

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

Anti-apoptotische Bcl-2 Proteine  
als potenzielle therapeutische Zielstrukturen  
beim Hepatozellulären Karzinom

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Walz

2026



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

Anti-apoptotische Bcl-2 Proteine  
als potenzielle therapeutische Zielstrukturen  
beim Hepatozellulären Karzinom

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Walz

2026

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

PD Dr. Karsten Gülow

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Anja Wege

Tag der mündlichen Prüfung:

12.05.2026

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung .....	4
1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC).....	4
1.1.1 Epidemiologie .....	4
1.1.2 Risikofaktoren.....	4
1.1.3 Prävention und Früherkennung .....	5
1.1.4 Diagnose .....	6
1.1.5 Klassifikation und Prognose .....	6
1.1.6 Therapie .....	7
1.1.7 Systemische Therapie .....	8
1.1.8 Molekularer Hintergrund .....	10
1.2 Apoptose .....	11
1.2.1 Intrinsische Apoptose .....	13
1.2.2 Extrinsische Apoptose .....	13
1.2.3 Schnittstelle zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose .....	14
1.2.4 Die BCL-2 Familie.....	15
1.2.5 Apoptose- und Therapieresistenz in Tumoren.....	16
1.3 BH3-Mimetika .....	18
1.3.1 ABT-199/ Venetoclax.....	18
1.3.2 MIK665/ S64315.....	19
1.4 Anti-apoptotische BCL-2 Moleküle und BH3-Mimetika in soliden Tumoren .....	19
1.4.1 BCL-2 und BH3-Mimetika im HCC.....	20
1.5 Rationale für die Anwendung der Kombination aus ABT-199 und MIK665 .....	20
1.5.1 Rationale für die Anwendung von BH3-Mimetika im HCC .....	21
1.6 Rationale für die Analyse von BH3-Mimetika in HepG2 Zellen.....	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Zelllinien .....	25
2.1.2 Antikörper .....	25

2.1.3	siRNA .....	27
2.1.4	Reagenzsysteme .....	27
2.1.5	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien .....	27
2.1.6	Verbrauchsmaterial.....	29
2.1.7	Geräte.....	30
2.1.8	Software .....	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien HepG2, Hep3B und Huh7 .....	31
2.2.2	Behandlung der Zellen mit ABT-199 und MIK665 .....	32
2.2.3	Analyse des Zelltods mittels Durchflusszytometrie.....	33
2.2.4	Bestimmung der Zellviabilität.....	33
2.2.5	Bestimmung der Caspaseaktivität .....	34
2.2.6	siRNA-vermittelter Knockdown .....	34
2.2.7	Immunfluoreszenz .....	35
2.2.8	Proteinlysate .....	35
2.2.9	Quantifizierung der Proteinmenge .....	35
2.2.10	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.2.11	Western Blot .....	36
2.2.12	Statistik .....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	HCC-Zelllinien weisen unterschiedliche Expressions-Level anti-apoptotischer BCL-2 Familienmitglieder auf .....	38
3.2	Die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 induziert die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium.....	38
3.3	Die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 induziert Caspaseaktivität.....	42
3.3.1	Aktivierung von Caspase 9 .....	42
3.3.2	Aktivierung von Effektorcaspasen und Spaltung von PARP .....	44
3.4	Die Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665 führt zu ATP-Depletion/Vitalitätsverlust .....	46
3.5	Inhibition von BCL-2-Familienmitgliedern induziert Zelltod .....	48
3.5.1	Die Kombinationsbehandlung aus MIK665 und ABT-199 induziert mehr Zelltod als die Monotherapien.....	49
3.5.2	ABT-199 und MIK665 wirken synergistisch .....	52

3.6	Bei dem durch MIK665 und ABT-199 induzierten Zelltod handelt es sich um Apoptose .....	54
3.7	Die Induktion von Zelltod ist direkt auf die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 zurückzuführen .....	56
3.7.1	Herunterregulation von Mcl-1 oder Bcl-2 durch siRNA führt zu einem besseren Ansprechen auf die Behandlung mit MIK665 und ABT-199 .....	57
4	Diskussion .....	61
5	Ausblick .....	66
6	Zusammenfassung .....	67
7	Anhang .....	69
7.1	Tabellenverzeichnis .....	69
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	69
8	Literatur .....	71
9	Danksagung .....	91
10	Selbstständigkeitserklärung .....	93

## Abkürzungsverzeichnis

ABB	Annexin Binding Buffer
AFP	Alpha-Fetoprotein
AML	Akute Myeloische Leukämie
APAF-1	Apoptotic Protease-activating Factor 1
ASL	Altersstandardisierte Inzidenzrate
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BH	BCL-2 Homologie
BH3	BCL-2-Homologie-Domäne 3
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serum Albumin
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use; Ausschuss für Humanarzneimittel
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CLS	Cell Lines Service
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCCP	Carbonylcyanid-p- trifluormethoxyphenylhydrazon
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FITC Annexin V	Fluoresceinisothiocyanat konjugiertes Annexin V
FKS	Fötale Kälberserum
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IL	Intensität der Lumineszenz
MASLD	Metabolische Dysfunktion-assozierte steatotische Lebererkrankung
MASH	Metabolische Dysfunktion-assozierte Steatohepatitis
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEM	Minimum Essential Medium
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation; Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
MW	Mittelwert
PARP	Poly (ADP-ribose)-Polymerasen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PMS	Phenazinmethosulfat

## Abkürzungsverzeichnis

PVDF	polyvinylidene difluoride
RCD	Regulated cell death; regulierter Zelltod
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
SBRT	stereotactic body radiation therapy; Stereotaktische Radiotherapie
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SIRT	selektive interne Radiotherapie
SLL	Small Lymphocytic Lymphoma; kleines lymphatisches Lymphom
Smac/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
tBid	truncated Bid; gespaltenes Bid
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZT	Zelltod
zVAD-fmk	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

# 1 Einleitung

## 1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor bei Erwachsenen und entsteht aus Hepatozyten oder ihren Vorläuferzellen (1). Das HCC macht 75-85% aller primären Lebertumoren aus, gefolgt vom intrahepatischen Cholangiokarzinom als zweithäufigster Tumorentität (2, 3).

### 1.1.1 Epidemiologie

Primäre Lebertumore sind die sechsthäufigste Entität maligner Tumoren und die dritthäufigste krebserkrankte Todesursache weltweit. 2022 wurden rund 865,000 neue Fälle und 757,948 Todesfälle durch das HCC weltweit registriert. Männer sind dabei zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen. Die Inzidenzraten sind insbesondere in Ländern in Ost- und Südostasien sowie Nord- und Westafrika hoch (2, 4). Die weltweite Inzidenz primärer Lebertumoren nahm zwischen 1990 und 2015 um 75% zu. Dieser Anstieg lässt sich größtenteils durch das Bevölkerungswachstum und die zunehmende Alterung der Bevölkerung erklären (5). Um die relative Krankheitshäufigkeit zu analysieren, greift man auf die altersstandardisierte Inzidenzrate (ASR) zurück. Diese berücksichtigt sowohl die Bevölkerungszahl als auch die Altersverteilung innerhalb einer Population. 2000-2019 war die ASR für das HCC und für primäre Lebertumoren global rückläufig, wobei sich in den letzten Jahren ein Plateau einstellte. Besonders in Ost- und Südostasien, Ozeanien und Sub-Sahara-Afrika war die ASR rückläufig. Gleichzeitig nahm diese Rate in den meisten Ländern Europas, Amerikas, Nordafrikas und dem Nahen Osten zu (6–8).

Prognosen zufolge werden Inzidenz und Mortalität primärer Lebertumoren in den nächsten Jahren insgesamt weiter ansteigen. Zwischen 2020 und 2040 werde die Inzidenz um 55% ansteigen, auf 1,4 Millionen neuer Fälle 2040. Auch dieser Trend reflektiere in erster Linie die stabilen Inzidenz-Raten und die wachsende sowie alternde Bevölkerung (9).

### 1.1.2 Risikofaktoren

In über 90% der Fälle entwickelt sich das HCC auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung (3). Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache ist die Leberzirrhose der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung des HCCs (10, 11). Sie ist gekennzeichnet durch die fortschreitende Zerstörung der Leberstruktur

## Einleitung

und -funktion aufgrund einer entzündlichen Fibrosierung. Dieser Prozess tritt im fortgeschrittenen Stadium bei Lebererkrankungen unterschiedlicher Ursachen auf (12).

Ein großer Teil der globalen HCC-Fälle entsteht bei Menschen mit chronischer Hepatitis B (2019 41% der Fälle) oder Hepatitis C (28,5%) (13). Übergewicht, Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom fördern die Entstehung der metabolisch-assoziierten steatotischen Lebererkrankung (engl.: Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease, MASLD) und der metabolisch-assoziierten Steatohepatitis (engl.: Metabolic Dysfunction-associated Steatohepatitis, MASH). Daraus kann sich direkt oder über die Leberzirrhose ein HCC entwickeln (14–16). Weitere wichtige Risikofaktoren sind Aflatoxin-Exposition, Alkohol- und Tabakkonsum (17–20). So lag 2019 in 18,4% eine alkohol-assoziierte Lebererkrankung zugrunde, in 6,8% MASLD und in 5,3% andere weniger häufige Risikofaktoren (13).

In den Hochrisikoländern Asiens und Afrikas ist die hohe Inzidenz des HCC vorwiegend auf eine hohe Prävalenz von Virushepatitiden und Aflatoxinexposition zurückzuführen. Durch Impfungen gegen Hepatitis B, Behandlung chronischer Hepatitis C und geringere Aflatoxinexposition sinkt die Prävalenz der Hauptrisikofaktoren in diesen Gebieten und damit die Inzidenz des HCC (2, 6).

In westlichen Ländern sind die meisten Fälle auf Hepatitis C und Alkohol zurückzuführen (5, 21). Die Zunahme in den letzten Jahrzehnten zumindest in den Vereinigten Staaten ist vermutlich zu einem großen Teil auf die Infektionswelle mit dem Hepatitis C Virus zwischen 1960 und 1980 zurückzuführen (22). Des Weiteren ist die Zahl der übergewichtigen und adipösen Menschen in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Diabetes und Übergewicht stellen mit zunehmender Prävalenz immer wichtiger werdende Risikofaktoren dar (14, 23–25). So sind in den USA bereits ca. 15-20% der HCC-Fälle auf eine MASLD zurückzuführen (14).

### **1.1.3 Prävention und Früherkennung**

Eine wichtige Rolle in der Prävention des HCC kommt der Behandlung zugrundeliegender Erkrankungen zu. Einer Infektion mit Hepatitis B kann heutzutage durch eine Impfung vorgebeugt werden. Diese ist in Deutschland als Teil der Standardimmunisierungen bereits im Säuglingsalter empfohlen (26, 27). Des Weiteren können Aufklärungsmaßnahmen, geschützter Geschlechtsverkehr und Nadel- bzw. Spritzenaustauschprogramme für Drogenkonsumierende entscheidend dazu beitragen, die Transmission viraler Hepatitiden zu reduzieren. Im Falle einer Infektion

gibt es heutzutage effektive Therapieoptionen, die die Virus- und Krankheitslast und damit das Risiko für die Entstehung des HCC reduzieren können (28). Patientinnen und Patienten mit nichtinsulinpflichtigem Diabetes mellitus wird die Behandlung mit Metformin empfohlen. Zudem wird der Verzicht auf Alkohol empfohlen (27).

Früherkennungsprogramme gibt es für Risiko-Patientinnen und -Patienten; so soll Patientinnen und Patienten mit Leberzirrhose (Child-Pugh A oder B) sowie Personen, die für eine Lebertransplantation gelistet sind, eine halbjährliche Ultraschalluntersuchung angeboten werden. Diese kann gegebenenfalls durch die Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) ergänzt werden (27, 29).

### **1.1.4 Diagnose**

Das HCC wird in der Regel mittels bildgebender Verfahren (kontrastmittelverstärkter Ultraschall, Magnetresonanztomographie oder Computertomographie) diagnostiziert, da es ein sehr charakteristisches Kontrastmittelverhalten vorweist. Das Kontrastmittel wird in der arteriellen Phase angereichert, in der portalvenösen Phase oder der Spätphase wieder ausgewaschen, wodurch der Tumor kontrastmittelermer erscheint als das umgebende Gewebe. Bei unklarem Befund, in palliativen Situationen oder bei verdächtiger Läsion in Betroffenen ohne Zirrhose sollte zusätzlich eine Biopsie erfolgen. Bei Läsionen kleiner als 1 cm werden regelmäßige Kontrollen empfohlen (27, 29)

### **1.1.5 Klassifikation und Prognose**

Die Einteilung des HCC erfolgt üblicherweise nach der Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) – Klassifikation in die Stadien 0, A - D (30). Diese wird auch von der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) in der HCC Leitlinie empfohlen (27). Es fließen Tumorausbreitung, allgemeiner Gesundheitszustand bzw. funktionale Leistungsfähigkeit (Performance Status nach Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG-PS) und die Leberfunktion mit ein. Letztere ist insbesondere relevant, da die Behandlungsoptionen durch eine eingeschränkte Leberfunktion eingeschränkt werden. Eine Diagnose in späten Stadien geht mit einer schlechteren Prognose einher.

Die BRIDGE-Studie (Datenerhebung 2005-2012) ergab, dass in Europa und Nordamerika die meisten Fälle des HCC erst in fortgeschrittenen Stadien (BCLC C) diagnostiziert wurden, mit mehr als 50% der Diagnosen in den BCLC-Stadien C und D. Dahingegen wurden in Taiwan und Japan die meisten Fälle bereits in den

## Einleitung

BCLC-Stadien 0 oder A diagnostiziert. Dies sei vermutlich auf bessere Früherkennungsprogramme zurückzuführen (31). Die Statistik des SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) zeigt, dass in den USA nur 44% der primären Leber- und intrahepatischen Gallenwegstumore im lokalisierten, auf die Leber begrenzten Stadium diagnostiziert wurden (Daten von 2000-2022) (32).

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei primärem Leberkrebs (Tumore der Leberzellen und der intrahepatischen Gallengänge) beträgt in den USA ca. 22%, mit einer Zunahme in den letzten Jahren (Stand 2025) (32). Zwischen 2010 und 2014 betrug die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Leberkrebs in den USA und den meisten Ländern Europas inklusive Deutschland 10-19% (33).

### 1.1.6 Therapie

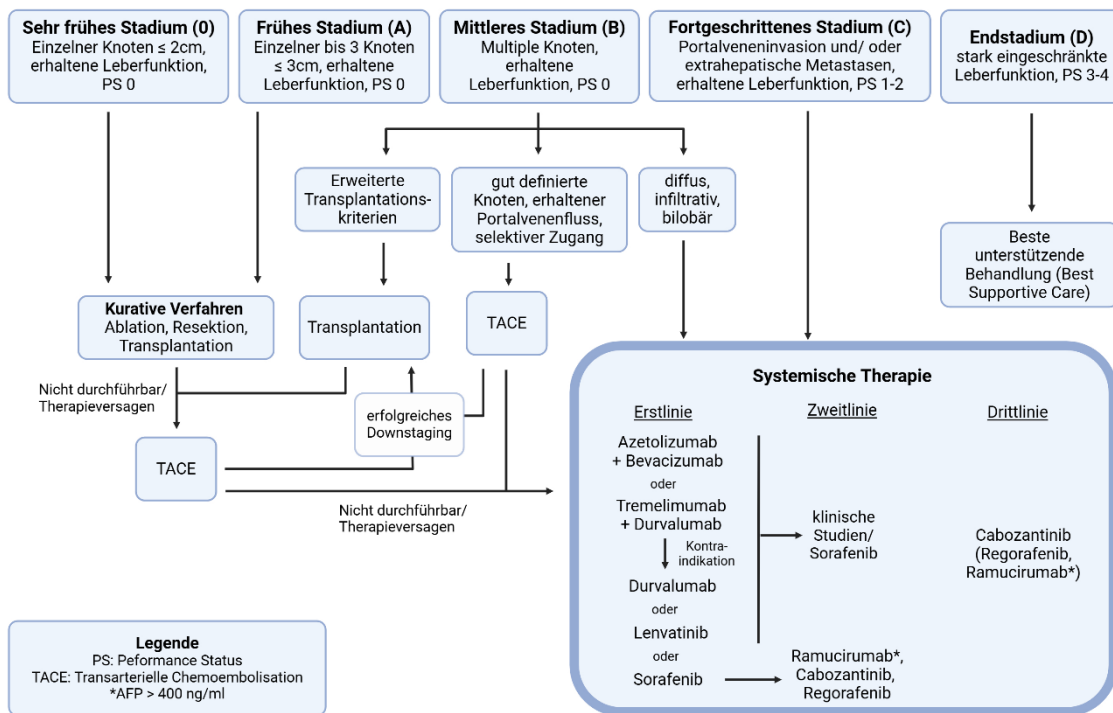
In frühen Stadien mit geringer Tumorausbreitung (bis 3 Herde mit bis zu 3 cm) und gutem Gesundheitszustand (BCLC 0, A) sind kurative Ansätze verfügbar. Hierzu gehören an erster Stelle die Resektion, bei Irresektabilität die Ablation (Radiofrequenz- oder Mikrowellenablation), alternativ die selektive interne Radiotherapie (SIRT) oder die Stereotaktische Radiotherapie (engl.: stereotactic body radiation therapy; SBRT). Bei Patientinnen und Patienten innerhalb der sogenannten Milan-Kriterien (max. 1 Herd  $\leq$  5 cm oder max. 3 Herde  $\leq$  3 cm, Performance Status ECOG 0) besteht außerdem die Möglichkeit der Lebertransplantation (Abbildung 1) (29, 30). Im mittleren Stadium (BCLC B) besteht in manchen Fällen – bei Betroffenen innerhalb der erweiterten Transplantations-Kriterien – ebenfalls die Möglichkeit zur Transplantation (27, 30). Alternativ kann mit Transarterieller Chemoembolisation (TACE) behandelt werden, wobei die arteriellen Gefäße des Tumors gezielt embolisiert werden. Durch die resultierende Hypoxie kann das bei der Intervention lokal injizierte Chemotherapeutikum besser wirken (34). Bei erfolgreichem Downstaging kann eine Lebertransplantation oder Resektion angeschlossen werden (29, 30).

Bei diffusem, infiltrativem Wachstum im BCLC Stadium B, Kontraindikationen gegen andere Therapieoptionen oder Therapieversagen kann eine systemische Therapie durchgeführt werden. Diese wird ebenfalls durchgeführt bei fortgeschrittenem Stadium (Gefäßinvasion, extrahepatische Metastasierung) oder reduziertem Allgemeinzustand (Performance Status ECOG 1-2) (BCLC C). Hierfür stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung (vgl. Abbildung 1, 1.1.7) (3, 19, 27, 29, 30). Insgesamt erhalten ca. 50-60% aller Betroffenen eine systemische Therapie, entweder aufgrund einer Diagnose in fortgeschrittenem Stadium oder bei Progress nach chirurgischer oder

## Einleitung

lokoregionärer Therapie (3). Die Behandlung mit systemischer Therapie verfolgt in der Regel einen palliativen Ansatz. Das mittlere Überleben ist wesentlich schlechter als in frühen Stadien (30, 32).

Patientinnen und Patienten mit stark eingeschränkter Leberfunktion bzw. sehr schlechtem Gesundheitszustand (BCLC Stadium D) sollten symptomatisch behandelt werden (30).



**Abbildung 1: Therapieschema bei Hepatozellulärem Karzinom nach BCLC**

Die Therapie des Hepatozellulären Karzinoms hängt von Stadium, Leberfunktion und allgemeinem Gesundheitszustand ab. Je nach BCLC-Stadium stehen kurative Verfahren wie Ablation, Resektion oder Transplantation, oder systemische Therapien zur Verfügung. Schema vereinfacht nach den Richtlinien der BCLC (30), erstellt mit biorender.com. BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer, PS: Performance Status nach Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), TACE: Transarterielle Chemoembolisation, AFP: Alpha-Fetoprotein.

### 1.1.7 Systemische Therapie

Über viele Jahre war der Multikinaseinhibitor Sorafenib die einzige wirksame systemische Therapie für ein fortgeschrittenes HCC. In der SHARP-Studie (Datenerhebung bis 2006) verlängerte Sorafenib das mediane Gesamtüberleben auf 10,7 Monate und damit um drei Monate im Vergleich zum Placebo (35). In neueren Studien konnte ein medianes Gesamtüberleben von 14,7 Monaten (CheckMate-459, Datenerhebung bis 2019) bzw. 13,4 Monaten (IMbrave150, Datenerhebung bis 2020)

## Einleitung

mit Sorafenib erreicht werden, was sich unter anderem durch verbesserte Supportiv- und Folgetherapien erklären lässt (36, 37).

Die IMbrave150-Studie zeigte, dass die Kombination aus dem PD-L1-neutralisierenden Antikörper Atezolizumab und dem VEGF-neutralisierenden Antikörper Bevacizumab das mediane Gesamtüberleben auf 19,2 Monate verlängerte. Zudem betrug das progressionsfreie Überleben 6,9 Monate im Vergleich zu 4,3 Monaten unter Sorafenib (37, 38). Atezolizumab ist ein Immuncheckpoint-Inhibitor und fördert die Immunantwort des Körpers gegen den Tumor. Als neutralisierender Antikörper gegen VEGF moduliert Bevacizumab die Angiogenese des Tumors und vermindert so die Gefäß- und damit Nährstoffversorgung des Tumors (39). Die Kombination wurde 2020 von der Food and Drug Administration (FDA, USA) und der European Medicines Agency (EMA) zugelassen und ist mittlerweile die bevorzugte Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem HCC (Abbildung 1) (3, 19, 27, 30). Im Jahr 2022 wurde die Kombination aus den Immuncheckpoint-Inhibitoren Tremelimumab, einem CTLA-4-neutralisierenden Antikörper, und Durvalumab, einem PD-L1-neutralisierenden Antikörper, als weitere Erstlinientherapie von der FDA zugelassen. In der HIMALAYA-Studie (Datenerhebung bis 2021) erreichte diese Kombination ein medianes Gesamtüberleben von 16,4 Monaten im Vergleich zu 13,8 Monaten unter Sorafenib (40, 41). Eine weitere Kombinationstherapie, Ipilimumab, ein CTLA-4-neutralisierender Antikörper, in Kombination mit Nivolumab, einem PD-1-neutralisierenden Antikörper, wurde in der CheckMate-9DW Studie untersucht (NCT04039607, CheckMate-9DW) (42). Der Ausschuss für Humanarzneimittel (engl.: Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) hat am 31.01.2025 die Zulassung von Nivolumab plus Ipilimumab für die Erstlinienbehandlung erwachsener Patientinnen und Patienten mit inoperablem oder fortgeschrittenem HCC empfohlen (43). Die Empfehlung basiert auf den Ergebnissen der klinischen Phase-III-Studie CheckMate-9DW, die eine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit mit Nivolumab plus Ipilimumab im Vergleich zu Lenvatinib oder Sorafenib belegen.

Bei Kontraindikationen gegen Immuntherapien sollen Sorafenib oder Lenvatinib eingesetzt werden. Lenvatinib ist ein weiterer Multikinaseinhibitor, der sich als ebenso effektiv wie Sorafenib erwies (REFLECT, Datenerhebung bis 2015) (30, 44). Durch die Kinase-Inhibition hemmen beide Substanzen die Tumor-Angiogenese und die Proliferation (45, 46).

## Einleitung

Weitere Behandlungsoptionen werden derzeit in Studien untersucht, darunter die Kombination von Lenvatinib mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (47) und die Kombination aus Systemtherapie und regionalen Verfahren wie TACE oder Ablation (48, 49).

Ungefähr 30 – 50 % der Betroffenen erhalten eine Zweitlinientherapie (11). Als Zweitlinientherapie nach Sorafenib stehen Regorafenib, Cabozantinib und Ramucirumab (bei AFP  $\geq$  400 ng/ml) zur Verfügung (30, 50, 51) (Abbildung 1). Zur Wirksamkeit von Zweitlinientherapien nach Atezolizumab + Bevacizumab fehlen noch klinische Daten. In der S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms“ der DGVS wird nach Progress unter Atezolizumab + Bevacizumab oder Tremelimumab + Durvalumab die Gabe von Sorafenib empfohlen (27).

Trotz der verfügbaren Therapien ist die Prognose beim HCC im fortgeschrittenen Stadium ungünstig (3, 30, 51, 52). Das HCC ist therapieresistent, weshalb dringend neue therapeutische Alternativen benötigt werden.

