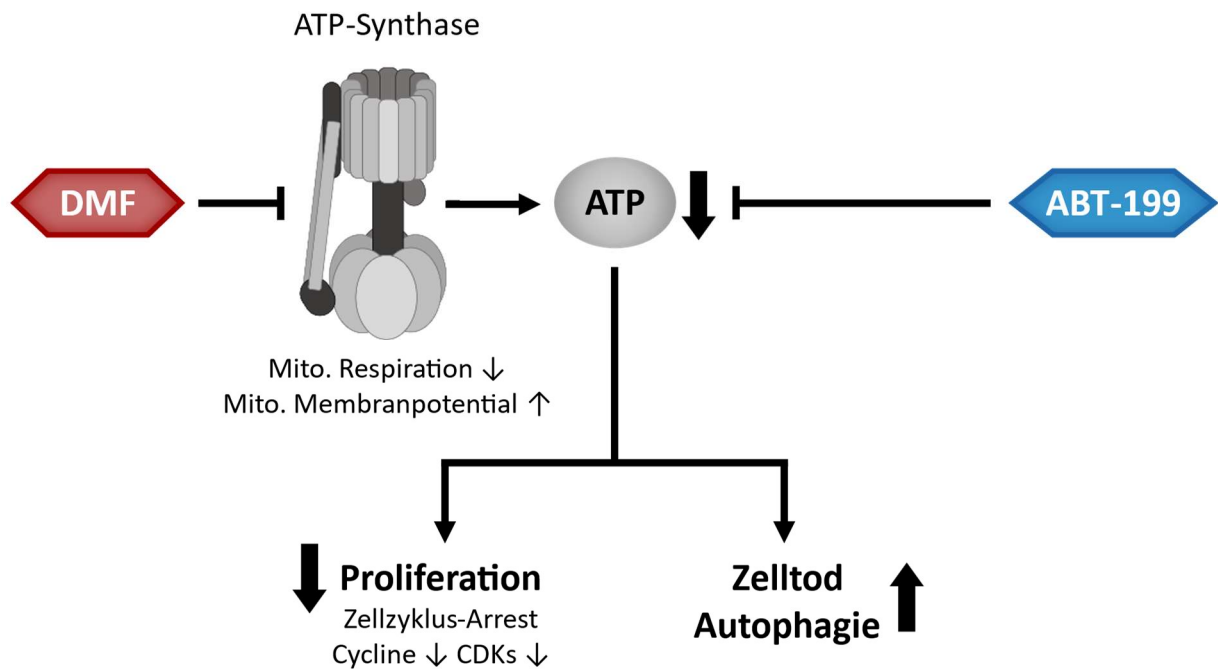


Abbildung 9: Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl DMF als auch ABT-199, insbesondere aber die Kombination der beiden Wirkstoffe, das Tumorstadium von CRC-Zellen inhibieren. Dies geschieht insbesondere über den Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen. Das verminderte ATP-Angebot resultiert in einer reduzierten Proliferation sowie einer Autophagie-Induktion. Durch DMF und die Kombinationstherapie konnte darüber hinaus signifikant Zelltod in HCT-116-Zellen induziert werden (Abbildung 9). Zur weiteren Analyse der Wirksamkeit von DMF und ABT-199 zur Behandlung des CRC müssen Experimente mit primären Zellen in Organoid-Modellen, *in vivo*-Experimente und klinische Studien angeschlossen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AML	<i>akute myeloische Leukämie</i>
Apaf-1	<i>Apoptose-auslösender Faktor-1</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH	<i>Bcl-2 Homologie</i>
CDK(s)	<i>Cyclin-abhängige Kinase(n)</i>
cFLIP	<i>zelluläres FLICE-like inhibitory Protein</i>
CLL	<i>chronisch lymphatische Leukämie</i>
CRC	<i>kolorektales Karzinom</i>
CTCL	<i>kutanes T-Zell-Lymphom</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindol</i>
DMF	<i>Dimethylfumarat</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EGFR	<i>epidermaler Wachstumsfaktor</i>
FCCP	<i>Trifluoromethoxycarbonylcyanidephenylhydrazon</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	<i>Gluthation</i>
HCC	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>
IAPs	<i>Inhibitors of Apoptosis</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
NADH	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrat</i>
Nf-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine-Ethylester</i>
Trx1	<i>Thioredoxin 1</i>
VEGF	<i>vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor</i>
$\Delta\Psi_m$	<i>mitochondriales Membranpotential</i>

7 Literaturverzeichnis

Ahmadi-Beni, Reza; Najafi, Ali; Savar, Seyed Mehrdad; Mohebbi, Niayesh; Khoshnevisan, Alireza (2019): Role of dimethyl fumarate in the treatment of glioblastoma multiforme: A review article. In: *Iran J Neurol*. 18 (3), S. 127–133. DOI: 10.18502/ijnl.v18i3.1636.