### 1.1.8 Molekularer Hintergrund

Die Anhäufung von somatischen und epigenetischen Alterationen spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung des HCC. Im Schnitt weist jedes HCC ca. 60-70 somatische Mutationen auf. Die häufigste somatische Mutation im HCC betrifft die Promotorregion des Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Gens (60%). Dies führt zu einer vermehrten Expression der Telomerase, wodurch die Zellseneszenz verhindert wird und sich die Zellen kontinuierlich teilen. Dabei kommt es zur Anhäufung von Fehlern (53). Am zweithäufigsten ist das Gen CTNNB1 betroffen. Dieses und weitere mutierte Gene wie AXIN1 oder APC führen zur Aktivierung des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs (54% der HCC-Fälle) (11, 54). Dies trägt über verschiedene Mechanismen zur Tumorentwicklung und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei (55, 56). TP53, welches für das Protein p53 kodiert, ist in ca. 25% der Fälle mutiert (54). P53 ist ein Tumorsuppressor, der bei DNA (engl.: Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure) – Schädigung Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose, also Zelltod, einleitet und so verhindert, dass mutierte DNA durch Zellteilung weitergegeben wird (57). Mutation und Funktionsverlust des Proteins p53 fördern unter anderem Tumorentstehung und -wachstum sowie Metastasenbildung und eine verringerte Wirksamkeit vieler Chemotherapeutika (58, 59). Insgesamt ist der Zellzyklussignalweg in ungefähr der Hälfte der HCC verändert (54).

## Einleitung

Daneben sind im HCC weitere Signalwege verändert, welche bei der Apoptose eine Rolle spielen, wie der TGF- $\beta$ -Signalweg, Todesrezeptorsignalwege oder Wachstumsfaktor-Signalwege (60, 61).

Unter anderem kann es so durch verschiedene genetische Veränderungen zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 (B-cell lymphoma 2) Familie kommen (62). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Apoptose. Bei apoptotischen Signalen wie DNA-Schädigung werden die pro-apoptotischen Moleküle Bax (Bcl-2-associated X protein) und Bak (Bcl-2 Homologous Antagonist Killer) aktiviert, woraufhin sie Apoptose einleiten. Ohne apoptotischen Stimulus werden Bax und Bak von anti-apoptotischen BCL-2 Molekülen, z.B. Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), Bcl-2 und Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) inhibiert (63). Ein Übergewicht der anti-apoptotischen BCL-2-Moleküle vermittelt erhöhte Apoptoseresistenz.

Zusätzlich sind im HCC der MAP-Kinase und der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)-AKT-mTOR Signalweg durch verschiedene Mutationen oft überaktiviert (54, 64). Dies sind Signalwege, die unter anderem durch Tyrosinkinaserzeptoren aktiviert werden und Proliferation und Differenzierung regulieren. Es sind außerdem oft Chromatin-Remodelling-Komplexe verändert, sowie epigenetische Regulatoren, der IL6-JAK-STAT Signalweg und Signalwege des oxidativen Stresses (54).

### 1.2 Apoptose

Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltods (engl.: Regulated cell death, RCD), die eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gewebegleichgewichts sowie bei der Beseitigung geschädigter oder überflüssiger Zellen spielt. Sie verläuft in einem hochregulierten, energieabhängigen Prozess, der durch intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert wird. Charakteristische Merkmale der Apoptose sind Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und die Bildung von apoptotischen Körperchen, die schließlich von Phagozyten aufgenommen werden. Dabei bleibt die Zellmembran intakt, wodurch keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli initiiert werden, wobei zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Apoptosesignalweg unterschieden wird (65).

Neben der Apoptose existieren zahlreiche weitere Formen des regulierten Zelltods, die sich sowohl hinsichtlich ihrer molekularen Signalwege als auch ihrer morphologischen Merkmale voneinander unterscheiden. Eine wichtige Form ist die Necroptose, eine

## Einleitung

regulierte Variante der Nekrose. Sie ähnelt der klassischen, unkontrollierten Nekrose in ihrem Erscheinungsbild, wird jedoch durch spezifische Signalwege vermittelt, insbesondere durch die Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL. Die Zellmembran verliert dabei ihre Integrität, wodurch intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden und eine ausgeprägte Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Necroptose spielt eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr, insbesondere bei der Reaktion auf virale Infektionen und in entzündlichen Prozessen.

Eine weitere Form ist die Pyroptose, ein stark entzündlicher Zelltod, der typischerweise in Immunzellen auftritt. Ausgelöst wird sie durch die Aktivierung sogenannter Inflammasomen, die zur Spaltung und Aktivierung des Proteins Gasdermin D führen. Gasdermin D bildet Poren in der Zellmembran, was zum Austritt proinflammatorischer Zytokine und zum Zelltod führt. Pyroptose ist insbesondere bei bakteriellen Infektionen und in der angeborenen Immunantwort von zentraler Bedeutung.

Die Ferroptose stellt eine weitere, mechanistisch klar abgegrenzte Form des regulierten Zelltods dar. Sie ist abhängig von der Verfügbarkeit von Eisen und gekennzeichnet durch die Anhäufung von Lipidperoxiden infolge oxidativen Stresses. Ferroptose unterscheidet sich deutlich von anderen Zelltodformen hinsichtlich Morphologie und biochemischer Regulation und ist insbesondere im Kontext von Tumorerkrankungen, neurodegenerativen Prozessen und Ischämieschäden von Interesse.

Der sogenannte Autophagie-assoziierte Zelltod beschreibt einen Sonderfall, bei dem zelleigene Bestandteile durch den Autophagieapparat abgebaut werden. Obwohl Autophagie primär einen überlebensfördernden Mechanismus darstellt, kann sie unter bestimmten pathologischen Bedingungen in einen Zelltodprozess münden.

Im Gegensatz zu den verschiedenen Formen regulierten Zelltods ist Nekrose ein unkontrollierter, meist pathologischer Zelltod, der durch äußere Einflüsse wie Sauerstoffmangel, Infektionen oder toxische Substanzen ausgelöst wird. Dabei kommt es zum Anschwellen der Zelle, zur Auflösung der Membranstruktur und zur unkontrollierten Freisetzung zellulärer Bestandteile, was häufig eine Entzündungsreaktion hervorruft (63, 66, 67).

Diese verschiedenen Zelltodformen erfüllen unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Funktionen und stehen oftmals miteinander in Wechselwirkung. Ihre genaue Unterscheidung und Regulation ist insbesondere für die Entwicklung

therapeutischer Ansätze in der Krebsforschung, bei neurodegenerativen Erkrankungen oder im Bereich der Immunologie von großer Bedeutung.

### 1.2.1 Intrinsische Apoptose

Intrinsische Apoptose wird z.B. durch DNA-Schädigung, Entzug von Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress oder Störungen des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) ausgelöst (63). Diese Störungen werden durch verschiedene Mechanismen, z.B. durch den Tumorsuppressor p53, „detektiert“, wodurch es transkriptionell oder post-transkriptionell zur Induktion von sogenannten BH3 (BCL-2-Homologie-Domäne 3) – only Proteinen kommt. Dies führt wiederum zur Aktivierung der pro-apoptischen Moleküle Bax und Bak (68, 69). Diese bilden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran der Mitochondrien und verursachen so einen Permeabilitätsanstieg der Membran (engl.: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation, MOMP). Dadurch wird unter anderem Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt (63, 69). Cytochrom c veranlasst die Oligomerisierung von APAF-1 (Apoptotic Protease-activating Factor 1), welches die Procaspase 9 rekrutiert. Zusammen bilden sie das Apoptosom. Durch die Bindung im Apoptosom ist die (Pro-) caspase 9 aktiv und spaltet dann die Effektorcaspasen 3 und 7 (69–71). Diese werden durch die Spaltung aktiviert und spalten wiederum zahlreiche Zellbestandteile, darunter PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerasen), sodass die Zelle letztlich durch Apoptose stirbt (Abbildung 2) (63, 69, 72).

### 1.2.2 Extrinsische Apoptose

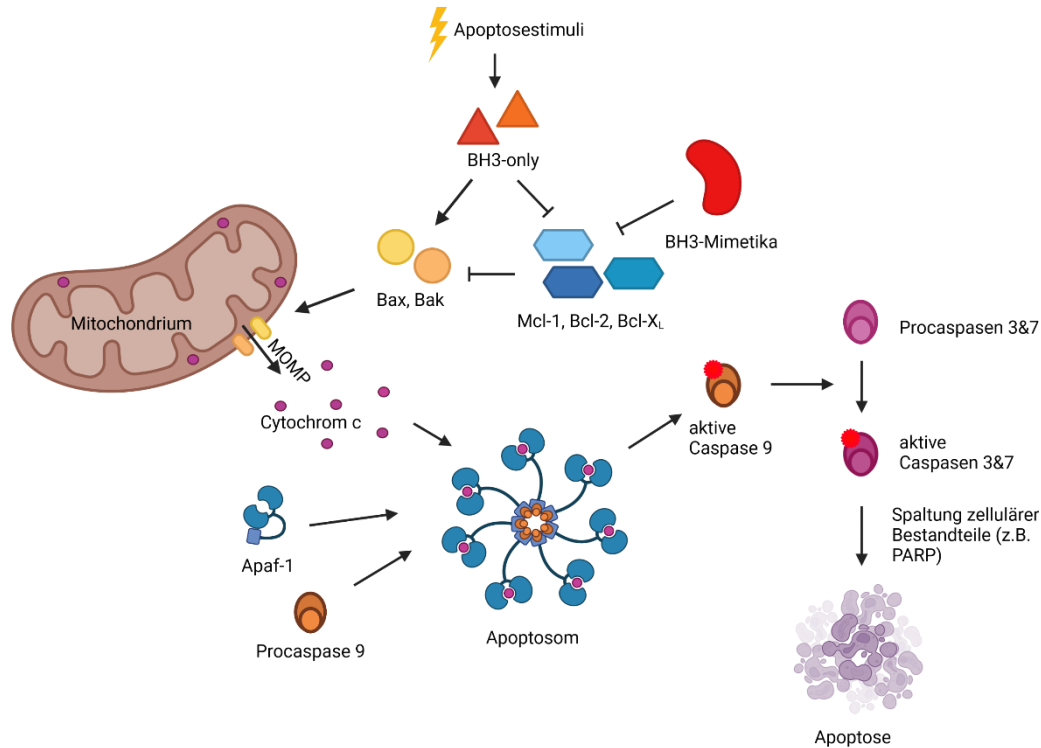
Die extrinsische Apoptose wird gezielt durch die Stimulation von Todesrezeptoren an der Plasmamembran initiiert (63). Hierbei binden spezifische Liganden an Todesrezeptoren (TNFR1, FAS/CD95, TRAILR1, TRAILR2, DR3, DR6, EDAR, NGFR) (73). Daraufhin bildet sich je nach Rezeptor und zellulären Signalmolekülen einer von drei Multiproteinkomplexen: der Death-Inducing Signaling Complex (DISC), Komplex I oder Komplex II. Bei Aktivierung von TNFR1 bildet sich zunächst Komplex I an der Innenseite des Rezeptors. Dieser besteht aus TNFR1, TNF, TRADD, TRAF1/2 und RIP und aktiviert den Überlebens- und Entzündungssignalweg NF- $\kappa$ B (73). In Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie dem Ubiquitinierungsstatus von RIP, kann der Komplex ins Zytosol translozieren. Dort werden FADD, Procaspasen 8/10 und FLIP rekrutiert, um den Komplex II zu bilden. Dieser induziert extrinsische Apoptose (63). FAS/CD95, TRAILR1 und TRAILR2 bilden bei Bindung des passenden Liganden

an der Innenseite des Rezeptors den DISC. Dieser besteht aus oligomerisierten Rezeptoren, dem Adaptorprotein FADD, den Procaspasen 8 und 10 sowie dem FLICE-inhibitory protein (FLIPS/L). An diesem sogenannten death-inducing signaling complex (DISC) werden die Caspasen 8 bzw. 10 aktiviert (73). Caspase 8 spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen 3 und 7 (63). In Typ I Zellen (Thymozyten, reife Lymphozyten) genügt das, um Apoptose auszulösen. In Typ II Zellen (Hepatozyten, die meisten Krebszellen) wird die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) inhibiert (63). XIAP gehört zur Proteinfamilie IAP (Inhibitor of Apoptosis) und inhibiert die Caspasen 3 und 7 sowie die Procaspase 9 (74). In Typ II Zellen ist deshalb eine Schnittstelle mit der intrinsischen Apoptose notwendig, um Apoptose auszulösen.

### **1.2.3 Schnittstelle zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose**

Aktivierte Caspase 8 spaltet zusätzlich Bid, ein pro-apoptotisches BCL-2 Molekül. Gespaltenes Bid (engl.: truncated Bid, tBid) wandert zur äußeren mitochondrialen Membran, wo es die pro-apoptotischen BCL-2 Moleküle Bax und Bak aktiviert. Dies führt zur Oligomerisierung von Bax und Bak und zur Bildung von Poren. Dadurch kommt es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (MOMP) und zur Freisetzung von Cytochrom c, wodurch sich das Apoptosom bildet und Caspase 9 aktiviert wird, welche weiter die Caspasen 3 und 7 spaltet und aktiviert (63, 75). Bei MOMP werden neben Cytochrom c weitere Moleküle aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt, darunter Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI). Smac/DIABLO inhibiert IAPs, welche wiederum Caspasen inhibieren. Durch die Freisetzung von Smac/DIABLO wird die Inhibition der Caspasen aufgehoben, sodass diese ihre proteolytische Aktivität entfalten können (66, 76, 77).

## Einleitung



**Abbildung 2: BH3-Mimetika induzieren intrinsische Apoptose**

BH3-Mimetika inhibieren anti-apoptotische BCL-2 Moleküle. Das setzt sowohl Bax und Bak, als auch BH3-only Proteine frei, welche ansonsten von anti-apoptotischen BCL-2 Molekülen inhibiert werden. Es bilden sich Bax/ Bak Oligomere, welche Poren in der äußeren mitochondrialen Membran verursachen (engl.: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Es wird u.a. Cytochrom c aus dem Intermembranraum freigesetzt. Dieses bildet zusammen mit APAF-1 und Procaspase 9 das Apoptosom. Dadurch wird die Procaspase 9 aktiviert und spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7, welche wiederum verschiedene zelluläre Bestandteile spalten, wodurch es zur Apoptose kommt. Abbildung modifiziert nach (78), erstellt mit biorender.com.

### 1.2.4 Die BCL-2 Familie

Die intrinsische Apoptose wird durch pro- und anti-apoptotische Mitglieder der BCL-2 Familie reguliert (Abbildung 2) (79, 80). Diese Proteinfamilie besteht aus drei funktionell zusammenhängenden Gruppen, die sich strukturell durch sogenannte BCL-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen) ähneln.

Zur Gruppe der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine gehören Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, Bcl-W (auch bekannt als BCL2L2), A1 (beim Menschen auch BFL1 genannt) und Bcl-B (auch BCL2L10). Die zweite Gruppe umfasst die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak und Bok. Diese Moleküle tragen jeweils vier BH-Domänen, ebenso wie die Mitglieder der anti-apoptotischen Gruppe. Die dritte Gruppe besteht ebenfalls aus pro-apoptotischen Proteinen, darunter Bim, Puma, Bid, Bad, Noxa, Bmf, Bik und Hrk. Im

## Einleitung

Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen besitzen sie nur eine einzelne BH-Domäne (BH3) und werden daher als BH3-only-Proteine bezeichnet (81).

Intrinsische Apoptose wird eingeleitet, wenn Bax und Bak aktiviert werden und daraufhin Homodimere bilden. Aus den Dimeren entstehen Oligomere, welche Poren in der äußeren mitochondrialen Membran bilden, was zu MOMP führt (82). Wie oben beschrieben, wird dadurch intrinsische Apoptose eingeleitet (1.2.1).

Die Aktivierung von Bax und Bak wird durch Interaktion mit anderen BCL-2 Molekülen beeinflusst. Bei einem apoptotischen Stimulus werden BH3-only Proteine transkriptionell oder post-transkriptionell induziert (81). Beispielsweise wird die Transkription von Bim durch Zytokinentzug und ER-Stress induziert, und Puma und Noxa werden durch p53 transkriptionell hochreguliert (83–86). Außerdem werden BH3-only Proteine post-transkriptionell z.B. durch Phosphorylierung reguliert (68). Bid wird, wie bereits beschrieben, durch Caspase 8 gespalten und kann dann Bax und Bak aktivieren (87).

Nach aktuellen Modellen wirken BH3-only Proteine auf zwei verschiedene Weisen: als Aktivatoren und als Sensitizer. Aktivatoren fördern die Aktivierung von Bax und Bak, indem sie eine Konformationsänderung katalysieren. Dadurch wird die zuvor verborgene BH3-Domäne von Bax und Bak exponiert, was ihre pro-apoptotische Funktion ermöglicht (63). Die veränderte Konformation ermöglicht die Interaktion mit weiteren Bax/Bak Molekülen, was zur Bildung von Homodimeren führt (81). Zu den Aktivatoren gehören Bim, Bid und Puma (88).

Sowohl Bax/Bak als auch BH3-only Proteine können durch ihre BH3-Domäne auch mit anti-apoptotischen BCL-2 Molekülen interagieren. Dadurch werden sie sequestriert (gefangen gehalten), wodurch die Bildung von Bax-/Bak-Dimeren inhibiert wird (63).

Sensitizer-BH3-only Proteine binden an anti-apoptotische BCL-2-Proteine und hemmen deren Funktion. Diese Bindung erfolgt kompetitiv zur Interaktion der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine mit Bax/Bak und den Aktivatoren. Dadurch können Sensitizer Bax, Bak und Aktivatoren aus der Bindung mit den anti-apoptotischen Molekülen freisetzen, wodurch die Dimerisierung von Bax und Bak ermöglicht wird – ein entscheidender Schritt für die Induktion der Apoptose (89). Zu den Sensitizern gehören Bad, Noxa und Hrk (88).

### **1.2.5 Apoptose- und Therapieresistenz in Tumoren**

Im Verlauf der Tumorentwicklung treten verschiedene genetische, epigenetische und zelluläre Veränderungen in den betroffenen Zellen sowie in ihrer Mikroumgebung auf.

## Einleitung

Diese Veränderungen führen zur Entstehung charakteristischer Merkmale, die für die Tumorentstehung und -progression essenziell sind und daher bei malignen Tumoren aller Entitäten beobachtet werden können.

Hanahan und Weinberg haben diese Merkmale als Hallmarks of Cancer beschrieben. Dazu zählen unter anderem die Aufrechterhaltung proliferativer Signale, Resistenz gegenüber Zelltod, replikative Immortalität – also unbegrenzte Teilbarkeit –, die Induktion von oder der Zugang zu Blutgefäßen sowie die Fähigkeit, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (90, 91). Diese Merkmale sind entscheidend für die Entstehung und das Überleben von Tumoren und bieten daher vielversprechende Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien. Beispielsweise kann die Angiogenese durch Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), wie Bevacizumab, gehemmt werden. Das Immunsystem lässt sich durch Immuncheckpoint-Inhibitoren, etwa Atezolizumab, aktivieren. Zudem kann die Weiterleitung von Wachstumssignalen durch Rezeptorantikörper oder Tyrosinkinase-Inhibitoren gezielt unterbrochen werden (90).

Für diese Arbeit ist besonders die Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose als therapeutischer Angriffspunkt von Bedeutung. So ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen BCL-2-Proteinen ein wichtiger zentraler Mechanismus, der zur Apoptoseresistenz beiträgt (92). Sind anti-apoptotische BCL-2 Moleküle im Übergewicht, neutralisieren sie die BH3-only Proteine sowie Bax und Bak, sodass die Zelle überlebt. Erhöhte Expression anti-apoptotischer BCL-2 Moleküle oder eine verringerte Expression pro-apoptotischer BCL-2 Moleküle bewahrt die Zellen vor Apoptose (93, 94).

BH3-only Proteine spielen eine wesentliche Rolle im Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose (68). Sie werden durch einige Tumortheraeutika indirekt aktiviert, z.B. über p53 oder Glukokortikoidrezeptorsignalwege (95, 96). Diese Signalwege sind aber oft verändert, z.B. durch Mutation, Deletion oder epigenetische Suppression beteiligter Proteine (97). Dies resultiert in Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika, zielgerichteten Therapien und Immun-Therapien.

Um diese Resistenzen zu überwinden und direkt Apoptose zu induzieren, wurden BH3-Mimetika entwickelt (98).

### 1.3 BH3-Mimetika

BH3-Mimetika sind kleine Moleküle oder modifizierte Peptide, die die Funktion der BH3-only Proteine nachahmen und anti-apoptotische BCL-2 Moleküle inhibieren (99). Dadurch werden Bax und Bak aktiviert, was zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt und Apoptose induziert (Abbildung 2). Abbott Laboratories (heute AbbVie) und Idun entwickelten das erste BH3-Mimetikum, ABT-737, das gezielt die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-XL und Bcl-W inhibiert (98, 100, 101). Seitdem wurden einige weitere BH3-Mimetika entwickelt. Einen Überblick über präklinisch und klinisch getestete BH3-Mimetika geben D'Aguanno und Del Bufalo (102), sowie Townsend et al. (103).

#### 1.3.1 ABT-199/ Venetoclax

Der selektive Bcl-2 Inhibitor ABT-199 (Venetoclax), entwickelt von AbbVie, Genentech/Roche und dem Walter and Eliza Hall Institute (104), ist bisher (Stand 2025) das einzige klinisch zugelassene Medikament dieser Klasse. Die FDA erteilte 2016 erstmals die Zulassung für Patientinnen und Patienten mit Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) und einer 17p Deletion, die bereits mindestens eine Therapie erhalten hatten (105, 106). Mittlerweile ist es von der FDA für Patientinnen und Patienten mit CLL oder kleinzelligem B-Zelllymphom (engl.: Small Lymphocytic Lymphoma, SLL) ungeachtet des Mutationsstatus zugelassen, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Obinutuzumab oder Rituximab. Bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) ist es in Kombination mit Azacitidin, Decitabin oder Cytarabin für Patientinnen und Patienten, die älter als 75 Jahre alt sind oder eine Kontraindikation für die Standardbehandlung haben, zugelassen (107). Von der European Medicines Agency (EMA) liegt eine Zulassung für Venetoclax alleine oder in Kombination mit Obinutuzumab oder Rituximab für verschiedene Gruppen von Patientinnen und Patienten mit CLL vor, sowie für Patientinnen und Patienten mit AML und Kontraindikation für intensive Chemotherapie, hier in Kombination mit Azacitidin oder Decitabin (108).

ABT-199 wird in Kombination mit verschiedenen anderen Wirkstoffen in klinischen Studien bei verschiedenen Tumorentitäten getestet (103, 109), unter anderem in Kombination mit Ibrutinib und Anti-CD20-Antikörper im Mantelzelllymphom (NCT04802590), mit 6-Mercaptopurin in AML (NCT05506332) und mit Inotuzumab in B-ALL (NCT05016947) (110), außerdem in Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom

(engl.: non small cell lung cancer, NSCLC) in Kombination mit dem PD-1-Inhibitor Budigalimab (NCT03000257) (111).

Bei Patientinnen und Patienten mit CLL wurde von einem sehr guten Ansprechen auch bei Rezidiv berichtet (79% Ansprechen und 20% komplette Remission, NCT01328626) (106). Dennoch kommt es zu Resistenzen. Ein möglicher Resistenzmechanismus gegenüber ABT-199 ist die Überexpression anderer anti-apoptotischer Moleküle wie Mcl-1 und/ oder Bcl-XL (112).

### **1.3.2 MIK665/ S64315**

S63845 ist ein von Servier und Vernalis entwickeltes Molekül, welches selektiv das anti-apoptotische Protein Mcl-1 hemmt. In Mausmodellen zeigte es Wirksamkeit sowohl bei hämatologischen als auch bei soliden Tumoren (113). Das daraus entwickelte Therapeutikum MIK665/S64315 wird in verschiedenen klinischen Studien für bestimmte hämatologische Malignome untersucht, unter anderem in einer mittlerweile beendeten klinischen Studie Phase I in Kombination mit ABT-199 in Akuter Myeloischer Leukämie (AML) (NCT03672695) (102, 103, 114). In einer aktuellen klinischen Studie wird ABT-199 in AML, Myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) mit S227928 kombiniert, einem antikörperbasierten Wirkstoff-Konjugat, das MIK665 mit einem monoklonalen Anti-CD74-Antikörper koppelt (NCT06563804) (115).

## **1.4 Anti-apoptotische BCL-2 Moleküle und BH3-Mimetika in soliden Tumoren**

Die Überexpression von Bcl-2 und dessen Rolle für die Tumorentstehung und -progression wurde zuerst bei B-Zell-Lymphomen festgestellt (116). Die Rolle anti-apoptotischer BCL-2 Moleküle ist besonders in hämatologischen Malignomen von Bedeutung und dementsprechend gut untersucht (88). Einige hämatologische Malignome, insbesondere CLL, überexprimieren vorwiegend ein einzelnes anti-apoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie – häufig das namensgebende Protein Bcl-2. Sie sind besonders von diesem abhängig und sprechen deshalb auf die Behandlung mit nur einem Inhibitor an (94, 98, 117).

Auch in vielen soliden Tumoren liegt ein Ungleichgewicht mit Überwiegen der anti-apoptotischen BCL-2 Moleküle vor (94, 102). Die meisten soliden Tumoren sind jedoch nicht allein von einem einzelnen anti-apoptotischen BCL-2-Protein abhängig.

Stattdessen nutzen sie mehrere Mitglieder dieser Proteinfamilie oder kompensieren die Inhibition eines einzelnen Proteins durch die Hochregulation anderer. Dadurch kann die Blockade eines einzelnen BCL-2 Proteins oft umgangen werden (94, 112, 118). Dem kann durch eine Kombination mehrerer Inhibitoren entgegengewirkt werden (112, 119), sodass neben hämatologischen Tumoren nun auch einige solide Tumore auf ein Ansprechen auf eine Kombinationstherapie untersucht wurden, u.a. das Maligne Melanom (120), das Plattenepithelkarzinom der Lunge (121), das Kolonkarzinom (122) und einige weitere (118).

### **1.4.1 BCL-2 und BH3-Mimetika im HCC**

Auch im HCC gibt es veränderte Expressionsmuster der BCL-2 Proteine (62). Insbesondere sind Mcl-1 und Bcl-XL im Vergleich zu umgebendem gesundem Gewebe oft überexprimiert (123–126). Pro-apoptotische Moleküle (Bax, Bak, Bcl-XS) werden vermindert exprimiert, sodass das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen BCL-2-Molekülen reduziert ist (127). Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von Bcl-2 die Chemosensitivität von HCC-Zelllinien erhöht. Dies stützt die Hypothese, dass Bcl-2 im HCC eine protektive Funktion übernimmt (128, 129). Das BH3-Mimetikum ABT-737, welches Bcl-2, Bcl-XL und Bcl-W inhibiert, induziert in Kombination mit Sorafenib Apoptose in HCC-Zelllinien (130). ABT-737, sowie der Pan-BCL-2-Inhibitor Obatoclox, reduzieren Zellmigration und Adhäsion beim HCC (131). Etablierte Therapien wie Sorafenib und Regorafenib induzieren eine Veränderung des Expressionsmusters der BCL-2 Moleküle, was die Zellen sensibler für die Inhibition anti-apoptotischer BCL-2 Moleküle macht (132, 133). Daher könnte die gezielte kombinierte Inhibition dieser Moleküle ein vielversprechender Ansatz für die Therapie des HCC sein.

### **1.5 Rationale für die Anwendung der Kombination aus ABT-199 und MIK665**

Der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) ist bereits zugelassen und zeigt eine gute Wirksamkeit bei den hämatologischen Malignomen CLL, SLL und AML. Allerdings treten sowohl primäre als auch erworbene Resistenzen häufig auf. Ein möglicher Mechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber ABT-199 ist die Überexpression oder Hochregulation anderer anti-apoptotischer BCL-2-Proteine wie Mcl-1. Darüber hinaus spielt Mcl-1 eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber verschiedener Chemotherapeutika in unterschiedlichen Tumorentitäten (134, 135).

Durch die gleichzeitige Inhibition von Mcl-1 konnte die Sensitivität von gegenüber ABT-199 resistenten AML-Zelllinien wiederhergestellt werden (119). In einer kürzlich durchgeführten Studie (NCT03672695) wurde die Kombination aus ABT-199 und MIK665 bei Patientinnen und Patienten mit AML untersucht (136). Diese Kombination wurde außerdem bereits in verschiedenen Entitäten in präklinischen Studien untersucht. Unter anderem konnte eine Wirksamkeit in T-Zell-Akuter Lymphatischer Leukämie und im Multiplen Myelom gezeigt werden (137–139). Auch in soliden Tumoren zeigte die Kombination vielversprechende Ergebnisse: Sie verringerte die Zellviabilität mehrerer Zelllinien maligner Melanome und führte in Mausmodellen zu einer Reduktion des Tumolvolumens bei gleichzeitig minimaler Toxizität (120). Darüber hinaus erwies sich die Kombination aus ABT-199 und S63845, dem Vorläufer von MIK665, als wirksam in verschiedenen Zelllinien des Synovialsarkoms (140). Neben dieser spezifischen Kombination werden auch weitere Ansätze untersucht, in denen ABT-199 mit anderen Mcl-1-Inhibitoren kombiniert wird (103). Zudem werden Kombinationen aus ABT-199 mit Wirkstoffen erforscht, die nachweislich die Expression von Mcl-1 unterdrücken. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination mit dem Aurora-Kinase-A-Inhibitor MLN8237, die im Neuroblastom vielversprechende Effekte gezeigt hat (141).

### **1.5.1 Rationale für die Anwendung von BH3-Mimetika im HCC**

Eine Dysregulation der BCL-2 Proteine spielt eine wichtige Rolle im HCC. So sind insbesondere Mcl-1 und Bcl-XL im HCC oft überexprimiert (62). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von Bcl-2 mittels siRNA die Wirksamkeit anderer Tumormedikamente (SMAC-Mimetika, 5-FU) in HCC-Zelllinien verstärkt (129, 142). ABT-737, welches Bcl-2, Bcl-XL, und Bcl-W inhibiert, verbessert die Wirksamkeit von Sorafenib oder Celastrol. Dies ist zumindest teilweise darauf zurückzuführen, dass Sorafenib und Celastrol Mcl-1 inhibieren, sodass bei der Kombination neben den direkt durch ABT-737 inhibierten Molekülen auch Mcl-1 inhibiert wird (130, 143). Die Kombination aus zwei Inhibitoren, die Bcl-2 und Mcl-1 gezielt hemmen – ABT-199 und MIK665 – stellt daher auch im HCC einen vielversprechenden Therapieansatz dar. ABT-199 ist als einziges BH3-Mimetikum bereits zugelassen. MIK665 wurde in klinischen Studien getestet (u.a. NCT04629443, NCT02992483, NCT03672695) und zeigte dabei eine begrenzte Wirksamkeit. Aufgrund seines spezifischen Wirkmechanismus bleibt es jedoch ein vielversprechender Kandidat für weiterführende Untersuchungen, insbesondere in Kombinationstherapien oder optimierten

Behandlungsstrategien. Aus diesen Gründen wurden für diese Arbeit ABT-199 und MIK665 eingesetzt.

### **1.6 Rationale für die Analyse von BH3-Mimetika in HepG2 Zellen**

Zelllinien werden häufig als Modell für maligne Erkrankungen genutzt, da sie eine einfache, günstige und relativ stabile Möglichkeit bieten, Tumorzellen zu untersuchen (144). Es gibt verschiedene Zelllinien, die aus einem HCC hervorgehen und als Modell für dieses dienen. Eine häufig genutzte Zelllinie ist HepG2. Diese wird häufig als Modell für das HCC, aber auch Leberfunktionen genutzt (145).

Diese Dissertationsschrift ist Teil einer größeren Studie der Arbeitsgruppe. Zusätzlich zu HepG2 wurden die hier beschriebenen Untersuchungen auch an den beiden HCC-Zelllinien Hep3B und Huh7 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der Verfasserin als Zweit-Autorin im internationalen Fachjournal *Biomedicines* (IF: 3,9; 2023) unter dem Titel „Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma“ von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht (78). Die drei Zelllinien haben unterschiedliche Merkmale, insbesondere einen unterschiedlichen p53-Status: HepG2 exprimieren Wildtyp-p53, Huh7 mutiertes p53 und Hep3B sind p53-defizient (146). Da p53 im HCC oft mutiert ist und über die Induktion von Noxa und Puma das Verhältnis der BCL-2 Moleküle beeinflusst, ist es wichtig, Zelllinien mit unterschiedlicher p53-Funktion zu untersuchen (54, 81). Die drei Zelllinien unterscheiden sich außerdem in der Expression der BCL-2 Moleküle (78).

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten und tödlichsten Tumorerkrankungen. Trotz Fortschritten in den Therapiealgorithmen und der Zulassung neuer Medikamente bleiben die Behandlungsmöglichkeiten eingeschränkt. Die häufig bestehende Leberzirrhose, die Entwicklung von Resistenzen gegenüber etablierten Therapien sowie unerwünschte Nebenwirkungen stellen wesentliche Herausforderungen dar und unterstreichen den dringenden Bedarf an neuen therapeutischen Ansätzen.

Ein vielversprechender Ansatz ist die gezielte Hemmung anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie durch sogenannte BH3-Mimetika. Venetoclax (ABT-199), ein selektiver Bcl-2-Inhibitor, ist bereits für die Behandlung hämatologischer Neoplasien zugelassen. Seine Wirksamkeit in soliden Tumoren – einschließlich des HCC – ist

## Einleitung

jedoch bislang unzureichend untersucht. Experimentelle Studien zeigen, dass die Kombination verschiedener BH3-Mimetika in anderen Tumorentitäten, wie dem malignen Melanom, synergistische Effekte erzielen kann, indem sie mehrere Überlebensmechanismen gleichzeitig blockieren.

Vor diesem Hintergrund untersucht die vorliegende Arbeit die kombinierte Hemmung von Bcl-2 und Mcl-1 als potenziellen Therapieansatz für das HCC. Ziel war es, die Wirkung der beiden BH3-Mimetika ABT-199 (Bcl-2-Inhibitor) und MIK665 (Mcl-1-Inhibitor) auf HCC-Zellen zu analysieren – sowohl als Monotherapie als auch in Kombination.

Dabei wurden drei zentrale Fragestellungen adressiert:

1. Zelltodinduktion durch BH3-Mimetika: Können ABT-199 und MIK665 in HepG2-Zellen Zelltod induzieren? Tritt dieser additiv oder synergistisch auf?
2. Spezifität der Inhibitoren: Beruht die Wirkung der BH3-Mimetika auf der gezielten Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 oder spielen Off-Target-Effekte eine Rolle?
3. Mechanismus der Zelltodinduktion: Erfolgt die Zelltodinduktion über den intrinsischen Apoptoseweg, und wie sind die einzelnen Schritte dieses Prozesses charakterisiert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Expressionsprofile relevanter BCL-2-Familienmitglieder bestimmt, sowie funktionelle Analysen durchgeführt. Dabei wurden unter anderem die Integrität der mitochondrialen Membran (MOMP), die Caspase-Aktivierung und die Zelltodinduktion untersucht. Zusätzlich wurden die IC50-Werte ermittelt und der Combination Index (CI) berechnet, um Synergieeffekte der Kombinationstherapie zu quantifizieren.

Durch die Untersuchung dieser kombinierten Inhibition soll die Arbeit neue therapeutische Perspektiven für das HCC aufzeigen. Die gewonnenen Erkenntnisse bilden eine wichtige Grundlage für weiterführende präklinische Studien und könnten

## Einleitung

langfristig zur Entwicklung verbesserter Behandlungsstrategien für HCC-Patientinnen und Patienten beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

Name	Zellart	Herkunft
HepG2 (HB-8065)	HCC	American Type Culture Collection (ATCC), USA
Hep3B (HB-8064)	HCC	ATCC, USA
Huh7 (CLS 300156)	HCC	Cell Lines Service (CLS), Deutschland

#### 2.1.2 Antikörper

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper**

Antigen	Verdünnung	Spender	ID	Hersteller
Bcl-2	1/1000 (Milch)	rabbit	ab182858	Abcam, GB
Bcl-XL	1/1000 (Milch)	rabbit	2762	Cell Signaling Technology, USA
Caspase-3	1/1000 (Milch)	rabbit	9662	Cell Signaling Technology, USA
Caspase-8	1/1000 (BSA)	mouse	9746	Cell Signaling Technology, USA
Caspase-9 Invitrogen™	1/1000 (BSA)	rabbit	PA5-17913	Thermo Fisher Scientific, USA
cleaved Caspase-8	1/1000 (BSA)	rabbit	9496	Cell Signaling Technology, USA
Cytochrom c	1/500	mouse	ab110325	Abcam, GB

## Material und Methoden

(37BA11)				
Mcl-1	1/1000 (BSA)	rabbit	4572	Cell Signaling Technology, USA
PARP	1/1000 (Milch)	rabbit	9542	Cell Signaling Technology, USA
$\beta$ -Actin	1/10000 (Milch)	mouse	A3854	Sigma- Aldrich, USA
TOMM20 (D8T4N)	1/100	rabbit	42406	Cell Signaling Technology, USA
Rabbit-IgG	1/10000	goat	A0545	Sigma- Aldrich, USA
Mouse-IgG (Alexa Fluor 594)	1/1000	goat	A-11005	Thermo Fisher Scientific, USA
Rabbit-IgG (Alexa Fluor 488)	1/1000	goat	A-11008	Thermo Fisher Scientific, USA

### 2.1.3 siRNA

**Tabelle 3: Verwendete siRNA**

Zielprotein	ID	Hersteller
Negativkontrolle Nr. 2 (Mcl-1)	4390847	Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA
Negativkontrolle (Bcl-2)	SR30004	Origene, USA
Mcl-1 (1)	120642	Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA
Mcl-1 (2)	120644	Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA
Bcl-2 (1)	SR300411 A	Origene, USA
Bcl-2 (2)	SR300411 B	Origene, USA

### 2.1.4 Reagenzsysteme

**Tabelle 4: Verwendete Reagenzsysteme**

Name	Hersteller
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, USA
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega, USA
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA

### 2.1.5 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Reagenzien**

Name	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
ABT-199/ Venetoclax	Selleck Chemicals, USA
Accutase	Sigma-Aldrich, USA
Annexin V Binding Buffer, 10x konzentriert, BD Pharmingen™	BD Biosciences, USA
FITC Annexin V	BD Biosciences, USA
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraction V	Biomol, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA

## Material und Methoden

cOmplete™ Mini tablets	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DAPI Solution, BD Pharmingen™	BD Biosciences, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Deutschland
FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon)	Selleck Chemicals, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	Bio & Sell GmbH, Deutschland
Gibco Opti-MEM Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, USA
Gibco RPMI-1640 + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, USA
Glycerin	Carl Roth, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, USA
Luminol Natrium Salz	Sigma-Aldrich, USA
Minimum Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Methanol	Carl Roth, Deutschland
MIK665/ S64315	Selleck Chemicals, USA
Milchpulver	Carl Roth, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Amibion, Thermo Fisher Scientific, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Panobinostat (LBH589)	Selleck Chemicals, USA
Paraformaldehyd, 4% in PBS	Alfa Aesar, Deutschland
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, USA
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich, USA

## Material und Methoden

PhosSTOP™ EASYpack	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
ProLong™ Gold antifade reagent Eindeckmittel	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10x	Merck Millipore, USA
RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) Lysis buffer	Sigma-Aldrich, USA
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Anprotec, Deutschland
siRNA Puffer RNase frei	Origene, USA
Sodium dodecyl sulfate (SDS), 20%	Carl Roth, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA
TransFectin™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Tris (Trizma®) Base	Sigma-Aldrich, USA
Tris (Trizma®) Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
zVAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl- aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone)	Selleck Chemicals, USA

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

Name	Hersteller
Aspirationspipette 2ml	Nerbe Plus GmbH, Deutschland
Cell Scraper 25cm 2-position blade	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Erlenmeyer Kolben 250ml	Corning, USA
Falcon® 5ml Röhrchen, runder Boden mit Zellsieb	Corning, USA
Falcon® Zellsieb 40/ 70µm, Nylon	Corning, USA
Objektträger für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Pipettenspitzen	Nerbe Plus GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Pipettenspitzen für Multichannelpipette VOYAGER 125µl	INTEGRA Biosciences GmbH, Deutschland
Proteingele 4-20% Mini-PROTEAN® TGX	Bio-Rad Laboratories, USA

## Material und Methoden

PVDF-Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Reaktionsgefäße 0.2ml, 1.5ml, 2ml	Eppendorf AG, Deutschland
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Corning, USA
Serologische Pipetten CostarR Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning, USA
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellkulturschale TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Deutschland
µ-Slide 8 Well Glass Bottom	Ibidi GmbH, Deutschland
6-Well Zellkulturplatte TC-Platte 6 Well, Standard	Sarstedt AG & Co., Deutschland
96-Well Zellkultur Platte	Corning, USA
96-Well Zellkultur Platte weiß	Berthold Technologies GmbH, Deutschland

---

### 2.1.7 Geräte

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

Name	Hersteller
Automatischer Zellzähler TC20TM	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
CO2 Inkubator CB 210	Binder, Deutschland
Consort™ EV261 Power Supply	Consort bvba, Belgien
Durchflusszytometer BD LSR Fortessa	BD Biosciences, USA
Multichannelpipette VOYAGER 125µl	INTEGRA Biosciences GmbH, Deutschland
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Eppendorf Easypet	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Feinwaage Analytical balance Excellence XA105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-X810	Keyence, Deutschland
Magnetrührer IKA® RH basic 2	IKA®-Werke GmbH, Deutschland
Microplate Reader EMax® Plus	Molecular Devices, USA
Mikroliter Transferpette®	Brand GmbH, Deutschland

## Material und Methoden

Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Deutschland
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Multistepper® M4 Pipette	Eppendorf AG, Deutschland
Pipette PIPETMAN®	Gilson Inc, USA
Schüttelgerät IKA® KS 260 basic	IKA®-Werke GmbH, Deutschland
Semi-trockenes Transfersystem TE 77XP	Hoefer, Inc, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
TriStar2 LB 942 Multimode Reader	Berthold Technologies GmbH, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA

---

### 2.1.8 Software

**Tabelle 8: Verwendete Software**

Name	Firma
BioRender	<a href="http://www.biorender.com">www.biorender.com</a>
CompySyn	ComboSyn Inc. ( <a href="http://www.combosyn.com/">http://www.combosyn.com/</a> )
FACSDiva™	BD Biosciences, USA
FlowJo™	Becton, Dickinson & Company, USA
Fluoreszenz Analyzer BZ-X800	Keyence, Deutschland
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Microsoft Excel, Power Point, Word (2016)	Microsoft, USA
Prism 8	GraphPad Software, USA
SoftMax Pro	Molecular Devices, USA

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zelllinien HepG2, Hep3B und Huh7

Die HepG2 Zelllinie (ATCC, HB-8065) wurde als Adhäsionskultur bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert. Es wurde RPMI-1640-Medium, welches L-Glutamin enthält,

## Material und Methoden

mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS) verwendet. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage 1/3 passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und für 3-5 min mit 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in Medium resuspendiert und 1x pro Woche durch ein Zellsieb gegeben. Anschließend wurden die Zellen in neue Zellflaschen gegeben oder für Experimente verwendet. Hierfür wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers TC20 von Bio-Rad bestimmt.

Hep3B Zellen wurden in MEM, Huh7 in DMEM (hoher Glukosegehalt) kultiviert. Den Medien wurde 10% FKS zugegeben. Beide Zelllinien wurden als Adhäsionskultur bei 37°C kultiviert, Hep3B bei 5% CO<sub>2</sub>, Huh7 bei 10%. Hep3B wurden alle drei bis vier Tage 1/3 passagiert. Huh7 wurden alle drei bis vier Tage 1/4 – 1/10 passagiert.

### **2.2.2 Behandlung der Zellen mit ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden in verschiedenen Gefäßen (6-Well Platte, 96-Well Platte, 8-Well Slide, Zellkulturschale, Zellkulturflasche) ausgesät. Die Dichte der Zellen wurde je nach Dauer des Experimentes und damit des Wachstums angepasst, um eine gleichmäßige Bedeckung der Fläche zum Zeitpunkt der Behandlung zu ermöglichen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, um ein Anheften der Zellen zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen ABT-199 und/ oder MIK665 behandelt. Davon abweichend wurden die Zellen für die Versuche mit siRNA (small interfering RNA) an Tag 1 nach Aussaat mit siRNA und an Tag 3 mit ABT-199/ MIK665 behandelt.

Für die Behandlung wurde den Zellen Medium zugegeben, welches verschiedene Konzentrationen von ABT-199 und/ oder MIK665 enthielt, um die in den Experimenten angegebenen Zielkonzentrationen zu erreichen. Da die Medikamente in DMSO gelöst wurden, wurde DMSO als Negativkontrolle verwendet, um mögliche Effekte von DMSO von den Effekten durch die Behandlung mit ABT-199 und MIK665 unterscheiden zu können. Dabei wurde jeweils die Konzentration von DMSO verwendet, die der größten für das jeweilige Experiment verwendeten Menge an DMSO in den Proben mit ABT-199/MIK665 entsprach. Als Positivkontrolle wurden 100 µM Panobinostat genutzt. Für einige Experimente wurde ein Teil der Zellen mit zVAD-fmk vorbehandelt, um zu zeigen, inwiefern die Wirkung von ABT-199 und MIK665 durch die Inhibition der Caspaseaktivität verhindert werden kann. Dafür wurden die Zellen mit 35 µM zVAD-fmk für 15-20 min inkubiert und anschließend mit ABT-199, MIK665 und DMSO behandelt. Es wurde eine zVAD-fmk-Konzentration von

35  $\mu\text{M}$  erreicht. Nach der Behandlung wurden die Zellen je nach Experiment wie angegeben für 4, 6, 8, 24 oder 48 h bei 37 °C inkubiert. Gelöstes ABT-199, MİK665 (je 10 mM in DMSO) und zVAD-fmk (50 mM in DMSO) wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Analyse des Zelltods mittels Durchflusszytometrie

Für die Zelltodanalyse wurden HepG2 Zellen auf 6-Well-Platten mit 200.000 Zellen pro Well ausgesät, für die Behandlung siehe 2.2.2.

Nach 24 bzw. 48 h Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, für 3 min mit Accutase bei 37 °C inkubiert, resuspendiert und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Die restlichen Zellen wurden noch einmal mit PBS resuspendiert und in das Gefäß gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  ABB (1x konzentriert) + 1% Annexin V + 0,01% DAPI resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Messung mit dem Durchflusszytometer LSR Fortessa durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo.

Um zu berücksichtigen, dass einige Zellen auch ohne Behandlung bzw. durch DMSO sterben, wurde der Zelltod in der Kontrollprobe mit DMSO bestimmt und nach folgender Formel angerechnet (147–149):

$$\text{Spezifischer Zelltod [\%]} = \frac{ZT_{\text{behandelt}} [\%] - ZT_{\text{DMSO}} [\%]}{100 - ZT_{\text{DMSO}} [\%]} \times 100$$

ZT = Zelltod

### 2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit 10.000 Zellen pro Well ausgesät und behandelt wie in 2.2.2 beschrieben. Nach 24 bzw. 48 h Inkubation wurde die Zellviabilität mit dem Viabilitätsassay CellTiter-Glo® von Promega bestimmt. Dafür wurde das Substrat des Assays mit einem Volumenverhältnis von 1:1 zu den Zellen gegeben. Nach ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz im Multimode Reader von Berthold Technologies gemessen. Nach Abzug des Hintergrundsignals durch das Medium wurde die Viabilität in Relation zu DMSO mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{IL_{\text{behandelt}}}{IL_{\text{DMSO}}} \times 100$$

IL = Intensität der Lumineszenz

### 2.2.5 Bestimmung der Caspaseaktivität

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit 10.000 Zellen pro Well ausgesät und behandelt wie in 2.2.2 beschrieben. Nach 4, 6, 8 bzw. 24 h Inkubation wurde die Aktivität der Caspasen 9 und 3/7 mit spezifischen Aktivitätsassays von Promega im Multimode Reader von Berthold Technologies gemessen. Dafür wurde das Substrat der Assays mit einem Volumenverhältnis von 1:1 zu den Zellen gegeben. Nach ca. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz gemessen. Nach Abzug des Hintergrundsignals durch das Medium wurde die spezifisch auf die Behandlung zurückzuführende Zunahme der Caspaseaktivität nach folgender Formel bestimmt (150, 151):

$$\text{Spez. Zunahme d. Caspaseaktivität [\%]} = \frac{IL_{\text{behandelt}} - IL_{\text{DMSO}}}{IL_{\text{DMSO}}} \times 100$$

IL = Intensität der Lumineszenz

### 2.2.6 siRNA-vermittelter Knockdown

HepG2 Zellen wurden in Zellschalen mit 1 Millionen Zellen pro Schale für die Proteinuntersuchung und in 6-Well-Platten mit 150.000 Zellen pro Well für den Zelltodassay ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen.