Ahuja, Manuj; Ammal Kaidery, Navneet; Yang, Lichuan; Calingasan, Noel; Smirnova, Natalya; Gaisin, Arsen et al. (2016): Distinct Nrf2 Signaling Mechanisms of Fumaric Acid Esters and Their Role in Neuroprotection against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Experimental Parkinson's-Like Disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (23), S. 6332–6351. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0426-16.2016.

Alhoshani, Ali; Alatawi, Fahad O.; Al-Anazi, Fawaz E.; Attafi, Ibraheem M.; Zeidan, Asad; Agouni, Abdelali et al. (2020): BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. In: *OncoTargets and therapy* 13, S. 13357–13370. DOI: 10.2147/OTT.S281519.

Al-Sawaf, Othman; Zhang, Can; Tandon, Maneesh; Sinha, Arijit; Fink, Anna-Maria; Robrecht, Sandra et al. (2020): Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 21 (9), S. 1188–1200. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30443-5.

André, Thierry; Meyerhardt, Jeffrey; Iveson, Timothy; Sobrero, Alberto; Yoshino, Takayuki; Souglakos, Ioannis et al. (2020a): Effect of duration of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer (IDEA collaboration): final results from a prospective, pooled analysis of six randomised, phase 3 trials. In: *The Lancet. Oncology* 21 (12), S. 1620–1629. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30527-1.

André, Thierry; Shiu, Kai-Keen; Kim, Tae Won; Jensen, Benny Vittrup; Jensen, Lars Henrik; Punt, Cornelis et al. (2020b): Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. In: *The New England journal of medicine* 383 (23), S. 2207–2218. DOI: 10.1056/NEJMoa2017699.

As Sobeai, Homood M.; Alohaydib, Munirah; Alhoshani, Ali R.; Alhazzani, Khalid; Almutairi, Mashal M.; Saleh, Tareq et al. (2022): Sorafenib, rapamycin, and venetoclax

attenuate doxorubicin-induced senescence and promote apoptosis in HCT116 cells. In: *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 30 (1), S. 91–101. DOI: 10.1016/j.jsps.2021.12.004.

Atwan, Ausama; Ingram, John R.; Abbott, Rachel; Kelson, Mark J.; Pickles, Timothy; Bauer, Andrea; Piguet, Vincent (2015): Oral fumaric acid esters for psoriasis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 2015 (8), Artikel CD010497, 1-50. DOI: 10.1002/14651858.CD010497.pub2.

Bahadoer, Renu R.; Dijkstra, Esmée A.; van Etten, Boudewijn; Marijnen, Corrie A. M.; Putter, Hein; Kranenbarg, Elma Meershoek-Klein et al. (2021): Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 22 (1), S. 29–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30555-6.

Banjara, Suresh; Suraweera, Chathura D.; Hinds, Mark G.; Kvansakul, Marc (2020): The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. In: *Biomolecules* 10 (1), Artikel 128, S. 1–21. DOI: 10.3390/biom10010128.

Barth, Sandra; Glick, Danielle; Macleod, Kay F. (2010): Autophagy: assays and artifacts. In: *The Journal of pathology* 221 (2), S. 117–124. DOI: 10.1002/path.2694.

Bertoli, Cosetta; Skotheim, Jan M.; Bruin, Robertus A. M. de (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (8), S. 518–528. DOI: 10.1038/nrm3629.

Bray, Freddie; Laversanne, Mathieu; Sung, Hyuna; Ferlay, Jaques; Siegel, Rebecca L; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin (2024): Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA Cancer J Clin* 74 (3), S. 229–263. DOI: 10.3322/caac.21834.

Brück, Jürgen; Dringen, Ralf; Amasuno, Adriana; Pau-Charles, Ignasi; Ghoreschi, Kamran (2018): A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. In: *Experimental dermatology* 27 (6), S. 611–624. DOI: 10.1111/exd.13548.

Cadenas, Susana (2018): Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. In: *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 1859 (9), S. 940–950. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2018.05.019.

Cercek, Andrea; Lumish, Melissa; Sinopoli, Jenna; Weiss, Jill; Shia, Jinru; Lamendola-Essel, Michelle et al. (2022): PD-1 Blockade in Mismatch Repair–Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. In: *The New England journal of medicine* 386 (25), S. 2363–2376. DOI: 10.1056/NEJMoa2201445.

Cervantes, A.; Adam, R.; Roselló, S.; Arnold, D.; Normanno, N.; Taïeb, J. et al. (2023): Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 34 (1), S. 10–32. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.10.003.

Chen, Kaiyuan; Wu, Shanshan; Ye, Sisi; Huang, Huimin; Zhou, Yi; Zhou, Hongfei et al. (2021): Dimethyl Fumarate Induces Metabolic Crisis to Suppress Pancreatic Carcinoma. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 617714. DOI: 10.3389/fphar.2021.617714.

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

Deeks, Emma D. (2016): Venetoclax: First Global Approval. In: *Drugs* 76 (9), S. 979–987. DOI: 10.1007/s40265-016-0596-x.

Delbridge, A. R. D.; Strasser, A. (2015): The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. In: *Cell death and differentiation* 22 (7), S. 1071–1080. DOI: 10.1038/cdd.2015.50.

DGHO (2024): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patient*innen mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). S3-Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Online verfügbar unter <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/018-032OL>, zuletzt geprüft am 03.03.2025.

Dikic, Ivan; Elazar, Zvulun (2018): Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (6), S. 349–364. DOI: 10.1038/s41580-018-0003-4.

Ding, Lei; Cao, Jiaqi; Lin, Wen; Chen, Hongjian; Xiong, Xianhui; Ao, Hongshun et al. (2020): The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and

Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 21 (6), Artikel 1960, S. 1–28. DOI: 10.3390/ijms21061960.

European Medicines Agency (2014): Tecfidera (Dimethylfumarat). Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecfidera>, zuletzt aktualisiert am 05.12.2023, zuletzt geprüft am 12.03.2024.

European Medicines Agency (2016): Venetoclax (Venclyxto). Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/venclyxto#authorisation-details-section>, zuletzt aktualisiert am 31.10.2023, zuletzt geprüft am 12.03.2024.

European Medicines Agency (2017): Skilarence (Dimethylfumarat). Online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/skilarence#ema-inpage-item-authorisation-details>, zuletzt aktualisiert am 27.09.2022, zuletzt geprüft am 12.03.2024.

Fearon, E. R.; Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell* 61 (5), S. 759–767. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.

Ferro, Fabio; Servais, Stéphane; Besson, Pierre; Roger, Sébastien; Dumas, Jean-François; Brisson, Lucie (2020): Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling. In: *Seminars in cell & developmental biology* 98, S. 129–138. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.05.029.

Fischer, Kirsten; Al-Sawaf, Othman; Bahlo, Jasmin; Fink, Anna-Maria; Tandon, Maneesh; Dixon, Mark et al. (2019): Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. In: *The New England journal of medicine* 380 (23), S. 2225–2236. DOI: 10.1056/NEJMoa1815281.

Froehlich, Tabea; Muller-Decker, Karin; Braun, Jana; Albrecht, Thomas; Schroeder, Anne; Gulow, Karsten et al. (2019): Combined inhibition of Bcl-2 and NFkB synergistically induces cell death in cutaneous T-cell lymphoma. In: *Blood* (5), S. 445–455. DOI: 10.1182/blood.2019001545.

Gabellini, Chiara; Trisciuglio, Daniela; Del Bufalo, Donatella (2017): Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-xL proteins: relevance of BH4 domain. In: *Carcinogenesis* 38 (6), S. 579–587. DOI: 10.1093/carcin/bgx016.

Gandhi, Leena; Camidge, D. Ross; Ribeiro de Oliveira, Moacyr; Bonomi, Philip; Gandara, David; Khaira, Divis et al. (2011): Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a

novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (7), S. 909–916. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.6208.

Gao, Su-Wei; Liu, Feng (2019): Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 20 (6), S. 467–475. DOI: 10.1631/jzus.B1900197.

Ghods, Ali J.; Glick, Roberta; Braun, David; Feinstein, Douglas (2013): Beneficial actions of the anti-inflammatory dimethyl fumarate in glioblastomas. In: *Surgical neurology international* 4, S. 160. DOI: 10.4103/2152-7806.123656.