Die siRNAs wurden gemäß den Herstellerangaben in nukleasefreiem Wasser (für Mcl-1) bzw. in einer Pufferlösung (für Bcl-2) gelöst. Für Mcl-1 und Bcl-2 wurden jeweils zwei spezifische siRNAs sowie Kontroll-siRNAs derselben Hersteller verwendet. Letztere enthielten eine sequenzmodifizierte siRNA (scrambled siRNA), die auf kein Genprodukt abzielt.

Zur Präparation der Transfektionsmischung wurde die siRNA-Lösung mit Opti-MEM-Medium vermischt. Anschließend wurde die gleiche Menge Opti-MEM mit 1,75 % Transfectin hinzugefügt. Die Mischung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für die Transfektion verwendet wurde.

Aus den Zellbehältnissen wurde ein Tag nach Aussaat das Medium abgenommen. Die siRNA Lösung wurde an den Rand des Gefäßes pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Anschließend wurde RPMI-1640-Medium dazugegeben, sodass sich eine Endkonzentration der siRNA von 20 nM (Mcl-1) bzw. 10 nM (Bcl-2) ergab.

Nach 48 und 72 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für die Proteinuntersuchung geerntet und weiter verfahren wie in 2.2.8 – 2.2.11 beschrieben.

## Material und Methoden

Für die Zelltodanalysen wurde das Medium nach 48 h abgenommen. Die Zellen wurden behandelt wie in 2.2.2 beschrieben. Nach 24 h Inkubation wurde der Zelltod analysiert wie in 2.2.3 beschrieben.

### **2.2.7 Immunfluoreszenz**

Die Zellen wurden mit 30.000 Zellen pro Well in 8-Well-Slides ausgesät. Die Zellen wurden behandelt und für 4 h inkubiert wie in 2.2.2 beschrieben. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 3 h mit 30  $\mu$ M FCCP behandelt. Danach wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Zellen mit 0,1% TritonX-100 für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal für 5 min gewaschen. Die Wells wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur mit 1% BSA in PBST (1x PBS + 0,05% Tween 20) geblockt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal für 5 min gewaschen und dann mit den Sekundärantikörpern für 30 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min wurden die Zellen mit Eindeckmittel, welches DAPI enthält, um die Zellkerne zu färben, eingedeckt. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-X810 von Keyence.

### **2.2.8 Proteinlysate**

HepG2 Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 1-2 Millionen Zellen pro Schale ausgesät, für die Behandlung siehe 2.2.2. Nach 4 h bzw. 48 und 72 h (siRNA) wurden die Zellen mit einem Cellscrapper abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt, anschließend für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und nochmals für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l RIPA Lysis Buffer inklusive Phosphatase- und Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 16000 g und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.2.9 Quantifizierung der Proteinmenge**

Um die Proteinmenge der Proben zu bestimmen, wurde ein BCA (Bicinchoninsäure) Proteinassay durchgeführt. Die Proben wurden 1:10 mit RIPA Lysis Buffer verdünnt und in Triplikaten in eine 96-Well Platte gegeben. Als Standardkontrolle wurde eine

Verdünnungsreihe von Albumin mit 200-2000 µg/ml genutzt. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Absorption bei 492 nm gemessen. Hierfür wurde der Microplate Reader von Molecular Devices genutzt.

### **2.2.10 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

20 - 40 µg Protein wurden mit RIPA Lysis Buffer und 6x Lämmli-Puffer (375 mM Tris Base, 12 mM EDTA, 6% Glycerol, 6% SDS, 0,03% Bromphenolblau, 300 nM DTT) verdünnt und bei 95 °C für 5-10 min denaturiert. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel (4-20% Mini-PROTEAN® TGX) geladen und durch SDS-PAGE aufgetrennt (150 V, 500 mA, 50 min). Für den SDS Laufpuffer wurden 2 mM Tris HCl, 250 mM Glycin, 0,1% SDS verwendet. Als Standard wurden 5 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder genutzt.

### **2.2.11 Western Blot**

Um die Proteine durch semi-dry blotting auf eine PVDF (polyvinylidene difluoride) – Membran zu übertragen, wurde die Membran in Methanol aktiviert und zwischen in Anoden- und Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Hierfür wurden zwei Anodenpuffer (Puffer A: 300 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4; Puffer B: 25 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4) und ein Kathodenpuffer (Puffer C: 25 mM Tris, 20% Methanol, 40 mM ε-Aminocaprinsäure, pH 9,4) genutzt. Die Proteine wurden für 50 min bei 80 mA übertragen.

Danach wurde die Membran für mindestens 1 h geblockt. Für die Blocklösung wurden entweder 5% Milchpulver oder 5% BSA in Waschpuffer (1x PBS, 0,05% Tween 20) gelöst. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Membran wurde dreimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 5 min gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran mit ECL-Substrat (250mM Luminolnatriumsalz in DMSO, 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO, 1 M Tris-HCl, pH 8,5), welchem 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt wurde, inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ChemiDoc™ XRS+ System. Die Quantifizierung wurde mit Image Lab™ von Bio-Rad durchgeführt. Für die Ladekontrolle wurde β-Actin genutzt. Um weitere Proteine auf der Membran zu detektieren, wurde die Membran für 20 min bei Raumtemperatur mit Stripping-Lösung inkubiert, um gebundene Antikörper abzulösen.

### **2.2.12 Statistik**

Für die statistische Analyse wurden Microsoft Excel, GraphPad Prism 8 und CompuSyn Version 1 (<http://www.combosyn.com/>) verwendet. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach vorheriger Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001). Die IC50-Werte zur Quantifizierung der Zellviabilität wurden mit der FitSpline Methode in GraphPad Prism ermittelt. Zur Analyse möglicher Synergieeffekte wurde die Software CompuSyn eingesetzt. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen (SD) sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Graphen wurden mit der Software GraphPad Prism 8 erstellt. Die Abbildungen wurde mit dem Online-Tool BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)) erstellt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 HCC-Zelllinien weisen unterschiedliche Expressions-Level anti-apoptotischer BCL-2 Familienmitglieder auf**

Zunächst wurde die Expression der drei zentralen anti-apoptotischen BCL-2-Proteine (Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-XL) in den drei Zelllinien HepG2, Hep3B und Huh7 analysiert (Abbildung 3). Alle drei Zelllinien exprimierten Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-XL, wobei die Proteingehalte zwischen den Zelllinien erheblich variierten. Im Vergleich zu Hep3B und Huh7 wiesen HepG2 Zellen eine deutlich höhere Expression von Bcl-2 und Bcl-XL auf. Hingegen zeigten Hep3B-Zellen eine wesentlich stärkere Mcl-1-Expression als HepG2 und Huh7.

Diese unterschiedlichen Expressionsmuster machen die drei Zelllinien zu einem geeigneten Modell, um die Variabilität der BCL-2-Expression im HCC abzubilden. In dieser Doktorarbeit werden die Ergebnisse für HepG2 dargestellt. Die Gesamtheit der Resultate aller drei Zelllinien werden in einer bereits erfolgten Publikation dieser Untersuchungen mit der Verfasserin als Zweit-Autorin dargestellt (78).

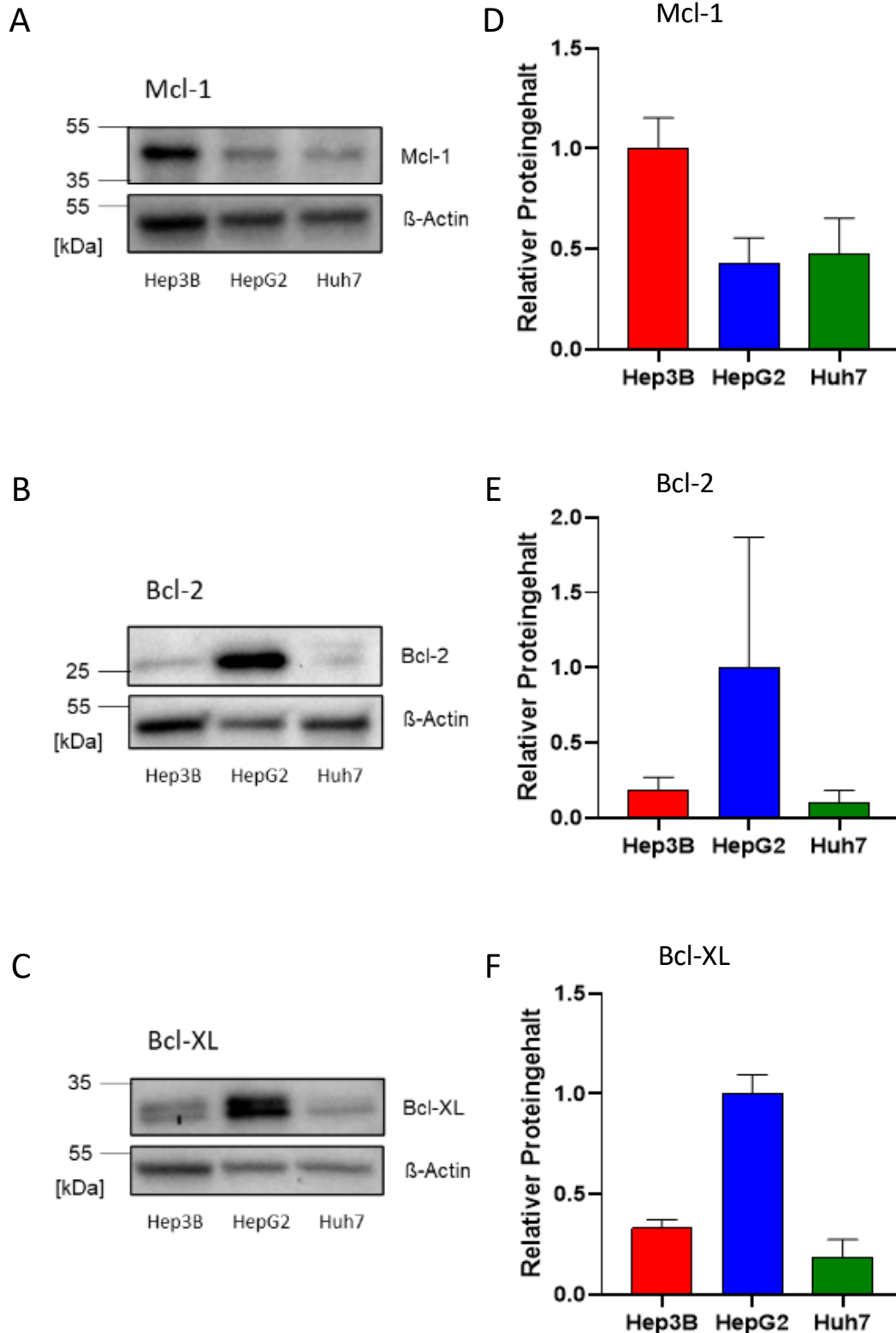
#### **3.2 Die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 induziert die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium**

BH3-Mimetika wirken durch die Inhibition anti-apoptotischer BCL-2-Proteine. Dabei hemmt ABT-199 gezielt Bcl-2, während MIK665 spezifisch Mcl-1 inhibiert (99, 104, 113). Wenn die Therapeutika eine ausreichende Wirksamkeit zeigen, sollten Bax und Bak aktiviert werden. Dies führt zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom c sowie weiterer pro-apoptotischer Faktoren. Dadurch wird die intrinsische Apoptose eingeleitet (63). Um zu untersuchen, ob die Behandlung von HepG2 Zellen mit ABT-199 und MIK665 zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt, wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen oder ihrer Kombination behandelt, nach einer 4-stündigen Inkubation mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert und mit Antikörpern gegen Cytochrom c sowie TOMM20, einem Markerprotein der äußeren mitochondrialen Membran, gefärbt (152). Zusätzlich wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. DAPI ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der Adenin-Thymin-reiche Regionen in der dsDNA bindet und somit genutzt werden kann, um Zellkerne anzufärben (153). Abbildung 4

## Ergebnisse

zeigt die Immunfluoreszenzbilder nach Behandlung mit ABT-199 allein oder in Kombination mit MIK665. Überlagern sich Cytochrom c und TOMM20, ist Cytochrom c nicht im Zytosol, sondern nur in den Mitochondrien. Dies ist bei der Negativkontrolle mit DMSO der Fall (Abbildung 4 A). Überlagern sie nicht, ist Cytochrom c aus den Mitochondrien ausgetreten. Dies ist bei der Positivkontrolle mit FCCP, sowie insbesondere bei den Kombinationsbehandlungen zu beobachten (Abbildung 4 B, D, E). Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die Kombinationsbehandlung intrinsische Apoptose induziert.

## Ergebnisse

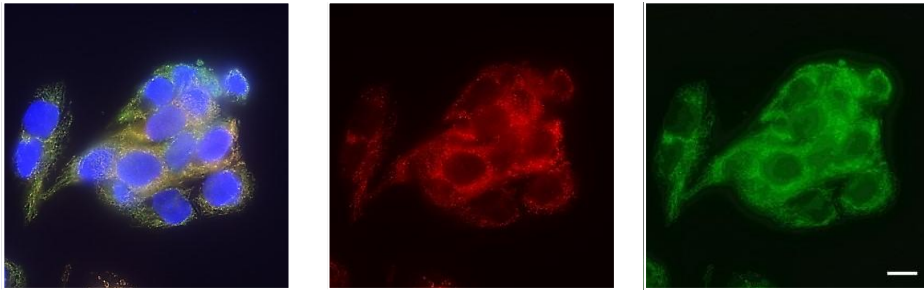


**Abbildung 3: Expression der BCL-2 Moleküle Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-XL**

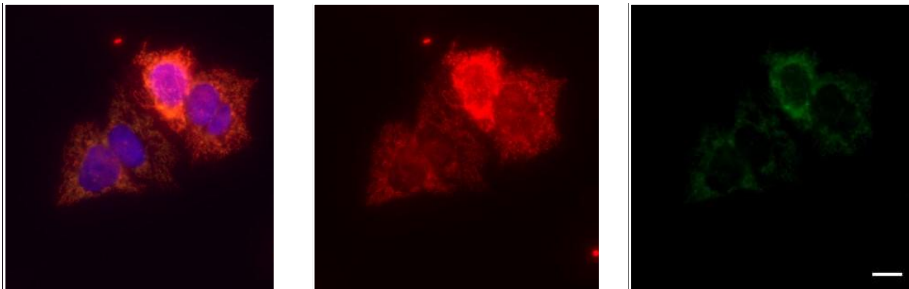
Die Expression der anti-apoptotischen BCL-2 Moleküle Mcl-1 (A, D), Bcl-2 (B, E) und Bcl-XL (C, F) wurde mittels Western Blot in den Zelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 untersucht. Gezeigt sind beispielhafte Western Blots (A-C) sowie die quantitative Auswertung des Proteingehalts in Relation zu  $\beta$ -Actin (D-F).  $n=3$ ,  $MW \pm SD$

## Ergebnisse

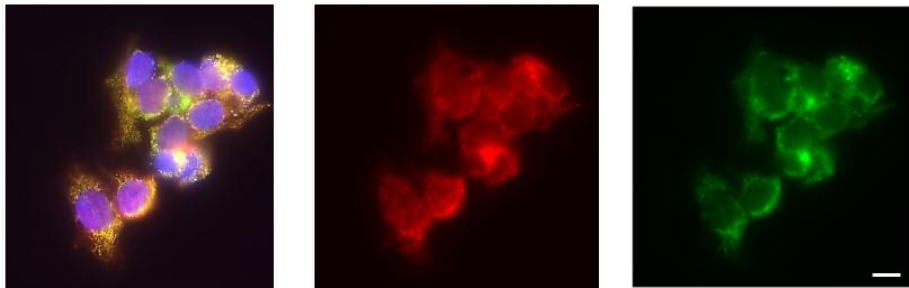
**A DMSO**



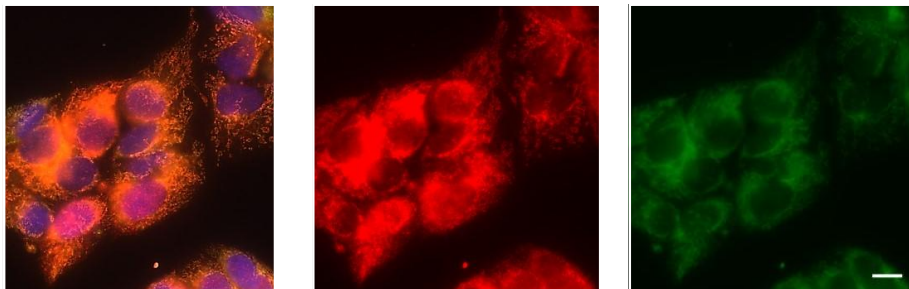
**B 30  $\mu$ M FCCP**



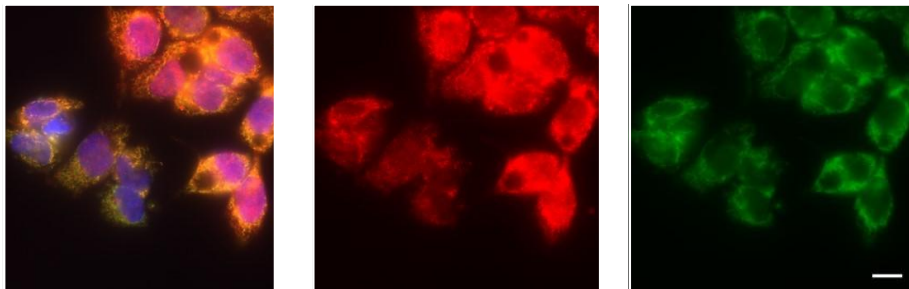
**C 5  $\mu$ M ABT**



**D 1  $\mu$ M ABT + 1  $\mu$ M MIK**



**E 5  $\mu$ M ABT + 1  $\mu$ M MIK**



**Abbildung 4: Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch ABT-199 und MIK665**

## Ergebnisse

HepG2 Zellen wurden mit ABT-199 und/oder MIK665 behandelt. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert und mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt. Als Kontrolle dienten DMSO (A) und FCCP (B, Behandlung für 3 h). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) dargestellt, Cytochrom c wurde rot, das mitochondriale Membranprotein TOMM20 grün angefärbt. Die erste Spalte zeigt beide Färbungen übereinandergelegt, die zweite Spalte zeigt nur Cytochrom c, die dritte Spalte TOMM20. Eine abweichende Anfärbung von Cytochrom c im Vergleich zu TOMM20 zeigt den Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Scale bar 11  $\mu\text{M}$ . n=3, gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzbilder.

### 3.3 Die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 induziert Caspaseaktivität

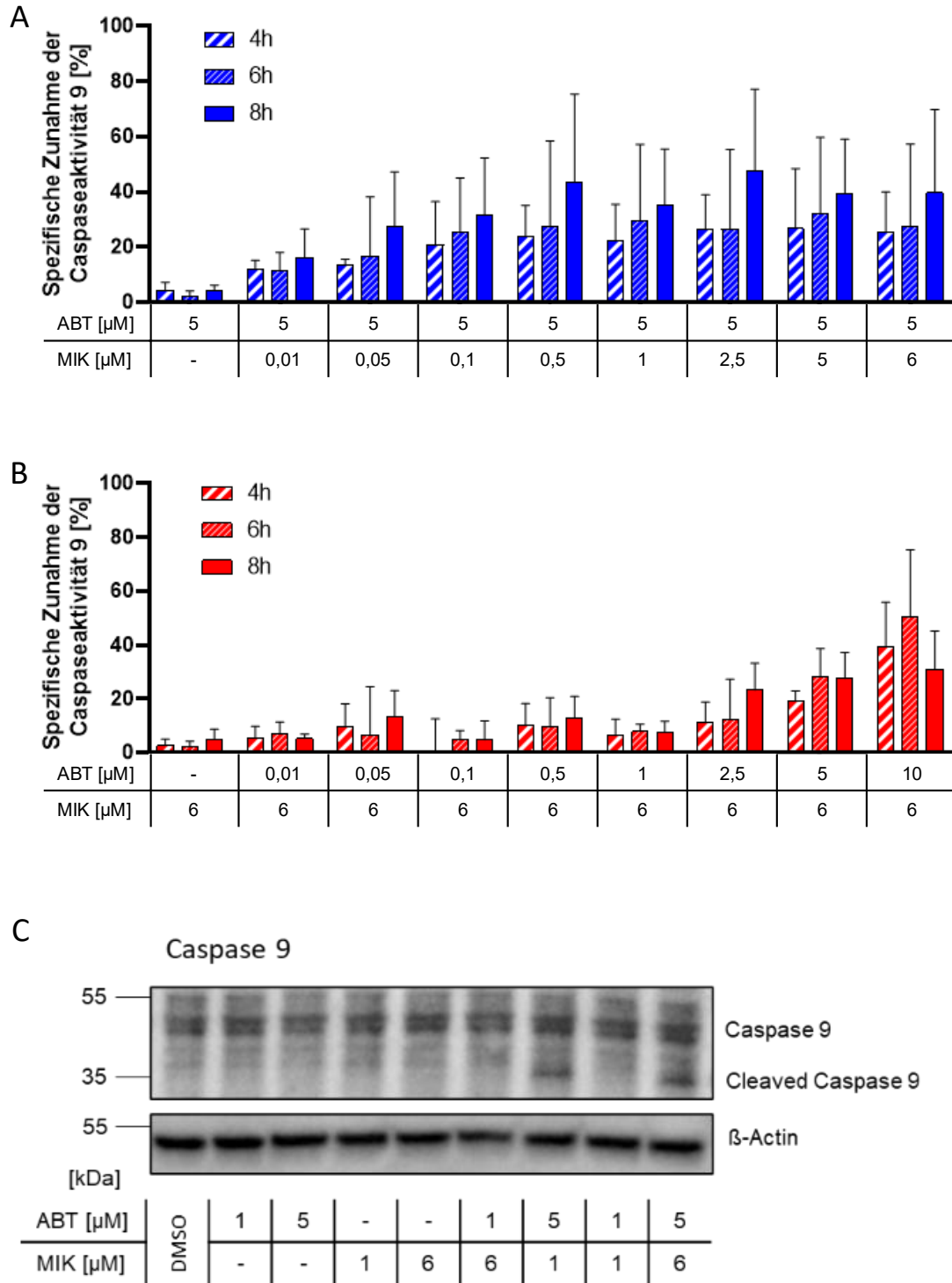
#### 3.3.1 Aktivierung von Caspase 9

Nachdem Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird, bindet es APAF-1, welches daraufhin aggregiert und zusammen mit Procaspase 9 das Apoptosom bildet. Caspase 9 ist aktiv, solange sie im Apoptosom gebunden ist (154, 155). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Behandlung von HepG2 Zellen mit ABT-199 und MIK665 zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Dazu wurden die Zellen entweder mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und ansteigenden Konzentrationen von MIK665 (0,01–6  $\mu\text{M}$ ) oder mit 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und ansteigenden Konzentrationen von ABT-199 (0,01–10  $\mu\text{M}$ ) behandelt.

Nach 4, 6 und 8 Stunden wurde die spezifisch durch die Behandlung induzierte Zunahme der Caspaseaktivität mittels eines lumineszenzbasierten Assays gemessen. Zur Korrektur unspezifischer Hintergrundsignale wurden zellfreie Proben mit Medium und Assay-Substrat verwendet, deren Werte von den Messergebnissen der Zellproben abgezogen wurden. Die resultierende Zunahme der Caspaseaktivität wurde relativ zur DMSO-Kontrolle berechnet (vgl. 2.2.5). Während die Einzelbehandlungen kaum Effekte zeigten, führte die Kombination von ABT-199 und MIK665 zu einer erhöhten Caspaseaktivität. Dabei zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der Aktivität mit steigender Wirkstoffkonzentration und längerer Behandlungsdauer (Abbildung 5 A, B).

Zusätzlich wurde die Spaltung von Caspase 9 mittels Western Blot untersucht, da diese mit der Aktivierung einhergeht (71). Hierfür wurden die Zellen für 4 Stunden mit 1 oder 5  $\mu\text{M}$  ABT-199, 1 oder 6  $\mu\text{M}$  MIK665, oder mit Kombinationen beider Substanzen behandelt. Es konnte eine Spaltung der Caspase 9 nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 + 1  $\mu\text{M}$  MIK665, sowie nach 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 + 6  $\mu\text{M}$  MIK665 gezeigt werden, nicht aber bei beiden Therapeutika allein oder bei niedrigen Dosen ABT-199 (Abbildung 5C). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen des Aktivitätsassays.

## Ergebnisse



**Abbildung 5: Caspase 9 Aktivität und Spaltung nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

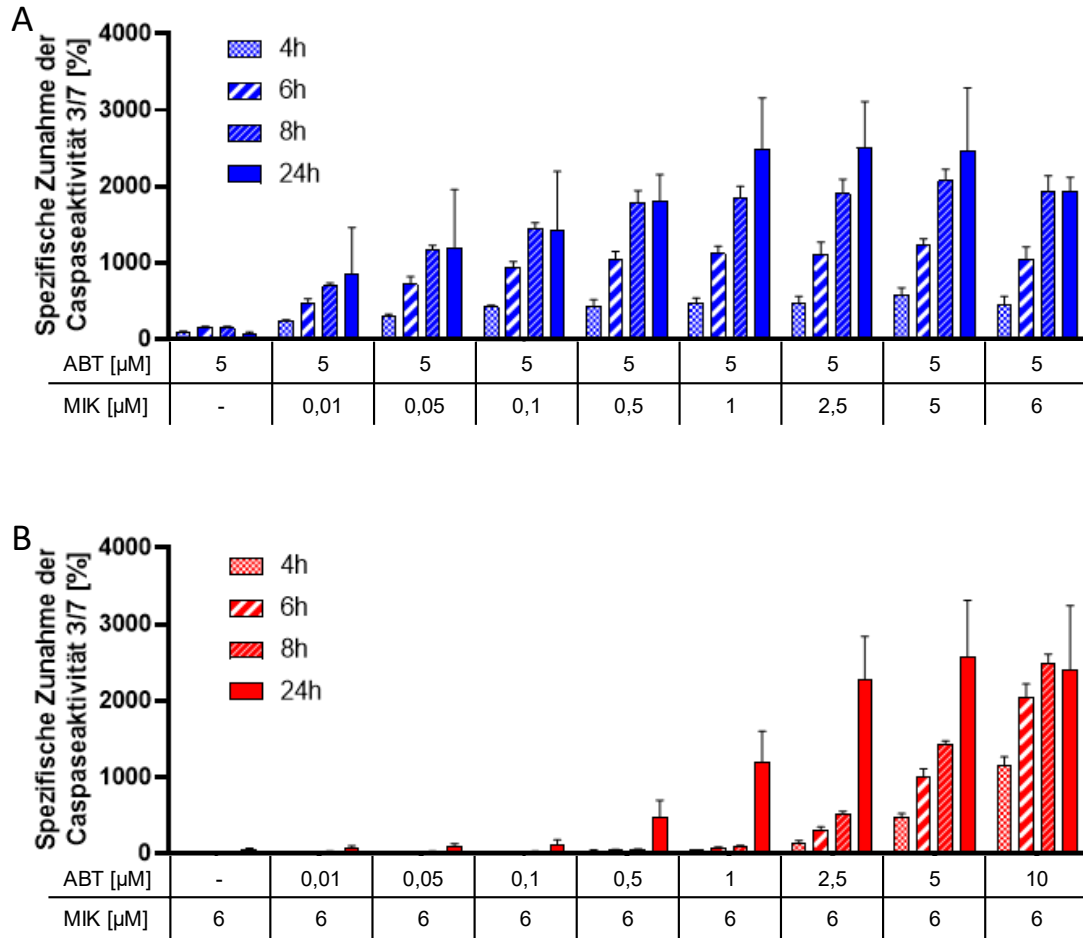
HepG2 Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigenden Konzentrationen MIK665 (A) bzw. mit 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und aufsteigenden Konzentrationen ABT-199 behandelt (B). Es wurde die Aktivität der Caspase 9 mittels lumineszenzbasiertem Assay nach 4 – 8 h Behandlungszeit gemessen. Die spezifische Zunahme der Caspaseaktivität durch die Behandlung wurde im Vergleich zu der Behandlung nur mit DMSO berechnet. Die Spaltung der Caspase 9 wurde mittels Western Blot nach 4 h Behandlung mit ABT-199 und/ oder MIK665 untersucht (C). Als Kontrolle diente DMSO. n=3, MW  $\pm$  SD

### **3.3.2 Aktivierung von Effektorcaspasen und Spaltung von PARP**

Aktivierte Caspase 9 spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7, wodurch diese ebenfalls aktiviert werden. Die Effektorcaspasen spalten wiederum eine Vielzahl zellulärer Proteine (63). Ein Substrat der Caspase 3 ist die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), die daher häufig als Marker für Apoptose verwendet wird (156–158). Um den nächsten Schritt der Apoptosekaskade zu untersuchen, wurde die spezifische Zunahme der Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 bestimmt. Es wurden die gleichen Therapeutikakonzentrationen genutzt wie bei Caspase 9. Nach 4, 6, 8 und 24 h wurde die Aktivität mittels lumineszenzbasiertem Assay bestimmt.

Es wurde eine deutliche Zunahme der Aktivität bei den Kombinationen insbesondere mit hoher ABT-199-Konzentration (5  $\mu$ M) gemessen (Abbildung 6). Die Aktivität nahm mit der Zeit zu (4 < 6 < 8 < 24 h). Im Western Blot konnte eine Spaltung der Caspase 3 nach 4 h Behandlung mit 5  $\mu$ M ABT-199 + 1 oder 5  $\mu$ M ABT-199 + 6  $\mu$ M MIK665 gezeigt werden, nicht jedoch für Behandlungen mit den Therapeutika einzeln oder mit Kombinationen mit niedrigen ABT-199-Konzentrationen von 1  $\mu$ M (Abbildung 7 A). Dies entspricht den Ergebnissen der Caspase 9 Aktivierung. Eine Spaltung von PARP konnte nach 4 h Behandlung mit 5  $\mu$ M ABT-199 allein sowie nach allen Kombinationen, insbesondere mit hohen ABT-199-Konzentrationen, gezeigt werden (Abbildung 7 B).

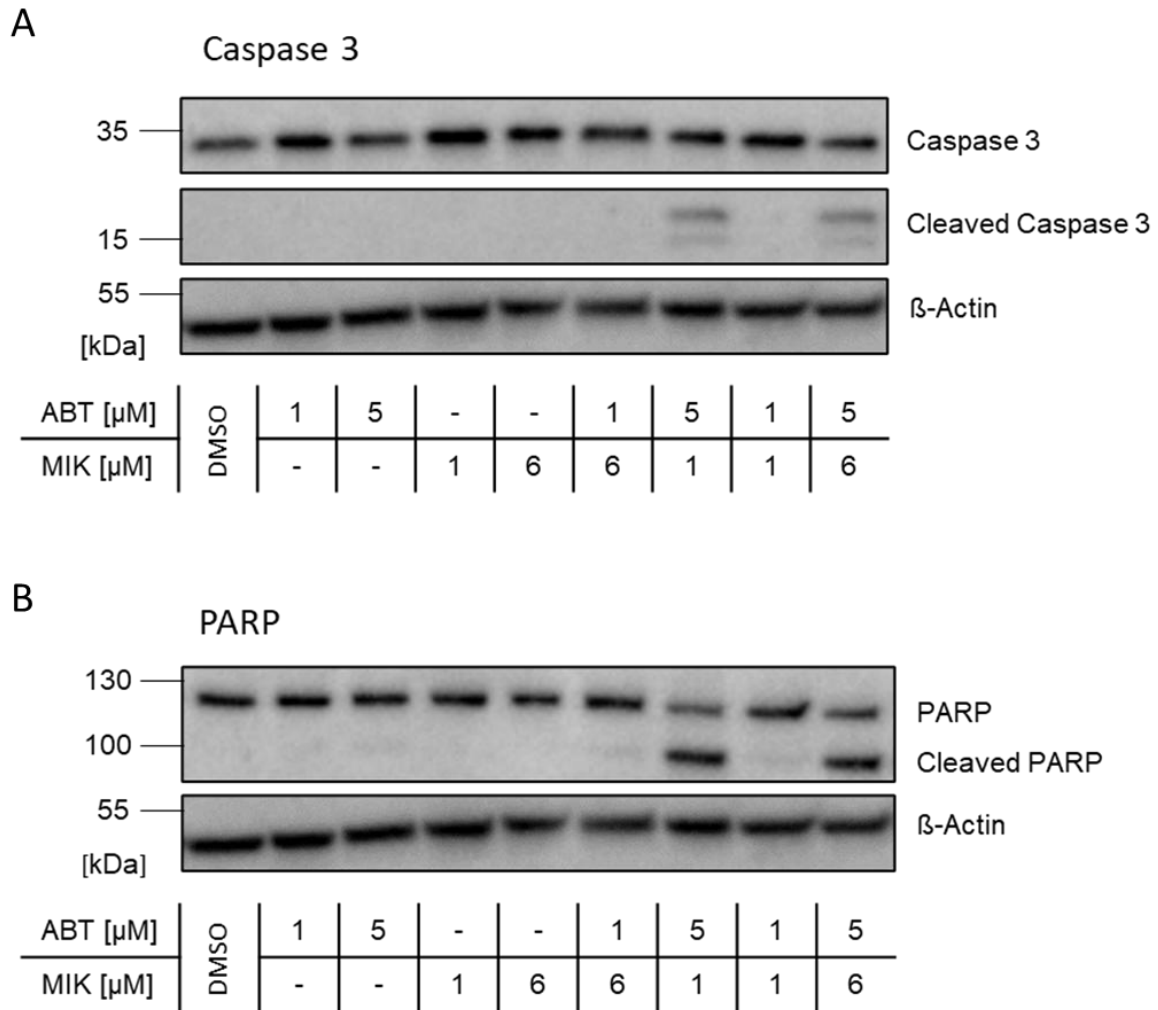
## Ergebnisse



**Abbildung 6: Caspase 3/7 Aktivität nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigenden Konzentrationen MIK665 (A) bzw. mit 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und aufsteigenden Konzentrationen ABT-199 behandelt (B). Es wurde die Aktivität der Caspasen 3/7 mittels lumineszenzbasiertem Assay nach 4 – 24 h Behandlungszeit gemessen und die spezifische Zunahme der Caspaseaktivität durch die Behandlung im Vergleich zu der Behandlung nur mit DMSO berechnet. n=3, MW  $\pm$  SD

## Ergebnisse



**Abbildung 7: Spaltung von Caspase 3 und PARP nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

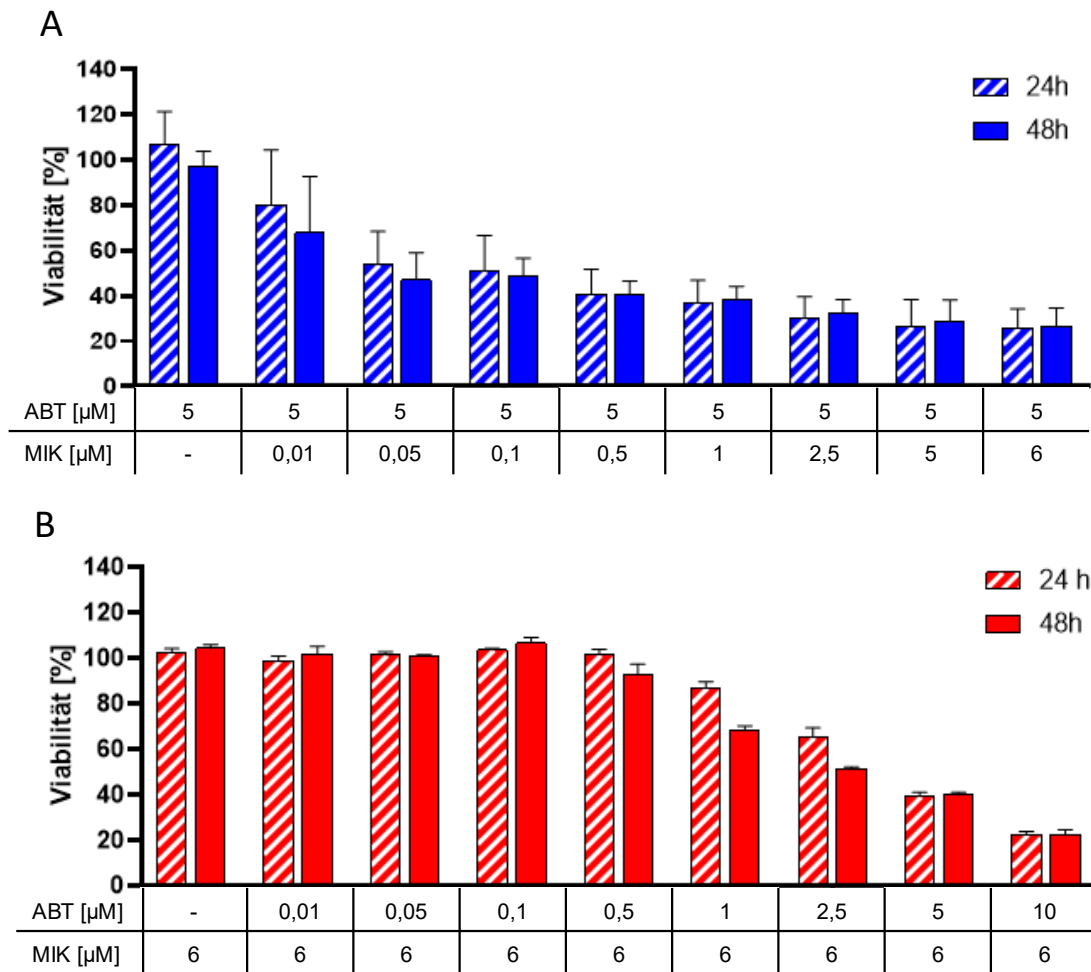
HepG2 Zellen wurden mit ABT-199, MIK665 oder einer Kombination daraus für 4 h behandelt. Die Spaltung von Caspase 3 (A) und von PARP (B) wurde mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle diente DMSO. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.

### 3.4 Die Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665 führt zu ATP-Depletion/Vitalitätsverlust

Ein etablierter Indikator für die Zellviabilität ist der ATP-Gehalt, da ATP für essenzielle zelluläre Prozesse und die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität unerlässlich ist. Eine verringerte ATP-Produktion weist auf eine eingeschränkte Zellfunktion und reduzierte Proliferationsfähigkeit hin. Da metabolisch inaktive, nekrotische oder apoptotische Zellen kein ATP mehr synthetisieren, ist ein stark erniedrigter oder nicht nachweisbarer ATP-Gehalt ein eindeutiges Indiz für Zelluntergang. Daher wurde zur Quantifizierung der Zellviabilität nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 der ATP-Gehalt der HepG2 Zellen bestimmt. In Abbildung 8 ist die Viabilität (zelluläres ATP-

## Ergebnisse

Level) relativ zu DMSO dargestellt. Die Viabilität der mit DMSO behandelten Zellen wurde auf 100% festgelegt. Die Zellviabilität nahm nach der Behandlung mit einer Kombination aus ABT-199 und MIK665 mit steigenden Dosen des jeweils zweiten Medikaments deutlich ab. Besonders deutlich waren die Effekte bei der Versuchsreihe mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und steigenden MIK665-Konzentrationen.



**Abbildung 8: Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigenden Konzentrationen MIK665 (A) oder 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und aufsteigenden Konzentrationen ABT-199 (B) für 24 oder 48 h behandelt. Die Viabilität wurde mittels lumineszenzbasiertem Assay bestimmt und ist in Relation zu DMSO dargestellt. n=3, MW  $\pm$  SD

### 3.5 Inhibition von BCL-2-Familienmitgliedern induziert Zelltod

Die Aktivierung der Caspasekaskade und der Verlust von ATP deuten darauf hin, dass die Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und MIK665 Apoptose in HepG2 Zellen auslöst. Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ABT-199 und MIK665 Zelltod induziert. Dabei lag ein besonderer Fokus darauf, ob die Medikamente additiv oder synergistisch wirken. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen mit ABT-199 und/ oder MIK665 behandelt. Nach 24 und 48 h wurde der Zelltod mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden zum einen mit aufsteigenden Konzentrationen beider Medikamente allein behandelt. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit einer konstanten Dosis von 5  $\mu$ M ABT-199 oder 6  $\mu$ M MIK665 und aufsteigenden Konzentrationen des jeweils anderen Medikaments behandelt. Im Anschluss an die Messung wurde der spezifische Zelltod berechnet. Der spezifische Zelltod ist der Anteil des Zelltods, der auf die Behandlung zurückzuführen ist.

In Abbildung 9 sind exemplarisch Scatterplots gezeigt, welche den Zelltod nach Messung mittels Durchflusszytometrie darstellen. Die Zellen wurden mit FITC Annexin V und DAPI gefärbt. Annexin V ist nicht zellmembranpermeabel und bindet Phosphatidylserin, welches sich auf der Zelloberfläche befindet. In apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin, welches sich in gesunden Zellen überwiegend auf der Innenseite der Plasmamembran befindet, bereits relativ zu Beginn der Apoptose auf der äußeren Plasmamembran exponiert (159). Es kann dann von Annexin V gebunden werden. Die Detektion wird durch die Konjugation von Annexin V mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), einem fluoreszierenden Farbstoff, ermöglicht. DAPI bindet Adenin-Thymin-reiche Regionen der dsDNA, wodurch das fluoreszierende Signal von DAPI verstärkt wird (153). Es ist kaum zellpermeabel und färbt damit bevorzugt tote Zellen an. Um zu verhindern, dass DAPI auch vitale Zellen anfärbt, wurden die Zellen nach Färbung bis zur Messung auf Eis gelagert.

Die Zellen wurden anhand der Negativkontrolle DMSO (Abbildung 9 B) und der Positivkontrolle Panobinostat (Abbildung 9 C) je nach Anfärbbarkeit mit DAPI und FITC Annexin V in vital oder tot eingeteilt. Die Quadranten Q1-3 stellen tote Zellen dar, da sie angefärbt wurden, wobei apoptotische Zellen nur von FITC Annexin V angefärbt wurden (Quadrant 3), und bereits tote Zelle von DAPI und FITC Annexin V angefärbt wurden (Quadrant 2). Der Quadrant Q4 beinhaltet vitale Zellen. Exemplarisch ist der

## Ergebnisse

Zelltod nach 48 h Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199, 1  $\mu\text{M}$  MIK665 sowie 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 + 1  $\mu\text{M}$  MIK665 dargestellt.

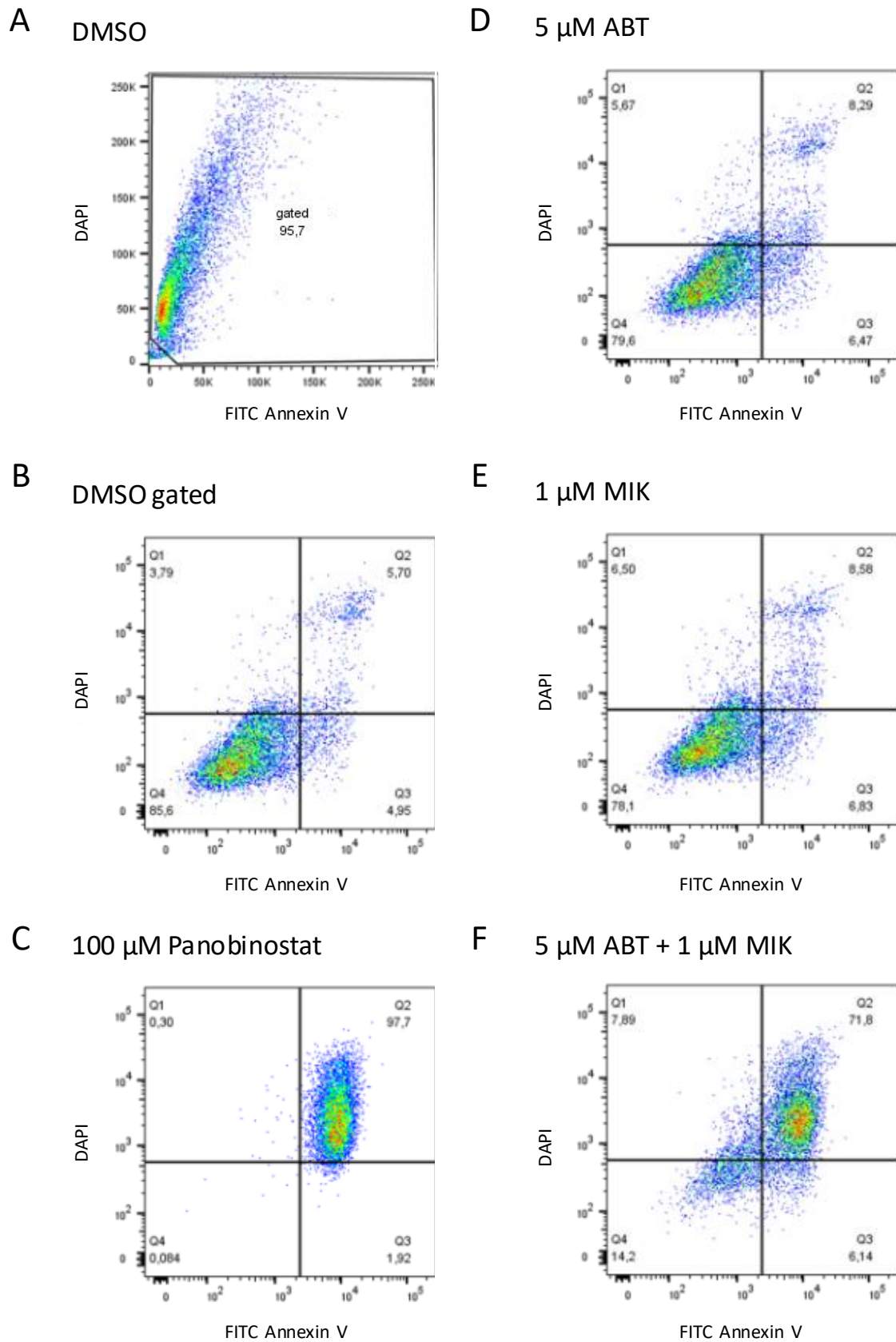
In den getesteten Konzentrationen induzierten beide Medikamente allein nur minimalen Zelltod. In den Scatterplots befinden sich nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 oder 1  $\mu\text{M}$  MIK665 die meisten Zellen im vitalen Quadranten (Q4 (Abbildung 9 D, E)). Hingegen führte die Kombination beider Substanzen zu einem deutlichen Anstieg des Zelltods, wodurch die Zellen überwiegend im apoptotischen Quadranten (Q2) detektiert wurden (Abbildung 9 F).

### **3.5.1 Die Kombinationsbehandlung aus MIK665 und ABT-199 induziert mehr Zelltod als die Monotherapien**

Der spezifische Zelltod nach Behandlung mit beiden Therapeutika allein ist in Abbildung 10 A für MIK665 und in Abbildung 10 B für ABT-199 dargestellt. Mit zunehmender Dosis stieg der Zelltod. Aus den Zelltodwerten lässt sich die IC<sub>50</sub> berechnen. Dabei handelt es sich um die mittlere inhibitorische Konzentration und damit diejenige Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen tot sind. Sie betrug für MIK665 allein 22,1  $\mu\text{M}$  nach 24 h und 18,1  $\mu\text{M}$  nach 48 h. Für ABT-199 allein betrug die IC<sub>50</sub> 27,8  $\mu\text{M}$  nach 24 h und 24,0  $\mu\text{M}$  nach 48 h.

Der spezifische Zelltod nach Behandlung mit beiden Therapeutika in Kombination ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigenden MIK665-Konzentrationen (Abbildung 11 A) bzw. 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und aufsteigenden ABT-199-Konzentrationen (Abbildung 11 B) behandelt. Hohe Zelltodraten waren bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen zu messen als bei den Einzelbehandlungen. Bei 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 waren nur 0,025  $\mu\text{M}$  MIK665 nach 24 h und 0,015  $\mu\text{M}$  MIK665 nach 48 h nötig, um 50% der Zellen zu töten. Bei 6  $\mu\text{M}$  MIK665 genügten 1,8  $\mu\text{M}$  ABT-199 nach 24 h und 0,6  $\mu\text{M}$  ABT-199 nach 48 h, um 50% der Zellen zu töten.