Ghosh, Poorva; Vidal, Chantal; Dey, Sanchareeka; Zhang, Li (2020): Mitochondria Targeting as an Effective Strategy for Cancer Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 21 (9). DOI: 10.3390/ijms21093363.

Grumbach, Isabella M.; Nguyen, Emily K. (2019): Metabolic Stress. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39 (6), S. 991–997. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.312196.

Hafezi, Shirin; Rahmani, Mohamed (2021): Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. In: *Cancers* 13 (6), Artikel 1292, S. 1–15. DOI: 10.3390/cancers13061292.

Han, Guocan; Zhou, Qiang (2016): Dimethylfumarate induces cell cycle arrest and apoptosis via regulating intracellular redox systems in HeLa cells. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 52 (10), S. 1034–1041. DOI: 10.1007/s11626-016-0069-2.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2000): The Hallmarks of Cancer. In: *Cell* 100 (1), S. 57–70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hu, Tao; Li, Zhen; Gao, Chun-Ying; Cho, Chi Hin (2016): Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. In: *World journal of gastroenterology* 22 (30), S. 6876–6889. DOI: 10.3748/wjg.v22.i30.6876.

Hume, Samuel; Dianov, Grigory L.; Ramadan, Kristijan (2020): A unified model for the G1/S cell cycle transition. In: *Nucleic acids research* 48 (22), S. 12483–12501. DOI: 10.1093/nar/gkaa1002.

Jonas, Brian A.; Pollyea, Daniel A. (2019): How we use venetoclax with hypomethylating agents for the treatment of newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 33 (12), S. 2795–2804. DOI: 10.1038/s41375-019-0612-8.

Kaluzki, Irina; Hailemariam-Jahn, Tsige; Doll, Monika; Kaufmann, Roland; Balermipas, Panagiotis; Zöller, Nadja et al. (2019): Dimethylfumarate Inhibits Colorectal Carcinoma Cell Proliferation: Evidence for Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy. In: *Cells* 8 (11), Artikel 1329, S. 1–14. DOI: 10.3390/cells8111329.

Kaluzki, Irina; Hrgovic, Igor; Hailemariam-Jahn, Tsige; Doll, Monika; Kleemann, Johannes; Valesky, Eva Maria et al. (2016): Dimethylfumarate inhibits melanoma cell proliferation via p21 and p53 induction and bcl-2 and cyclin B1 downregulation. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (10), S. 13627–13635. DOI: 10.1007/s13277-016-5285-6.

Kamiński, Marcin M.; Sauer, Sven W.; Kamiński, Marian; Opp, Silvana; Ruppert, Thorsten; Grigaravičius, Paulius et al. (2012): T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. In: *Cell reports* 2 (5), S. 1300–1315. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.10.009.

Kastrati, Irida; Siklos, Marton I.; Calderon-Gierszal, Esther L.; El-Shennawy, Lamiaa; Georgieva, Gergana; Thayer, Emily N. et al. (2016): Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (7), S. 3639–3647. DOI: 10.1074/jbc.M115.679704.

Koehler, Bruno Christian; Scherr, Anna-Lena; Lorenz, Stephan; Urbanik, Toni; Kautz, Nicole; Elssner, Christin et al. (2013): Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. In: *PloS one* 8 (10), Artikel e76446, 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0076446.

Kramer, Nina; Walzl, Angelika; Unger, Christine; Rosner, Margit; Krupitza, Georg; Hengstschläger, Markus; Dolznig, Helmut (2013): In vitro cell migration and invasion assays. In: *Mutation research* 752 (1), S. 10–24. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001.

Krenning, Lenno; Feringa, Femke M.; Shaltiel, Indra A.; van den Berg, Jeroen; Medema, René H. (2014): Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. In: *Molecular cell* 55 (1), S. 59–72. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.05.007.

Kuwana, Tomomi; Mackey, Mason R.; Perkins, Guy; Ellisman, Mark H.; Latterich, Martin; Schneider, Roger et al. (2002): Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. In: *Cell* (111), S. 331–342. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)01036-x.

Kvansakul, Marc; Hinds, Mark G. (2015): The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20 (2), S. 136–150. DOI: 10.1007/s10495-014-1051-7.

Lartigue, Lydia; Kushnareva, Yulia; Seong, Youngmo; Lin, Helen; Faustin, Benjamin; Newmeyer, Donald D. (2009): Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. In: *Molecular Biology of the Cell* 20 (23), S. 4871–4884. DOI: 10.1091/mbc.e09-07-0649.

Leal-Esteban, Lucia C.; Fajas, Lluís (2020): Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1866 (5), S. 165715. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165715.

Lee, Erinna F.; Perugini, Matthew A.; Pettikiriachchi, Anne; Evangelista, Marco; Keizer, David W.; Yao, Shenggen; Fairlie, W. Douglas (2016): The BECN1 N-terminal domain is intrinsically disordered. In: *Autophagy* 12 (3), S. 460–471. DOI: 10.1080/15548627.2016.1140292.

Lessene, Guillaume; Czabotar, Peter E.; Colman, Peter M. (2008): BCL-2 family antagonists for cancer therapy. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (12), S. 989–1000. DOI: 10.1038/nrd2658.

Liu, Hua; Feng, Xiao-De; Yang, Beng; Tong, Rong-Liang; Lu, Yue-Jie; Chen, Di-Yu et al. (2019): Dimethyl fumarate suppresses hepatocellular carcinoma progression via

activating SOCS3/JAK1/STAT3 signaling pathway. In: *Am J Transl Res* 11 (8), S. 4713–4725.

Liu, Lin; Qin, Shukui; Zheng, Yinghui; Han, Li; Zhang, Minmin; Luo, Nuo et al. (2017): Molecular targeting of VEGF/VEGFR signaling by the anti-VEGF monoclonal antibody BD0801 inhibits the growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. In: *Cancer biology & therapy* 18 (3), S. 166–176. DOI: 10.1080/15384047.2017.1282019.

Loewe, Robert; Valero, Teresa; Kremling, Silvia; Pratscher, Barbara; Kunstfeld, Rainer; Pehamberger, Hubert; Petzelbauer, Peter (2006): Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. In: *Cancer research* 66 (24), S. 11888–11896. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2397.

Maiuri, M. C.; Le Toumelin, G.; Criollo, A.; Rain, J. C.; Gautier, F.; Juin, P. et al. (2007): Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. In: *The EMBO Journal* 26 (10), S. 2527–2539. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601689.

Malumbres, Marcos; Barbacid, Mariano (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (3), S. 153–166. DOI: 10.1038/nrc2602.

Mármol, Inés; Sánchez-de-Diego, Cristina; Pradilla Dieste, Alberto; Cerrada, Elena; Rodríguez Yoldi, María Jesús (2017): Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 18 (1), Artikel 197, S. 1–39. DOI: 10.3390/ijms18010197.

Michalski, Marlen; Bauer, Magdalena; Walz, Franziska; Tümen, Deniz; Heumann, Philipp; Stöckert, Petra et al. (2023): Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. In: *Biomedicines* 11 (6), S. 1666. DOI: 10.3390/biomedicines11061666.

Mosier, Jenna A.; Schwager, Samantha C.; Boyajian, David A.; Reinhart-King, Cynthia A. (2021): Cancer cell metabolic plasticity in migration and metastasis. In: *Clinical & experimental metastasis* 38 (4), S. 343–359. DOI: 10.1007/s10585-021-10102-1.

Mourier, Arnaud; Ruzzenente, Benedetta; Brandt, Tobias; Kühlbrandt, Werner; Larsson, Nils-Göran (2014): Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. In: *Human molecular genetics* 23 (10), S. 2580–2592. DOI: 10.1093/hmg/ddt652.

Müllers, Erik; Silva Cascales, Helena; Jaiswal, Himjyot; Saurin, Adrian T.; Lindqvist, Arne (2014): Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (17), S. 2733–2743. DOI: 10.4161/15384101.2015.945831.

Nicolay, Jan P.; Melchers, Susanne; Albrecht, Jana D.; Assaf, Chalid; Dippel, Edgar; Stadler, Rudolf et al. (2023): Dimethyl fumarate treatment in relapsed and refractory cutaneous T-cell lymphoma: a multicenter phase 2 study. In: *Blood* 142 (9), S. 794–805. DOI: 10.1182/blood.2022018669.

Nicolay, Jan P.; Müller-Decker, Karin; Schroeder, Anne; Brechmann, Markus; Möbs, Markus; Géraud, Cyrill et al. (2016): Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF-κB. In: *Blood* 128 (6), S. 805–815. DOI: 10.1182/blood-2016-01-694117.

Nirmala, J. Grace; Lopus, Manu (2020): Cell death mechanisms in eukaryotes. In: *Cell biology and toxicology* 36 (2), S. 145–164. DOI: 10.1007/s10565-019-09496-2.