# Ergebnisse

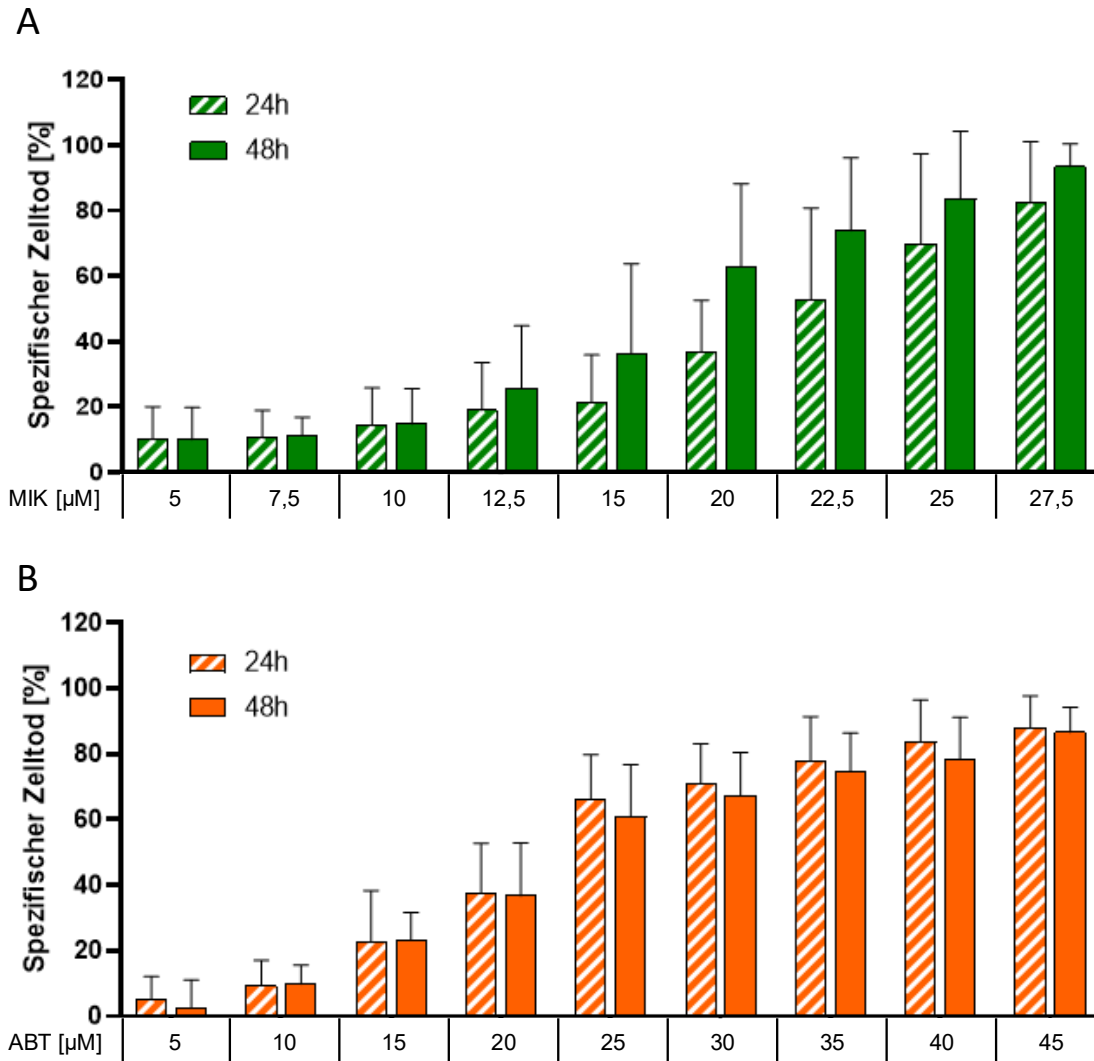


**Abbildung 9: Scatterplots der Durchflusszytometrie**

Dargestellt sind exemplarische Scatterplots nach Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie nach 48 h Behandlung von HepG2 Zellen mit ABT-199 und MIK665. Zuerst wurde der Zellschrott aussortiert (A). Dann wurden die Zellen je nach Anfärbarkeit mit DAPI, welches spät-apoptotische Zellen anfärbt,

## Ergebnisse

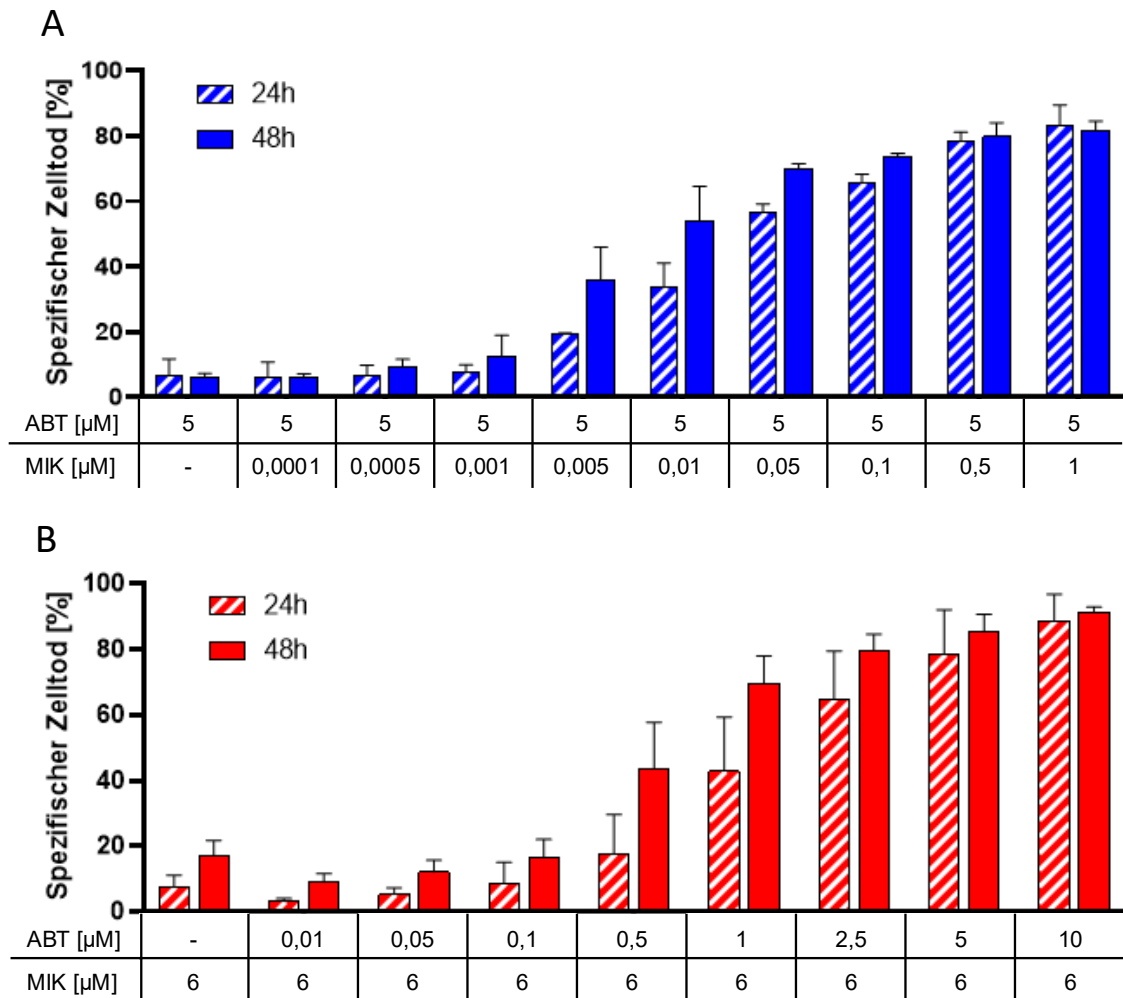
und FITC Annexin V, welches früh-apoptotische Zellen anfärbt, in vital oder tot eingeteilt. Die Quadranten Q1-3 stellen tote Zellen dar, da sie angefärbt werden, der Quadrant Q4 beinhaltet vitale Zellen. Die Einteilung wurde anhand der Negativkontrolle DMSO und der Positivkontrolle Panobinostat durchgeführt (B, C). Desweiteren ist beispielhaft der Zelltod nach 48 h Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ABT (D), 1  $\mu\text{M}$  MIK (E) und 5  $\mu\text{M}$  ABT + 1  $\mu\text{M}$  MIK (F) dargestellt.



**Abbildung 10: Zelltod bei Behandlung mit nur einem BH3-Mimetikum**

HepG2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen MIK665 (A) oder ABT-199 (B) für 24 oder 48 h behandelt. Der Zelltod wurde nach Färbung mit DAPI und FITC Annexin V mittels Durchflusszytometrie bestimmt.  $n=3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Zelltod nach Behandlung mit einer Kombination aus ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigenden Konzentrationen MIK665 (A) oder 6  $\mu\text{M}$  MIK665 und aufsteigenden Konzentrationen ABT-199 (B) für 24 oder 48 h behandelt. Der Zelltod wurde nach Färbung mit DAPI und FITC Annexin V mittels Durchflusszytometrie bestimmt.  $n=3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$

### 3.5.2 ABT-199 und MIK665 wirken synergistisch

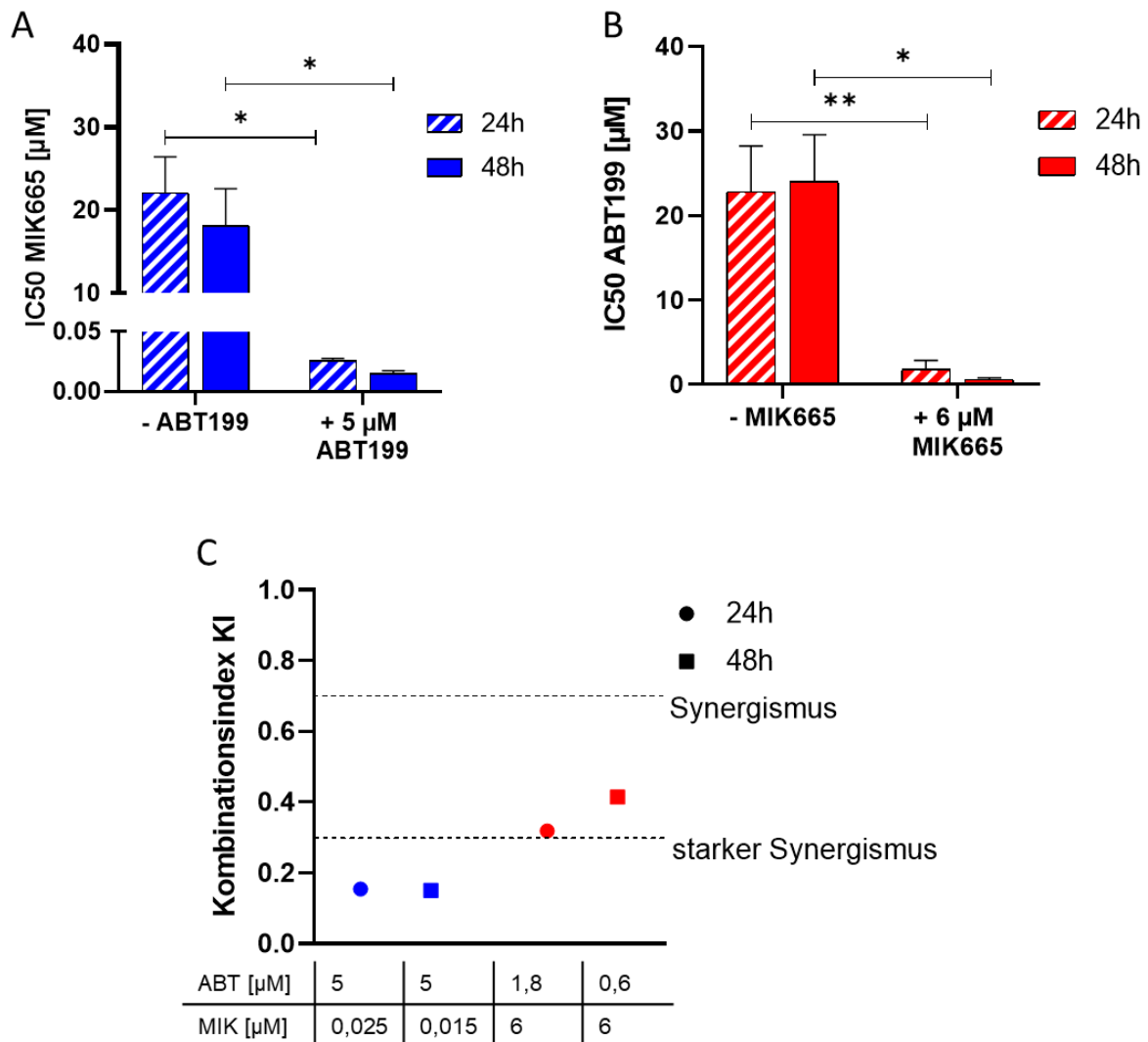
In Abbildung 12 ist jeweils die  $\text{IC}_{50}$  von ABT-199 und MIK665 mit und ohne konstante Konzentration des jeweils anderen Medikaments dargestellt. In beiden Fällen konnte die Gabe des zweiten Medikaments die  $\text{IC}_{50}$  deutlich reduzieren. Mit 6  $\mu\text{M}$  MIK665 betrug die  $\text{IC}_{50}$  von ABT-199 nur 7% (24 h) bzw. 2,4% (48 h) der  $\text{IC}_{50}$  ohne MIK665. Die  $\text{IC}_{50}$  von MIK665 betrug mit 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 sogar nur 0,1% (24 h und 48 h) der  $\text{IC}_{50}$  ohne ABT-199.

Die synergistische Wirkung der Medikamente wurde mithilfe der CompuSyn-Software durch Berechnung des Kombinationsindex (KI) analysiert. Ein KI-Wert  $<1$  weist auf Synergismus hin, ein Wert von 1 entspricht einem additiven Effekt, während Werte  $>1$

## Ergebnisse

auf Antagonismus hindeuten. Besonders niedrige KI-Werte unter 0,7 sprechen für eine ausgeprägte synergistische Interaktion, während Werte unter 0,3 auf starken Synergismus hinweisen (160). Es errechnete sich für beide Konzentrationsreihen ein Synergismus, für 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und aufsteigende MIK665-Konzentrationen sogar ein starker Synergismus ( $\text{KI} \sim 0,15$ ) (Abbildung 12 C).

Während beide Therapeutika allein kaum Wirkung erzielten, induzierte die Kombination aus ABT-199 und MIK665 deutlich Zelltod in HepG2. Die beiden Therapeutika zeigten eine synergistische Wirkung in der Induktion von Zelltod, wodurch die erforderlichen Dosen reduziert werden können. Dies ist insbesondere für die potenzielle klinische Anwendung von Bedeutung, da die gleichzeitige Gabe beider Wirkstoffe nicht nur die therapeutische Effektivität steigern, sondern auch durch die geringere Dosierung möglicherweise Nebenwirkungen reduzieren kann.



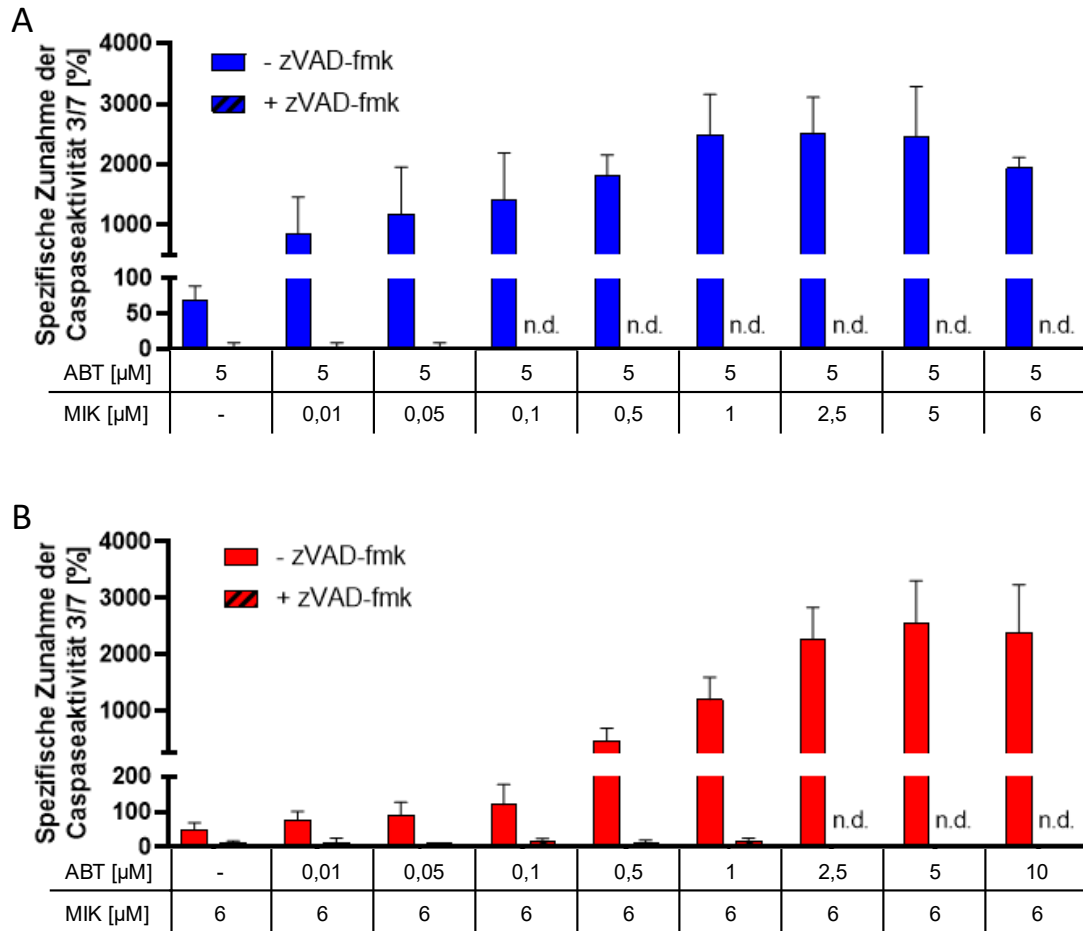
### **Abbildung 12: Synergismus von ABT-199 und MIK665 in HepG2**

A zeigt einen Vergleich der IC50 von MIK665 ohne ABT-199 mit der IC50 von MIK665 mit 5 µM ABT-199. B zeigt den Vergleich der IC50 von ABT-199 ohne MIK665 mit der IC50 von ABT-199 mit 6 µM MIK665. Der Graph in C zeigt die Kombinationsindices. Zur Berechnung wurden die interpolierten IC50 Werte genutzt. Die Berechnung wurde mit CompuSyn (Version 1, <http://www.combosyn.com>, Zugriff am 21.02.2023) durchgeführt. KI < 1 bedeutet Synergismus, < 0,7 deutlicher Synergismus, < 0,3 starker Synergismus. \* p<0,05, \*\* p<0,01, n=3, MW ± SD

### **3.6 Bei dem durch MIK665 und ABT-199 induzierten Zelltod handelt es sich um Apoptose**

zVAD-fmk ist ein Pan-Caspase-Inhibitor. Er inhibiert sowohl die Initiator-, als auch die Effektorcaspasen (161). Da die Behandlung der HepG2 Zellen mit ABT-199 und MIK665 die Caspasekaskade aktiviert und vermutlich über diesen Weg zum Zelltod führt, sollte der Zelltod durch eine Inhibition der Caspaseaktivität verhindert werden. Um dies zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob zVAD-fmk tatsächlich die Caspaseaktivität in unseren Zellen unterdrückt. Dafür wurde ein Teil der Zellen mit 35 µM zVAD-fmk vorbehandelt und nach 15-20 min mit ABT-199 und MIK665 behandelt. Nach 24 h wurde die Aktivität der Caspasen 3/7 gemessen. Wie in Abbildung 13 dargestellt, verhinderte die Co-Behandlung mit zVAD-fmk eine Aktivierung der Caspasen nahezu vollständig. In weiteren Experimenten gemessene Unterschiede des Zelltods durch die Behandlung mit zVAD-fmk können also durch eine Inhibition der Caspasen erklärt werden. Somit wurde in einem zweiten Schritt untersucht, welchen Effekt die Inhibition der Caspasen auf den Zelltod hat. Hierfür wurden die Zellen ebenfalls für 15-20 min mit 35 µM zVAD-fmk vorbehandelt und anschließend mit ABT-199 und MIK665 behandelt. Nach 24 und 48 h wurde der Zelltod bestimmt. In allen Versuchsreihen konnte der Zelltod durch die gleichzeitige Behandlung mit zVAD-fmk deutlich reduziert werden (Abbildung 14). In Übereinstimmung mit dem beobachteten Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien und dem Anstieg der Caspaseaktivität spricht dies für Apoptose als zugrundeliegenden Zelltodmechanismus. Das stimmt mit dem beschriebenen Wirkmechanismus der BH3-Mimetika überein (98, 104). Im Gegensatz zu anderen Zelltodarten, wie Nekrose, läuft Apoptose normalerweise ohne Entzündung ab (66). Dies ist insbesondere im Hinblick auf mögliche inflammatorische oder immunologische Konsequenzen relevant, die den klinischen Verlauf beeinflussen könnten (162).

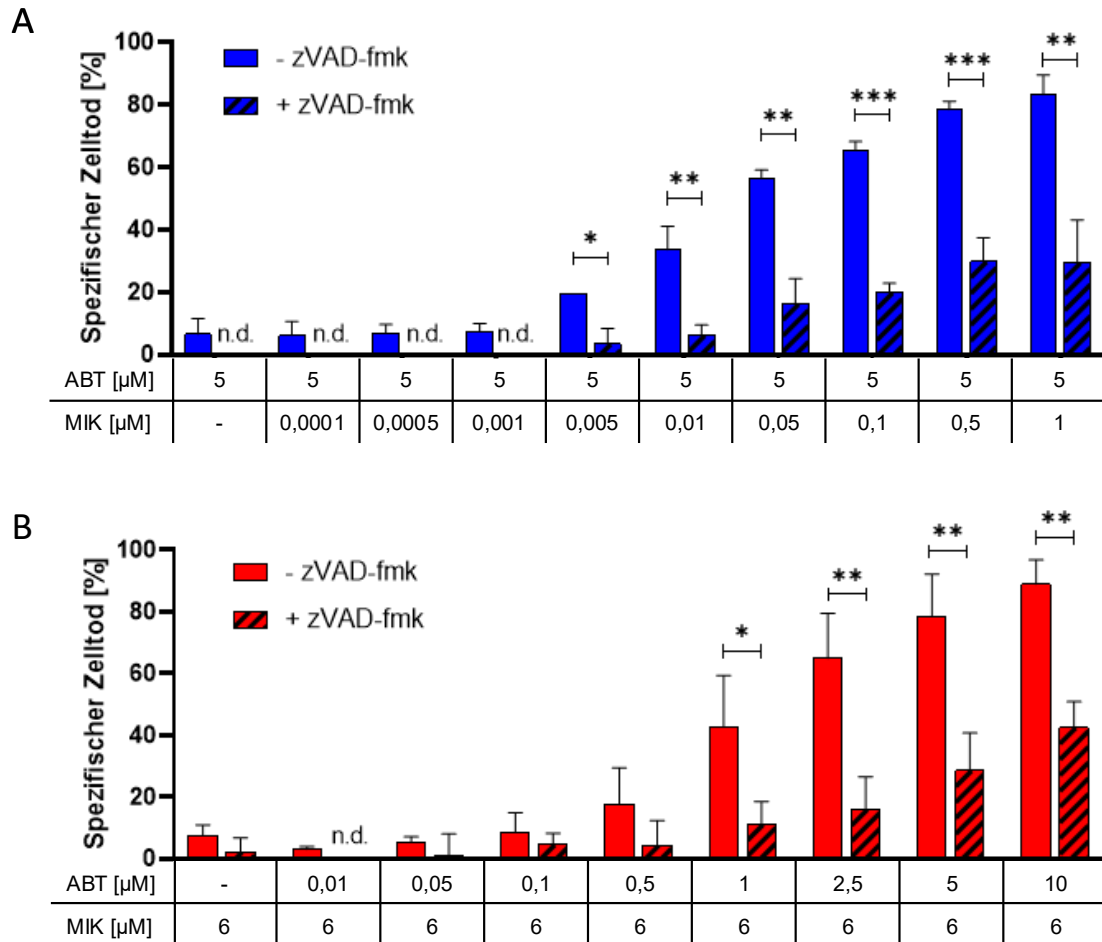
## Ergebnisse



**Abbildung 13: Einfluss des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-fmk auf die Aktivierung der Effektorcaspasen nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit 35  $\mu\text{M}$  zVAD vorbehandelt. Nach 15-20 min wurden die Zellen mit ABT-199 und/ oder MIK665 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach 24 h wurde die Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 mittels lumineszenzbasiertem Assay bestimmt. n=3, MW  $\pm$  SD

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Einfluss des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-fmk auf die Induktion von Zelltod durch ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit 35  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk vorbehandelt. Nach 15-20 min wurden die Zellen mit ABT-199 und/ oder MIK665 in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach 24 h wurde der Zelltod mittels Durchflusszytometrie bestimmt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , MW  $\pm$  SD

### 3.7 Die Induktion von Zelltod ist direkt auf die Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 zurückzuführen

Wir konnten zeigen, dass ABT-199 und MIK665 in HepG2 synergistisch Apoptose induzieren. Der beschriebene Wirkmechanismus dieser Substanzen ist die Inhibition von Bcl-2 durch ABT-199 (104) bzw. von Mcl-1 durch MIK665 (113). Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die direkte Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 zurückzuführen sind, wurden gezielte Knockdowns dieser Proteine mittels siRNA durchgeführt. Dazu wurde entweder Bcl-2 oder Mcl-1 durch spezifische siRNAs herunterreguliert. Um die Robustheit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden für beide Zielproteine jeweils zwei verschiedene siRNAs eingesetzt.

## Ergebnisse

Als Kontrolle wurden siRNAs derselben Hersteller verwendet, die keine spezifische Zielsequenz besitzen (scrambled siRNA). Dies ermöglichte eine Unterscheidung zwischen den spezifischen Effekten der siRNA und potenziellen unspezifischen Einflüssen des Transfektionsvorgangs oder der verwendeten Reagenzien. Anschließend wurden die Zellen mit ABT-199 oder MIK665 behandelt, um den Einfluss beider Therapeutika auf den Zelltod zu analysieren.

### **3.7.1 Herunterregulation von Mcl-1 oder Bcl-2 durch siRNA führt zu einem besseren Ansprechen auf die Behandlung mit MIK665 und ABT-199**

HepG2 Zellen wurden mit siRNA transfiziert, welche jeweils entweder Bcl-2 oder Mcl-1 herunterreguliert. Um zu überprüfen, ob der Knockdown erfolgreich war, wurde der Proteingehalt mittels Western Blot untersucht. In Abbildung 15 ist der Proteingehalt dargestellt, der im Western Blot 48 bzw. 72 h nach Behandlung mit der siRNA detektiert wurde. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet oder das Medium durch frisches Medium ohne siRNA ersetzt.

Dieses Vorgehen wurde gewählt, um einen Vergleich zu dem weiterführenden Experiment zu gewährleisten, in dem der Zelltod nach 48 h Behandlung mit siRNA sowie weiteren 24 h Behandlung mit ABT-199 oder MIK665 bestimmt wurde. Dabei wurde das Medium nach 48 h abgenommen, um neues Medium mit ABT-199 oder MIK665 zuzugeben, weshalb das Medium auch für die Western Blot Versuche ersetzt wurde. Durch den zweiten Zeitpunkt nach 72 h sollte gezeigt werden, dass der Effekt der siRNA anhielt und die Proteine über den gesamten Versuchszeitraum herunterreguliert waren. Abbildung 15 E und F zeigen die densitometrische Auswertung des Proteingehalts in Relation zur Ladekontrolle  $\beta$ -Actin. Die Behandlung mit siRNA reduzierte die Proteinmenge von Mcl-1 um ca. 75% im Vergleich zur Kontroll-siRNA, welche kein Target hat. Die Proteinmenge von Bcl-2 wurde durch die spezifischen siRNAs um fast 50% reduziert.

Als nächstes wurde untersucht, inwiefern eine Herunterregulierung von Bcl-2 und Mcl-1 durch siRNA die Wirkung von ABT-199 und MIK665 auf den Zelltod beeinflusst. Wenn die Medikamente über die Inhibition von Bcl-2 bzw. Mcl-1 wirken und nicht über Off-Target Effekte, müsste eine suffiziente Herunterregulierung von Mcl-1 dazu führen, dass MIK665 nicht deutlich mehr Zelltod verursacht als die ebenfalls mit Mcl-1-siRNA vorbehandelte Kontrolle mit DMSO. Es ergäbe sich ein spezifischer Zelltod nahe 0%. Wie aus den bereits beschriebenen Experimenten hervorgeht, wirken ABT-199 und MIK665 durch die kombinierte Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 synergistisch.

## Ergebnisse

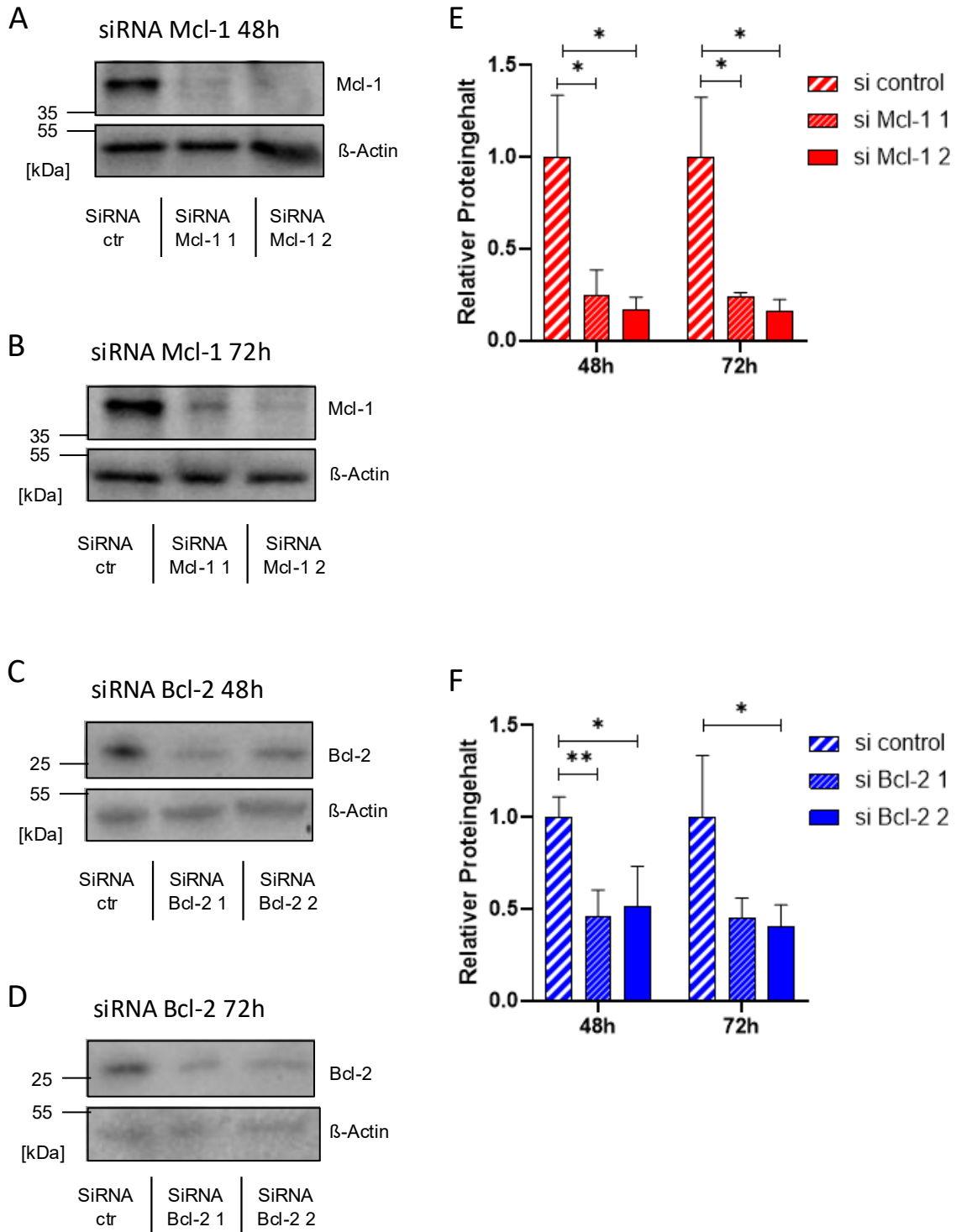
Dementsprechend sollte ABT-199 nach Behandlung mit Mcl-1-siRNA deutlich besser wirken als nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Das Gleiche gilt andersherum für Bcl-2: ABT-199 sollte nicht deutlich mehr Zelltod verursachen als die DMSO-Kontrolle, wenn Bcl-2 bereits suffizient durch die siRNA herunterreguliert wurde. Dagegen sollte MIK665 deutlich besser wirken als ohne Bcl-2-siRNA.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Zelltodanalyse nach einer 48-stündigen Behandlung mit siRNA, gefolgt von einer 24-stündigen Behandlung mit ABT-199 oder MIK665. In diesen Experimenten wurden feste Konzentrationen von 5  $\mu$ M ABT-199 bzw. 6  $\mu$ M MIK665 verwendet, da diese die jeweils höchste relevante Konzentration in den Kombinationsbehandlungen darstellen. Höhere Dosen kamen in einzelnen Experimenten zum Einsatz, spielen jedoch für die Kombinationstherapie eine untergeordnete Rolle. Bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M ABT-199 oder 6  $\mu$ M MIK665 wurde eine deutliche Induktion des Zelltods beobachtet, wenn das zweite Therapeutikum in wesentlich geringerer Konzentration zugegeben wurde. Daher wurden auch in dieser Versuchsreihe 5  $\mu$ M ABT-199 und 6  $\mu$ M MIK665 verwendet.

Zellen, die zuvor mit Mcl-1-siRNA behandelt wurden, sprachen im Vergleich zu der Behandlung mit Kontroll-siRNA deutlich auf ABT-199 an (Abbildung 16). Es wurden spezifische Zelltodraten von 45,5% (Mcl-1-siRNA Nr. 1) und 67,6% (Mcl-1-siRNA Nr. 2) induziert. MIK665 induzierte mit 20,0% (Mcl-1-siRNA Nr. 1) bzw. 13,9% (Mcl-1-siRNA Nr. 2) spezifischem Zelltod deutlich weniger Zelltod. Diese Effekte waren bei siRNA Nr. 2 (Mcl-1) ausgeprägter: Im Vergleich zu siRNA Nr. 1 wurde weniger Zelltod bei Behandlung mit MIK665, aber mehr Zelltod bei Behandlung mit ABT-199 gemessen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass bei Nr. 2 weniger Mcl-1 im Western Blot detektiert wurde. Dies spricht dafür, dass MIK665 durch Inhibition von Mcl-1 und nicht durch Off-target Effekte wirkt.

Zellen, die mit Bcl-2-siRNA behandelt wurden, reagierten mit 16,4 % (Bcl-2-siRNA Nr. 1) bzw. 16,8 % (Bcl-2-siRNA Nr. 2) spezifischem Zelltod ähnlich sensitiv auf ABT-199 wie Mcl-1-siRNA-behandelte Zellen auf MIK665. Die zusätzliche Zugabe von MIK665 zu mit Bcl-2-siRNA vorbehandelten Zellen führte zu einem verstärkten Zelltod von 32,8 % (Bcl-2-siRNA Nr. 1) bzw. 26,9 % (Bcl-2-siRNA Nr. 2) im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Da der Knockdown von Bcl-2 nur partiell war, fielen die Effekte weniger stark aus als bei der Mcl-1-siRNA. Die Ergebnisse bestätigen, dass ABT-199 seine Wirkung durch die gezielte Inhibition von Bcl-2 entfaltet.

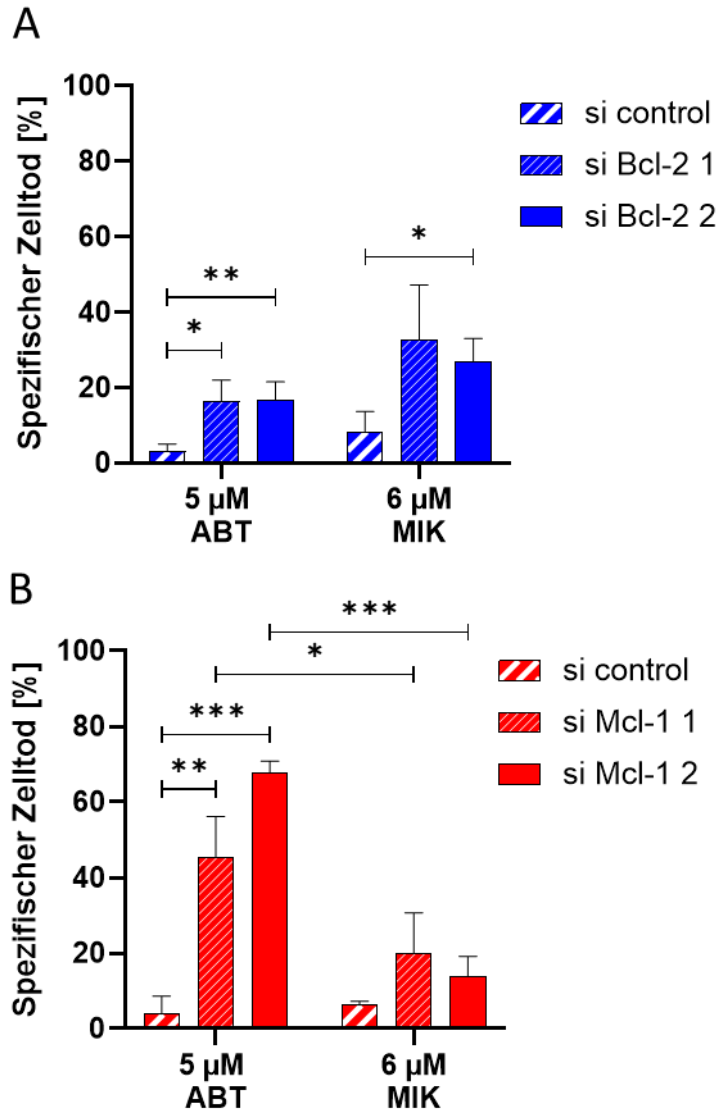
## Ergebnisse



**Abbildung 15: Knockdown von Bcl-2 und Mcl-1 mittels siRNA**

HepG2 Zellen wurden mit siRNA behandelt, um einen Knockdown von Mcl-1 (A, B, E) oder Bcl-2 (C, D, F) zu erreichen. 48 und 72 h nach der Behandlung wurden Zelllysate hergestellt. A-D zeigen repräsentative Western Blots. E und F zeigen die quantitative Auswertung der Proteingehalte in Relation zu  $\beta$ -Actin. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n=3$ ,  $MW \pm SD$

## Ergebnisse



**Abbildung 16: Untersuchung von Off-Target Effekten nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665**

HepG2 Zellen wurden mit siRNA behandelt, um einen Knockdown von Bcl-2 oder Mcl-1 zu erreichen. Nach 48 h wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M ABT-199 oder 6  $\mu$ M MIK665 behandelt. Nach weiteren 24 h wurde der Zelltod mittels Durchflusszytometrie bestimmt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , MW  $\pm$  SD

## 4 Diskussion

Obwohl die Haupt-Risikofaktoren für die Pathogenese von Leberzellkarzinomen (HCC) bekannt sind, bleiben die Inzidenz- und Mortalitätsraten des HCC hoch (2, 163, 164). In Nordamerika und Europa werden mehr als 60% der HCC erst in intermediären (BCLC-B und -C) oder fortgeschrittenen Stadien (BCLC-C und -D) diagnostiziert (165). Trotz jüngster Entwicklungen, die zu neuen Behandlungsmöglichkeiten geführt haben, ist die Prognose im fortgeschrittenen Stadium ungünstig (30). Die Kombination von Atezolizumab und Bevacizumab als Erstlinientherapie für das HCC verbesserte die mediane Gesamtüberlebensrate (auf 19,2 Monate) und das progressionsfreie Überleben (auf 6,8 Monate im Vergleich zu 4,3 Monaten zu einer Behandlung mit Sorafenib) (38). 2022 wurden die Immuncheckpoint-Inhibitoren Tremelimumab (Anti-CTLA-4) und Durvalumab (Anti-PD-L1) als weiteres Kombinationsregime in der Erstlinientherapie von der FDA und EMA zugelassen. Diese Behandlung verbesserte das mediane Gesamtüberleben auf 16,4 Monate im Vergleich zu 13,8 Monate bei einer Behandlung mit Sorafenib, wie in der HIMALAYA-Studie gezeigt (40). Die Kombinationstherapie aus Ipilimumab, einem CTLA-4-neutralisierenden Antikörper, mit Nivolumab, einem PD-1-neutralisierenden Antikörper, zeigte einen Überlebensvorteil gegenüber Sorafenib/Lenvatinib in der CheckMate-9DW Studie (NCT04039607) (42) und wurde daraufhin vom Ausschuss für Humanarzneimittel (engl.: Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für die Erstlinienbehandlung erwachsener Patientinnen und Patienten mit inoperablem oder fortgeschrittenem hepatozellulärem Karzinom (HCC) empfohlen (43). In der LEAP-002-Studie zeigte die Kombination aus Lenvatinib mit Pembrolizumab vielversprechende antitumorale Aktivität mit einem medianen Gesamtüberleben von 21,2 Monaten (47).

Trotz dieser Fortschritte haben bestehende Therapien nach wie vor niedrige Gesamtansprechraten, und die meisten Patientinnen und Patienten weisen eine Progression der Tumorerkrankung auf. Daher werden dringend neue Optionen für eine Behandlung benötigt, wenn Patientinnen und Patienten nicht mehr auf bestehende Therapien ansprechen (3).

BH3-Mimetika inhibieren anti-apoptotische BCL-2-Proteine und gelten als vielversprechende Substanzen für die Tumorthherapie. Durch ihre Wirkung verschieben sie das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2-

## Diskussion

Familie am Mitochondrium in Richtung Apoptose. In empfindlichen Zellen können sie gezielt den programmierten Zelltod auslösen. Dabei sind sie unabhängig von intakten vorgeschalteten Signalwegen wie p53 oder Wachstumsfaktorrezeptoren, sodass Mutationen in diesen Signalwegen umgangen werden. Entscheidend für ihre Effektivität ist jedoch das Verhältnis und die Interaktion der pro- und anti-apoptotischen BCL-2-Proteine (166).

BH3-Mimetika werden derzeit in verschiedenen (prä-)klinischen Studien in verschiedenen Tumorentitäten untersucht (z.B. NCT04771572, NCT03537482) (167). Eine mögliche Kombination besteht aus dem selektiven Bcl-2 Inhibitor ABT-199 und dem selektiven Mcl-1 Inhibitor MIK665. ABT-199 ist schon in klinischer Anwendung, unter anderem in CLL und AML (168). Es wird von Patientinnen und Patienten mit CLL oder AML besser toleriert als Chemo-Immunotherapie (169).

MIK665 wurde bereits in klinischen Studien getestet, z.B. für die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit Rezidiv oder Therapieresistenz bei Lymphom oder Multiplem Myelom (NCT02992483, klinische Studie Phase I) und bei Betroffenen mit AML (NCT04629443, klinische Studie Phase I/II), sowie in Kombination mit Venetoclax in AML (NCT03672695). Eine aktuelle klinische Studie untersucht S227928, alleine und in Kombination mit Venetoclax bei Patientinnen und Patienten mit AML, Myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) (NCT06563804). S227928 ist ein Chemoimmunkonjugat (engl.: Antibody-drug conjugate, ADC), das MIK665 mit einem monoklonalen anti-CD74 Antikörper verbindet. MIK665 zeigte in diesen Studien zwar nur eine begrenzte Wirksamkeit. Dennoch bleibt es aufgrund seines Wirkmechanismus ein vielversprechender Kandidat für weiterführende Untersuchungen, insbesondere in Kombinationstherapien oder optimierten Behandlungsstrategien (115).

Sowohl Mcl-1 als auch Bcl-2 spielen im HCC eine wichtige Rolle: Im HCC ist insbesondere Mcl-1 überexprimiert (123). Die Inhibition von Bcl-2 erhöht die Chemosensitivität von HCC Zellen (129). Im Verhältnis zu pro-apoptotischen Molekülen wird im HCC viel Bcl-2 exprimiert (127).

Die Kombination zweier selektiver BH3-Mimetika für Bcl-2 und Mcl-1 wurde bisher noch nicht im HCC getestet. Das Ziel dieser Arbeit und der übergeordneten Studie (78) war, zu untersuchen, ob HCC-Zelllinien auf eine Kombination aus ABT-199 und MIK665 ansprechen, um Hinweise darauf zu erlangen, ob BH3-Mimetika zur Therapie des HCC Anwendung finden könnten.

## Diskussion

Die in dieser Doktorarbeit präsentierten Daten zeigen, dass die gleichzeitige Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 durch BH3-Mimetika in HepG2 Zellen Apoptose auslöst. Dies äußert sich in der Freisetzung von Cytochrom c, der Spaltung und Aktivierung der Initiator-Caspase 9 und der Effektor-Caspase 3 sowie der Spaltung des Todessubstrats PARP.

ABT-199 und MIK665 zeigten einzeln nur eine geringe Wirkung in HepG2 Zellen. In Kombination induzierten sie allerdings effektiv Apoptose. Die beiden Therapeutika wirkten synergistisch. Dies ist insbesondere in Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung relevant. Durch eine gemeinsame Gabe beider Medikamente kann die Wirkung deutlich verbessert werden. Das steigert die Chance auf ein gutes Ansprechen. Zudem ermöglicht die Kombinationstherapie eine Reduktion der jeweiligen Medikamentendosen im Vergleich zur Monotherapie, was das Risiko potenzieller Nebenwirkungen verringert.

Da ABT-199 bereits zugelassen ist und angewandt wird, gibt es hier klinische Daten zur Plasmakonzentration. Nach Erreichen des Steady-States liegt die maximale Plasmakonzentration nach täglicher Einnahme von 400 mg Venetoclax im Schnitt bei  $2.1 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$  entsprechend  $2,4 \mu\text{M}$ . Es werden Therapieschemata mit bis zu 600 mg Venetoclax täglich empfohlen, sodass die Serumkonzentration ggf. etwas höher ist (107).

Da MIK665 noch nicht zugelassen ist, gibt es dazu kaum zuverlässige Daten. In einer Studie von Novartis (NCT02992483) wurde die maximale Plasmakonzentration bei wöchentlicher Gabe MIK665 bestimmt. An Tag 15 des Zyklus' betrug die maximale Plasmakonzentration im Schnitt zwischen  $3,02 \mu\text{g/ml}$  bei Gabe von 50 mg MIK665 einmal wöchentlich und  $25,9 \mu\text{g/ml}$  bei Gabe von 300 mg MIK665, entsprechend  $3,45 \mu\text{M} - 29,59 \mu\text{M}$ .

Die meisten der vorgestellten Experimente wurden mit zwei Konzentrationsreihen durchgeführt: einer festen ABT-199-Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  und ansteigender MIK665-Konzentration sowie einer festen MIK665-Konzentration von  $6 \mu\text{M}$  und ansteigender ABT-199-Konzentration. Diese Konzentrationen wurden in der Publikation für Experimente mit Hep3B und Huh7 verwendet (78). Zur besseren Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit kamen sie daher auch in den Experimenten mit HepG2 zum Einsatz. Das starke Ansprechen der HepG2 Zellen auf die Kombinationstherapie führte insbesondere bei der festen ABT-199-Konzentration zu hohen Konzentrationsunterschieden zwischen beiden Medikamenten. Die IC50-Werte

## Diskussion

lagen nach 24 Stunden bei 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und 0,025  $\mu\text{M}$  MIK665 und nach 48 Stunden bei 5  $\mu\text{M}$  ABT-199 und 0,015  $\mu\text{M}$  MIK665. Angesichts der ausgeprägten Wirkung der Kombinationstherapie und der nachgewiesenen Synergie wäre es künftig sinnvoll, die Konzentrationen beider Medikamente gleichzeitig zu reduzieren, anstatt nur die Dosis eines Wirkstoffs zu variieren. Weitere Experimente sollten untersuchen, ob auch mit reduzierten Konzentrationen beider Substanzen Apoptose induziert werden kann. Dies könnte ermöglichen, die Medikamente in niedrigeren, klinisch erreichbaren Dosen zu verabreichen und potenzielle Nebenwirkungen zu minimieren.