Oberstein, Adam; Jeffrey, Philip D.; Shi, Yigong (2007): Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (17), S. 13123–13132. DOI: 10.1074/jbc.M700492200.

Odom, R. Y.; Dansby, M. Y.; Rollins-Hairston, A. M.; Jackson, K. M.; Kirlin, W. G. (2009): Phytochemical induction of cell cycle arrest by glutathione oxidation and reversal by N-acetylcysteine in human colon carcinoma cells. In: *Nutrition and cancer* 61 (3), S. 332–339. DOI: 10.1080/01635580802549982.

Perimenis, Philippos; Galaris, Apostolos; Voulgari, Alexandra; Prassa, Margarita; Pintzas, Alexander (2016): IAP antagonists Birinapant and AT-406 efficiently synergise with either TRAIL, BRAF, or BCL-2 inhibitors to sensitise BRAFV600E colorectal tumour cells to apoptosis. In: *BMC cancer* 16, S. 624. DOI: 10.1186/s12885-016-2606-5.

Piroli, Gerardo G.; Manuel, Allison M.; Patel, Tulsi; Walla, Michael D.; Shi, Liang; Lanci, Scott A. et al. (2019): Identification of Novel Protein Targets of Dimethyl Fumarate Modification in Neurons and Astrocytes Reveals Actions Independent of Nrf2 Stabilization. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 18 (3), S. 504–519. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000922.

Ramesh, Prashanthi; Medema, Jan Paul (2020): BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 25 (5-6), S. 305–320. DOI: 10.1007/s10495-020-01601-9.

Richard-Carpentier, Guillaume; DiNardo, Courtney D. (2019): Venetoclax for the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients who are ineligible for intensive chemotherapy. In: *Therapeutic Advances in Hematology* 10, S. 1–14. DOI: 10.1177/2040620719882822.

Roberts, Andrew W.; Davids, Matthew S.; Pagel, John M.; Kahl, Brad S.; Puvvada, Soham D.; Gerecitano, John F. et al. (2016): Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 374 (4), S. 311–322. DOI: 10.1056/NEJMoa1513257.

Rubin, Seth M.; Sage, Julien; Skotheim, Jan M. (2020): Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. In: *Molecular cell* 80 (2), S. 183–192. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.08.020.

Rudin, Charles M.; Hann, Christine L.; Garon, Edward B.; Ribeiro de Oliveira, Moacyr; Bonomi, Philip D.; Camidge, D. Ross et al. (2012): Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (11), S. 3163–3169. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.

Saidu, Nathaniel Edward Bennett; Kavian, Niloufar; Leroy, Karen; Jacob, Claus; Nicco, Carole; Batteux, Frédéric; Alexandre, Jérôme (2019): Dimethyl fumarate, a two-edged drug: Current status and future directions. In: *Medicinal research reviews* 39 (5), S. 1923–1952. DOI: 10.1002/med.21567.

Saidu, Nathaniel Edward Bennett; Noé, Gaëlle; Cerles, Olivier; Cabel, Luc; Kavian-Tessler, Niloufar; Chouzenoux, Sandrine et al. (2017): Dimethyl Fumarate Controls the NRF2/DJ-1 Axis in Cancer Cells: Therapeutic Applications. In: *Molecular cancer therapeutics* 16 (3), S. 529–539. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0405.

Schimmer, Aaron D.; O'Brien, Susan; Kantarjian, Hagop; Brandwein, Joseph; Cheson, Bruce D.; Minden, Mark D. et al. (2008): A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. In: *Clinical*

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14 (24), S. 8295–8301. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0999.

Schimmer, Aaron D.; Raza, Azra; Carter, Thomas H.; Claxton, David; Erba, Harry; DeAngelo, Daniel J. et al. (2014): A multicenter phase I/II study of obatoclox mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia. In: *PloS one* 9 (10), Artikel e108694, 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0108694.

Schmitt, Anja; Xu, Wendan; Bucher, Philip; Grimm, Melanie; Konantz, Martina; Horn, Heike et al. (2021): Dimethyl fumarate induces ferroptosis and impairs NF- κ B/STAT3 signaling in DLBCL. In: *Blood* 138 (10), S. 871–884. DOI: 10.1182/blood.2020009404.

Schrag, Deborah; Shi, Qian; Weiser, Martin R.; Gollub, Marc J.; Saltz, Leonard B.; Musher, Benjamin L. et al. (2023): Preoperative Treatment of Locally Advanced Rectal Cancer. In: *The New England journal of medicine* 389 (4), S. 322–334. DOI: 10.1056/NEJMoa2303269.

Schroeder, Anne; Warnken, Uwe; Röth, Daniel; Klika, Karel D.; Vobis, Diana; Barnert, Andrea et al. (2017): Targeting Thioredoxin-1 by dimethyl fumarate induces ripoptosome-mediated cell death. In: *Scientific reports* 7, S. 43168. DOI: 10.1038/srep43168.

Şener, Özge Ç.; Melchers, Susanne; Tengler, Luisa; Beltzig, Paul L.; Albrecht, Jana D.; Tümen, Deniz et al. (2025): Dimethyl fumarate and extracorporeal photopheresis combination-therapy synergize in inducing specific cell death and long-term remission in cutaneous T cell lymphoma. In: *Leukemia* 39 (2), S. 438–450. DOI: 10.1038/s41375-024-02479-1.

Seymour, John F.; Kipps, Thomas J.; Eichhorst, Barbara; Hillmen, Peter; D'Rozario, James; Assouline, Sarit et al. (2018): Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 378 (12), S. 1107–1120. DOI: 10.1056/NEJMoa1713976.

Shamas-Din, Aisha; Kale, Justin; Leber, Brian; Andrews, David W. (2013): Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (4), Artikel a008714, 1-21. DOI: 10.1101/cshperspect.a008714.

Shertzer, Howard G.; Genter, Mary Beth; Shen, Dongxiao; Nebert, Daniel W.; Chen, Ying; Dalton, Timothy P. (2006): TCDD decreases ATP levels and increases reactive oxygen production through changes in mitochondrial F(0)F(1)-ATP synthase and ubiquinone. In: *Toxicology and applied pharmacology* 217 (3), S. 363–374. DOI: 10.1016/j.taap.2006.09.014.

Singhal, Rashi; Mitta, Sreedhar R.; Das, Nupur K.; Kerk, Samuel A.; Sajjakulnukit, Peter; Solanki, Sumeet et al. (2021): HIF-2 α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron. In: *The Journal of clinical investigation* 131 (12). DOI: 10.1172/JCI143691.

Soderquist, Ryan S.; Crawford, Lorin; Liu, Esther; Lu, Min; Agarwal, Anika; Anderson, Gray R. et al. (2018): Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3513. DOI: 10.1038/s41467-018-05815-z.

Souers, Andrew J.; Levenson, Joel D.; Boghaert, Erwin R.; Ackler, Scott L.; Catron, Nathaniel D.; Chen, Jun et al. (2013): ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. In: *Nature medicine* 19 (2), S. 202–208. DOI: 10.1038/nm.3048.

Stilgenbauer, Stephan; Eichhorst, Barbara; Schetelig, Johannes; Coutre, Steven; Seymour, John F.; Munir, Talha et al. (2016): Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. In: *The Lancet. Oncology* 17 (6), S. 768–778. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30019-5.

Tappenden, Dorothy M.; Lynn, Scott G.; Crawford, Robert B.; Lee, KangAe; Vengellur, Ajith; Kaminski, Norbert E. et al. (2011): The aryl hydrocarbon receptor interacts with ATP5 α 1, a subunit of the ATP synthase complex, and modulates mitochondrial function. In: *Toxicology and applied pharmacology* 254 (3), S. 299–310. DOI: 10.1016/j.taap.2011.05.004.

Valesky, Eva Maria; Hrgovic, Igor; Doll, Monika; Wang, Xiao-Fan; Pinter, Andreas; Kleemann, Johannes et al. (2016): Dimethylfumarate effectively inhibits lymphangiogenesis via p21 induction and G1 cell cycle arrest. In: *Experimental dermatology* 25 (3), S. 200–205. DOI: 10.1111/exd.12907.

Vercellino, Irene; Sazanov, Leonid A. (2022): The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 23 (2), S. 141–161. DOI: 10.1038/s41580-021-00415-0.

Vishnupriya, Selvaraj; Priya Dharshini, Loganathan Chandramani; Sakthivel, Kunnathur Murugesan; Rasmi, Rajan Radha (2020): Autophagy markers as mediators of lung injury-implication for therapeutic intervention. In: *Life sciences* 260, S. 118308. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118308.

Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V. E.; Zhou, S.; Diaz, L. A.; Kinzler, K. W. (2013): Cancer Genome Landscapes. In: *Science* 339 (6127), S. 1546–1558. DOI: 10.1126/science.1235122.

Vogelstein, Bert; Kinzler, Kenneth W. (2015): The Path to Cancer — Three Strikes and You're Out. In: *The New England journal of medicine* 373 (20), S. 1895–1898. DOI: 10.1056/NEJMp1508811.

Warren, Chloe F. A.; Wong-Brown, Michelle W.; Bowden, Nikola A. (2019): BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. In: *Cell death & disease* 10 (3), S. 177. DOI: 10.1038/s41419-019-1407-6.

Whittle, James R.; Vaillant, François; Surgenor, Elliot; Policheni, Antonia N.; Giner, Göknur; Capaldo, Bianca D. et al. (2020): Dual Targeting of CDK4/6 and BCL2 Pathways Augments Tumor Response in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 26 (15), S. 4120–4134. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1872.

Wild, C. P.; Weiderpass, E.; Stewart, B. W. (2020): World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Online verfügbar unter <http://publications.iarc.fr/586>, zuletzt geprüft am 12.03.2024.

Wilson, Wyndham H.; O'Connor, Owen A.; Czuczman, Myron S.; LaCasce, Ann S.; Gerecitano, John F.; Leonard, John P. et al. (2010): 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. In: *The Lancet. Oncology* 11 (12), S. 1149–1159. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70261-8.

Xie, Xin; Zhao, Yu; Ma, Chun-Yan; Xu, Xiao-Ming; Zhang, Yan-Qiu; Wang, Chen-Guang et al. (2015): Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway. In: *British journal of pharmacology* 172 (15), S. 3929–3943. DOI: 10.1111/bph.13184.

Xie, Yuan-Hong; Chen, Ying-Xuan; Fang, Jing-Yuan (2020): Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. In: *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), S. 22. DOI: 10.1038/s41392-020-0116-z.

Zanotelli, Matthew R.; Zhang, Jian; Reinhart-King, Cynthia A. (2021): Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis. In: *Cell metabolism* 33 (7), S. 1307–1321. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.04.002.

Zeng, Chao; Zhang, Zhixuan; Luo, Wei; Wang, Liyang; Zhou, Hang; Nie, Chunlai (2022): JNK initiates Beclin-1 dependent autophagic cell death against Akt activation. In: *Experimental cell research* 414 (2), S. 113105. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113105.

8 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Simon Matthias Wagner, geboren am 12.08.1997 in München, 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 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 erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im spannenden Forschungsfeld der Gastroenterologie durchzuführen und die fortwährende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Ausdrücklich erwähnt sei hier, dass Frau Prof. Dr. Müller-Schilling meine Bewerbung für das Promotionsstipendium der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg mit größtem Einsatz unterstützte. Zudem ermutigte und ermöglichte mir Frau Prof. Dr. Müller-Schilling meine Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen. Hierdurch konnte ich meine eigenen Ergebnisse mit (inter)nationalen Wissenschaftler*innen und Ärzt*innen diskutieren und hilfreiches Feedback für die Gestaltung meines Forschungsprojekts gewinnen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Kathrin Renner-Sattler und Herrn PD Dr. Karsten Gülow für ihre Mentorentätigkeit im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Insbesondere Herrn PD Dr. Karsten Gülow danke ich für die Wahl des spannenden Themas, die fortlaufende Planung meines Projektes, die zahlreichen, hilfreichen Tipps zur Umsetzung diverser Experimente, die Hilfestellung bei der Datenauswertung und das Korrekturlesen dieser Doktorarbeit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Marlen Michalski bedanken, die mich ebenso tatkräftig bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Versuche unterstützte und stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. Claudia Kunst für die Unterstützung meiner Bewerbung für das Promotionsstipendium der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg, die lehrreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die Korrektur wissenschaftlicher Kongressbeiträge sowie dieser Doktorarbeit bedanken.

Bei allen Forschungsmitgliedern der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I bedanke ich mich für die hilfreiche Unterstützung im Laboralltag und die herzliche Arbeitsatmosphäre. Außerdem bedanke ich mich bei allen medizinischen und naturwissenschaftlichen Doktoranden, die meinen Laboralltag bereichert haben.

Ein weiterer Dank für die gute Zusammenarbeit geht an Anne Schröder (TRON, Mainz).

Herzlichen Dank an Alle!

10 Lebenslauf