Die synergistische Wirkung von ABT-199 und MIK665 deutet darauf hin, dass das zelluläre Überleben von HepG2 Zellen sowohl von Bcl-2 als auch von Mcl-1 abhängt. In Zellen, die von mehreren BCL-2 Molekülen abhängig sind, sind nicht unbedingt alle davon überexprimiert (170). Es ist somit nicht möglich, direkt aus den Expressionsmustern einzelner BCL-2 Molekülen auf das Ansprechen auf Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen BH3-Mimetika zu schließen (94). Ein Zusammenhang ist dennoch erkennbar: Im Vergleich der drei in unserer Studie untersuchten Zelllinien HepG2, Hep3B und Huh7 wiesen HepG2 und Hep3B eine erhöhte Expression mindestens eines der inhibierten Proteine auf – HepG2 zeigte eine hohe Bcl-2-Expression, während Hep3B viel Mcl-1 exprimierten. Beide Zelllinien reagierten deutlich auf die Kombinationstherapie (78). Im Gegensatz dazu exprimierten Huh7 Zellen nur geringe Mengen beider BCL-2-Familienmitglieder. Huh7 Zellen sprachen deutlich schlechter auf die Kombinationsbehandlung aus ABT-199 und MIK665 an als die beiden anderen Zelllinien. Insbesondere bei HepG2 genügte in der Kombination geringe Dosen, um Zelltod zu induzieren (78). Das lässt vermuten, dass Huh7 weniger von anti-apoptotischen BCL-2 Molekülen als Überlebenssignalweg abhängen als HepG2 und Hep3B, und dass ein Zusammenhang zwischen Ansprechen und Expression besteht. Unabhängig von den Unterschieden zeigten alle Zelllinien synergistische Effekte. Ähnliche Synergien durch die Kombination von ABT-199 und MIK665 wurden auch in verschiedenen Melanom-Zelllinien beobachtet (120).

Die hier beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass das Ansprechen auf die Kombinationstherapie nicht von der Expression des dritten wichtigen anti-apoptotischen BCL-2-Proteins, Bcl-XL, abhängt. HepG2 Zellen, die vergleichsweise hohe Bcl-XL-Spiegel aufwiesen, reagierten am besten auf die Behandlung (78).

HCC-Zellen überexprimieren anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 oder Mcl-1 in heterogener Weise (102). Die Auswahl von Patientinnen und Patienten mit

## Diskussion

spezifischen Expressionsmustern oder die Testung der Ansprechbarkeit vor der Behandlung mittels BH3-Profilung könnte die Behandlungserfolgsquote signifikant erhöhen (171). Darüber hinaus könnten BH3-Mimetika verwendet werden, um die Wirksamkeit der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) bei der Behandlung von HCC im intermediären Stadium zu verbessern (34, 172, 173). Die Kombination mit dieser lokalen Behandlung könnte die benötigte Inhibitor-Konzentration reduzieren.

BH3-Mimetika umgehen Mutationen in den vorgeschalteten Signalwegen. Sowohl ABT-199 als auch MIK665 induzieren Apoptose in Zellen ohne intakten p53-Tumorsuppressorweg (113, 174). Dieses Ergebnis konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden (78). Die Kombinationstherapie zeigte Wirkung sowohl in HepG2 Zellen mit Wildtyp-p53 als auch in Huh7 Zellen mit mutiertem p53 und Hep3B Zellen, die kein p53 exprimieren (78). Mutationen des p53 treten bei 25–30% der Betroffenen mit HCC auf und führen zu kürzeren medianen OS- und rezidivfreien Überlebenszeiten im Vergleich zu Betroffenen mit Wildtyp-p53 (54, 175, 176). Die Verwendung von BH3-Mimetika umgeht p53-Mutationen erfolgreich, um Apoptose zu induzieren und bietet somit auch die Möglichkeit, Patientinnen und Patienten mit mutiertem oder deletiertem p53 zu behandeln.

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten, dass die kombinierte Hemmung von Bcl-2 und Mcl-1 durch BH3-Mimetika synergistisch Apoptose in HCC-Zellen auslöst. Dieser Ansatz eröffnet neue Perspektiven für die systemische Behandlung des HCC: Durch die Kombination beider Wirkstoffe kann einer Resistenzentwicklung entgegengewirkt und die Medikamentendosis gesenkt werden, wodurch das Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen reduziert wird. Die hier vorgestellte Strategie könnte daher einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung neuer Therapieoptionen für das HCC darstellen.

## 5 Ausblick

Die eingesetzten Konzentrationen der beiden Medikamente unterschieden sich deutlich: Während eines der BH3-Mimetika in hoher Dosis verabreicht wurde, wurde das andere heruntertitriert. Zukünftige Experimente sollten untersuchen, ob vergleichbare Effekte auch bei einer angepassten, gleichmäßigen Reduktion beider Substanzen erzielt werden können. Dies könnte helfen, klinisch unverträgliche Dosierungen zu vermeiden und die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Kombinationstherapie sicher beim HCC eingesetzt werden kann.

Neben der hier getesteten Kombination könnten auch andere Kombinationen aus spezifischen BH3-Mimetika in HCC-Zelllinien getestet werden. Neben Mcl-1 ist im HCC auch Bcl-XL häufig überexprimiert (124, 125). Dementsprechend erscheint insbesondere die Kombination aus Inhibitoren, welche spezifisch für Mcl-1 und Bcl-XL sind, vielversprechend, wenn es gelingt, klinisch sichere Bcl-XL Inhibitoren zu entwickeln bzw. sehr niedrige Dosen einzusetzen.

Untersuchungen an Zelllinien liefern zwar wertvolle erste Hinweise auf die Anwendbarkeit einer Therapie, können jedoch die komplexen Bedingungen in Patientinnen und Patienten nicht vollständig widerspiegeln. Insbesondere fehlt die natürliche Mikroumgebung, die das Tumorstadium und das Ansprechen auf Behandlungen maßgeblich beeinflussen kann (177). Ein nächster wichtiger Schritt wäre daher die Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen Kombinationstherapie in präklinischen Tiermodellen für das HCC.

Das Expressionsprofil der BCL-2-Proteine variiert nicht nur zwischen verschiedenen Tumorarten, sondern auch innerhalb derselben Tumorentität. Entsprechend zeigt auch das HCC eine heterogene Expression dieser Moleküle (54, 178). Ein vielversprechender Ansatz wäre, Expressionsprofile zu identifizieren, die das Ansprechen auf eine Behandlung mit BH3-Mimetika vorhersagen können. Biopsien der Tumore könnten vor dem Beginn der Behandlung auf die Expression hin untersucht werden, um im Voraus abschätzen zu können, ob Patientinnen und Patienten auf eine Behandlung ansprechen.

## 6 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten und tödlichsten Tumorerkrankungen. Trotz moderner Therapieansätze, darunter Immuncheckpoint-Inhibitoren und Anti-VEGF-Antikörper, bleibt die Prognose insbesondere in fortgeschrittenen Stadien schlecht. Resistenzen gegenüber etablierten Behandlungen begrenzen die therapeutische Wirksamkeit und unterstreichen den Bedarf an innovativen Strategien zur gezielten Induktion von Zelltod in HCC-Zellen.

Ein zentraler Mechanismus der Tumorprogression ist die Apoptoseresistenz, vermittelt durch die Überexpression anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (insbesondere Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-XL). Die gezielte Hemmung dieser Proteine durch sogenannte BH3-Mimetika stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Während ABT-199 (ein selektiver Bcl-2-Inhibitor) bereits für hämatologische Neoplasien zugelassen ist, ist seine Wirkung in soliden Tumoren wie dem HCC noch wenig untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der kombinierten Hemmung von Bcl-2 und Mcl-1 durch ABT-199 und MIK665 in der HCC-Zelllinie HepG2. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Substanzen als Monotherapie nur in hohen Konzentrationen Apoptose induzieren. In Kombination führten sie jedoch bereits in deutlich geringeren Konzentrationen zu einer ausgeprägten und synergistischen Zelltodinduktion. Dieser Effekt war durch die Freisetzung von Cytochrom c, den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (MOMP), die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 sowie die verstärkte Spaltung von PARP charakterisiert.

Die Kombinationstherapie zeigte eine dosisabhängige Wirkung. Die Berechnung der IC50-Werte und des Combination Index (CI) nach Chou et al. belegte eine starke Synergie. Durch die gleichzeitige Inhibition von Bcl-2 und Mcl-1 konnten Kompensationsmechanismen innerhalb der BCL-2-Familie überwunden und die benötigten Wirkstoffkonzentrationen reduziert werden – ein potenzieller Vorteil im Hinblick auf Nebenwirkungsprofile.

## Zusammenfassung

Zur Validierung des therapeutischen Potenzials sollten zukünftige Studien eine Optimierung der Dosierung sowie die Kombination mit weiteren BH3-Mimetika oder bestehenden HCC-Therapien prüfen, beispielsweise im Rahmen der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) oder zur Überwindung von Resistenzen gegenüber bisher zugelassenen Therapien.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass die simultane Hemmung von Bcl-2 und Mcl-1 eine effektive Strategie zur Apoptoseinduktion im HCC darstellt und neue Perspektiven für die Weiterentwicklung zielgerichteter Therapien eröffnen könnte.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	25
Tabelle 2: Verwendete Antikörper .....	25
Tabelle 3: Verwendete siRNA.....	27
Tabelle 4: Verwendete Reagenzsysteme .....	27
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Reagenzien .....	27
Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	29
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	30
Tabelle 8: Verwendete Software.....	31

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapieschema bei Hepatozellulärem Karzinom nach BCLC .....	8
Abbildung 2: BH3-Mimetika induzieren intrinsische Apoptose.....	15
Abbildung 3: Expression der BCL-2 Moleküle Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-XL .....	40
Abbildung 4: Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch ABT-199 und MIK665 .....	41
Abbildung 5: Caspase 9 Aktivität und Spaltung nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	43
Abbildung 6: Caspase 3/7 Aktivität nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	45
Abbildung 7: Spaltung von Caspase 3 und PARP nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	46
Abbildung 8: Viabilität nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	47
Abbildung 9: Scatterplots der Durchflusszytometrie .....	50
Abbildung 10: Zelltod bei Behandlung mit nur einem BH3-Mimetikum .....	51
Abbildung 11: Zelltod nach Behandlung mit einer Kombination aus ABT-199 und MIK665 .....	52
Abbildung 12: Synergismus von ABT-199 und MIK665 in HepG2.....	54
Abbildung 13: Einfluss des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-fmk auf die Aktivierung der Effektorcaspasen nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	55
Abbildung 14: Einfluss des Pan-Caspase Inhibitors zVAD-fmk auf die Induktion von Zelltod durch ABT-199 und MIK665 .....	56
Abbildung 15: Knockdown von Bcl-2 und Mcl-1 mittels siRNA .....	59

## Anhang

Abbildung 16: Untersuchung von Off-Target Effekten nach Behandlung mit ABT-199 und MIK665 .....	60
---	----

## 8 Literatur

1. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology* 2017; 152(4):745–61. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7(1):6. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
4. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024; 74(3):229–63. doi: 10.3322/caac.21834.
5. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol* 2017; 3(12):1683–91. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.3055.
6. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *International journal of cancer* 2020; 147(2):317–30. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7470451/>.
7. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* 2020; 159(1):335-349.e15. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32247694/>.
8. Amini M, Looha MA, Zarean E, Pourhoseingholi MA. Global pattern of trends in incidence, mortality, and mortality-to-incidence ratio rates related to liver cancer, 1990-2019: a longitudinal analysis based on the global burden of disease study.

- BMC Public Health 2022; 22(1):604. Verfügbar unter:  
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12889-022-12867-w>.
9. Runggay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabasag CJ, Vignat J et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol* 2022; 77(6):1598–606. doi: 10.1016/j.jhep.2022.08.021.
  10. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127(5 Suppl 1):S35-50. doi: 10.1053/j.gastro.2004.09.014.
  11. Llovet JM, Pinyol R, Kelley RK, El-Khoueiry A, Reeves HL, Wang XW et al. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer* 2022; 3(4):386–401. doi: 10.1038/s43018-022-00357-2.
  12. Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet* 2021; 398(10308):1359–76. Verfügbar unter:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34543610/>.
  13. Liu Y, Zheng J, Hao J, Wang RR, Liu X, Gu P et al. Global burden of primary liver cancer by five etiologies and global prediction by 2035 based on global burden of disease study 2019. *Cancer Med* 2022; 11(5):1310–23. doi: 10.1002/cam4.4551.
  14. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018; 67(1):123–33. doi: 10.1002/hep.29466.
  15. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14(1):124-31.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.019.
  16. Desai A, Sandhu S, Lai J-P, Sandhu DS. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* 2019; 11(1):1–18. doi: 10.4254/wjh.v11.i1.1.
  17. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 2015; 19(2):223–38. doi: 10.1016/j.cld.2015.01.001.

18. Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28(5):753–70. doi: 10.1016/j.bpg.2014.08.007.
19. Tümen D, Heumann P, Gülow K, Demirci C-N, Cosma L-S, Müller M et al. Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* 2022; 10(12). doi: 10.3390/biomedicines10123202.
20. Huang DQ, Mathurin P, Cortez-Pinto H, Loomba R. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023; 20(1):37–49. doi: 10.1038/s41575-022-00688-6.
21. Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13(12):2140–51. doi: 10.1016/j.cgh.2015.08.014.
22. Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, Ward JW, Jemal A, Sherman RL et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer* 2016; 122(9):1312–37. Verfügbar unter: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.29936>.
23. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med* 2016; 67:103–17. doi: 10.1146/annurev-med-090514-013832.
24. Petrick JL, McGlynn KA. The changing epidemiology of primary liver cancer. *Curr Epidemiol Rep* 2019; 6(2):104–11. doi: 10.1007/s40471-019-00188-3.
25. Lobstein T BH. Obesity: missing the 2025 global targets: Trends, costs and country reports. Verfügbar unter: <https://data.worldobesity.org/publications/WOF-Missing-the-2025-Global-Targets-Report-FINAL-WEB.pdf>.
26. RKI. Ständige Impfkommision: Impfkalender 2025 [Stand: 12.03.2025]. Verfügbar unter: [https://www.rki.de/DE/Themen/Infektionskrankheiten/Impfen/Staendige-Impfkommision/Empfehlungen-der-STIKO/Empfehlungen/Impfkalender.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=6](https://www.rki.de/DE/Themen/Infektionskrankheiten/Impfen/Staendige-Impfkommision/Empfehlungen-der-STIKO/Empfehlungen/Impfkalender.pdf?__blob=publicationFile&v=6).

27. Langer T. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome [Stand: 02.11.2025]. Verfügbar unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/Version\\_5/LL\\_Hepatozellul%C3%A4res\\_Karzinom\\_und\\_bili%C3%A4re\\_Karzinome\\_Kurzversion\\_5.2.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/Version_5/LL_Hepatozellul%C3%A4res_Karzinom_und_bili%C3%A4re_Karzinome_Kurzversion_5.2.pdf).
28. Odenwald MA, Paul S. Viral hepatitis: Past, present, and future. *World J Gastroenterol* 2022; 28(14):1405–29. doi: 10.3748/wjg.v28.i14.1405.
29. Bruno Sangro, Josepmaria Argemi, Maxime Ronot, Valerie Paradis, Tim Meyer, Vincenzo Mazzaferro et al. EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2025; 82(2):315–74. Verfügbar unter: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(24\)02508-X/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(24)02508-X/fulltext).
30. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* 2022; 76(3):681–93. doi: 10.1016/j.jhep.2021.11.018.
31. Park J-W, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P-J et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int* 2015; 35(9):2155–66. doi: 10.1111/liv.12818.
32. SEER\*Explorer Application; 2025 [Stand: 28.04.2025]. Verfügbar unter: [https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=35&data\\_type=1&graph\\_type=2&compare\\_By=stage&chk\\_stage\\_104=104&chk\\_stage\\_105=105&chk\\_stage\\_106=106&chk\\_stage\\_107=107&hdn\\_rate\\_type=1&sex=1&race=1&age\\_range=1&advopt\\_precision=1&advopt\\_show\\_ci=on&hdn\\_view=0&advopt\\_display=1](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=35&data_type=1&graph_type=2&compare_By=stage&chk_stage_104=104&chk_stage_105=105&chk_stage_106=106&chk_stage_107=107&hdn_rate_type=1&sex=1&race=1&age_range=1&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_display=1).
33. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2018; 391(10125):1023–75. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.

34. Chang Y, Jeong SW, Young Jang J, Jae Kim Y. Recent Updates of Transarterial Chemoembolization in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21). doi: 10.3390/ijms21218165.
35. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359(4):378–90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857.
36. Yau T, Park J-W, Finn RS, Cheng A-L, Mathurin P, Edeline J et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2022; 23(1):77–90. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00604-5.
37. Cheng A-L, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y et al. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: Atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2022; 76(4):862–73. doi: 10.1016/j.jhep.2021.11.030.
38. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2020; 382(20):1894–905. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32402160/>.
39. Liu X, Lu Y, Qin S. Atezolizumab and bevacizumab for hepatocellular carcinoma: mechanism, pharmacokinetics and future treatment strategies. *Future Oncol* 2021; 17(17):2243–56. doi: 10.2217/fo-2020-1290.
40. Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, Chan SL, Kelley RK, Furuse J et al. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evidence* 2022; 1(8). doi: 10.1056/EVIDoa2100070.
41. Kelley RK, Sangro B, Harris W, Ikeda M, Okusaka T, Kang Y-K et al. Safety, Efficacy, and Pharmacodynamics of Tremelimumab Plus Durvalumab for Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Randomized Expansion of a Phase I/II Study. *J Clin Oncol* 2021; 39(27):2991–3001. doi: 10.1200/JCO.20.03555.
42. Decaens T, Yau T, Kudo M, Sangro B, Qin S, Da Fonseca L et al. 965MO Nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) vs lenvatinib (LEN) or sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment for unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC): Expanded analyses from CheckMate 9DW. *Annals of Oncology* 2024; 35:S657 [Stand: 12.03.2025]. Verfügbar unter:

## Anhang

<https://www.annalsofoncology.org/action/showPdf?pii=S0923-7534%2824%2902544-4>.

43. European Medicines Agency (EMA). Opdivo | European Medicines Agency (EMA); 2025 [Stand: 19.04.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>.
44. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* 2018; 391(10126):1163–73. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
45. Gauthier A, Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatol Res* 2013; 43(2):147–54. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01113.x.
46. Al-Salama ZT, Syed YY, Scott LJ. Lenvatinib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs* 2019; 79(6):665–74. doi: 10.1007/s40265-019-01116-x.
47. Llovet JM, Kudo M, Merle P, Meyer T, Qin S, Ikeda M et al. Lenvatinib plus pembrolizumab versus lenvatinib plus placebo for advanced hepatocellular carcinoma (LEAP-002): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2023; 24(12):1399–410. doi: 10.1016/S1470-2045(23)00469-2.
48. Sangro B, Kudo M, Erinjeri JP, Qin S, Ren Z, Chan SL et al. Durvalumab with or without bevacizumab with transarterial chemoembolisation in hepatocellular carcinoma (EMERALD-1): a multiregional, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2025; 405(10474):216–32. doi: 10.1016/S0140-6736(24)02551-0.
49. ctv.veeva.com. IMMULAB - Immunotherapy With Pembrolizumab in Combination With Local Ablation in Hepatocellular Carcinoma (HCC); 2025 [Stand: 12.03.2025].
50. DGVS - Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Hepatozelluläres Karzinom und biliäre Karzinome - DGVS - Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten; 2023 [Stand: 24.02.2023]. Verfügbar unter: <https://www.dgvs.de/wissen/leitlinien/leitlinien-dgvs/hepatozellulaeres-karzinom/>.

51. Bruix J, Chan SL, Galle PR, Rimassa L, Sangro B. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: An EASL position paper. *J Hepatol* 2021; 75(4):960–74. doi: 10.1016/j.jhep.2021.07.004.
52. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51(4):1274–83. doi: 10.1002/hep.23485.
53. Nault J-C, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(9):544–58. doi: 10.1038/s41575-019-0165-3.
54. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015; 47(5):505–11. doi: 10.1038/ng.3252.
55. Xu C, Xu Z, Zhang Y, Evert M, Calvisi DF, Chen X.  $\beta$ -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2022; 132(4). doi: 10.1172/JCI154515.
56. Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Romero MR, Asensio M, Sanchez-Martin A et al. Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020; 12(6). doi: 10.3390/cancers12061663.
57. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021; 1876(1):188556. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188556.
58. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017; 8(5):8921–46. doi: 10.18632/oncotarget.13475.
59. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013; 15(1):2–8. doi: 10.1038/ncb2641.
60. Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15(5):513–20. doi: 10.3748/wjg.15.513.
61. Moreno-Càceres J, Fabregat I. Apoptosis in liver carcinogenesis and chemotherapy. *Hepat Oncol* 2015; 2(4):381–97. doi: 10.2217/hep.15.27.

62. Mott JL, Gores GJ. Piercing the armor of hepatobiliary cancer: Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetics and cell death. *Hepatology* 2007; 46(3):906–11. Verfügbar unter: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21812>.
63. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018; 25(3):486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
64. Moon H, Ro SW. MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021; 13(12). doi: 10.3390/cancers13123026.
65. Vitale I, Pietrocola F, Guilbaud E, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D et al. Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death & Differentiation* 2023; 30(5):1097–154. doi: 10.1038/s41418-023-01153-w.
66. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1544388>.
67. Krammer PH, Kamiński M, Kiessling M, Gülow K. No life without death. *Adv Cancer Res* 2007; 97:111–38. doi: 10.1016/S0065-230X(06)97005-5.
68. Hapko L, Strasser A, Cory S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 5):1081–7. doi: 10.1242/jcs.090514.
69. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis* 2023; 28(1-2):20–38. doi: 10.1007/s10495-022-01780-7.
70. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999; 13(24):3179–84. Verfügbar unter: <http://genesdev.cshlp.org/content/13/24/3179>.
71. Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO, Bratton SB. The Apaf-1\*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J* 2009; 28(13):1916–25. doi: 10.1038/emboj.2009.152.

72. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 2017; 24(8):1380–9. doi: 10.1038/cdd.2017.44.
73. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 2):265–7. doi: 10.1242/jcs.01610.
74. Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol* 2014; 545:35–65. doi: 10.1016/B978-0-12-801430-1.00002-0.
75. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407(6805):789–95. doi: 10.1038/35037728.
76. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 2000; 102(1):33–42. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00008-8.
77. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE et al. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 2000; 102(1):43–53. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00009-x.
78. Michalski M, Bauer M, Walz F, Tümen D, Heumann P, Stöckert P et al. Simultaneous Inhibition of Mcl-1 and Bcl-2 Induces Synergistic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* 2023; 11(6). doi: 10.3390/biomedicines11061666.
79. Iksen, Witayateeraporn W, Hardianti B, Pongrakhananon V. Comprehensive review of Bcl-2 family proteins in cancer apoptosis: Therapeutic strategies and promising updates of natural bioactive compounds and small molecules. *Phytother Res* 2024. doi: 10.1002/ptr.8157.
80. King LE, Hohorst L, García-Sáez AJ. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond. *J Cell Sci* 2023; 136(22). doi: 10.1242/jcs.260790.
81. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1):49–63. doi: 10.1038/nrm3722.
82. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ* 2018; 25(1):27–36. doi: 10.1038/cdd.2017.161.

83. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 2000; 10(19):1201–4. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00728-4.
84. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007; 129(7):1337–49. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.027.
85. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7(3):683–94. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00214-3.
86. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288(5468):1053–8. doi: 10.1126/science.288.5468.1053.
87. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94(4):481–90. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81589-5.
88. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20(3):175–93. doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
89. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation* 2018; 25(1):65–80. doi: 10.1038/cdd.2017.186.
90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
91. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022; 12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
92. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30(1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
93. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-

- 737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007; 12(2):171–85. doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.001.
94. Soderquist RS, Crawford L, Liu E, Lu M, Agarwal A, Anderson GR et al. Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. *Nat Commun* 2018; 9(1):3513. doi: 10.1038/s41467-018-05815-z.
95. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 1998; 188(11):2033–45. doi: 10.1084/jem.188.11.2033.
96. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302(5647):1036–8. doi: 10.1126/science.1090072.
97. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* 2014; 4:285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285.
98. Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell* 2018; 34(6):879–91. doi: 10.1016/j.ccell.2018.11.004.
99. Delbridge ARD, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015; 22(7):1071–80. doi: 10.1038/cdd.2015.50.
100. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435(7042):677–81. doi: 10.1038/nature03579.
101. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(4):273–84. doi: 10.1038/nrd.2016.253.
102. D'Aguzzo S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells* 2020; 9(5). doi: 10.3390/cells9051287.
103. Townsend PA, Kozhevnikova MV, Cexus ONF, Zamyatnin AA, Soond SM. BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40(1):355. doi: 10.1186/s13046-021-02157-5.

## Anhang

104. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; 19(2):202–8. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nm.3048>.
105. Venetoclax (Venclexta) Tablets. FDA <time datetime="2019-02-09T01:50:30Z">Sat, 09.02.2019 - 01:50</time> [Stand: 07.03.2022].
106. Deeks ED. Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* 2016; 76(9):979–87. doi: 10.1007/s40265-016-0596-x.
107. FDA Medication Guide Venclexta; 2021 [Stand: 14.03.2025]. Verfügbar unter: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/208573s026lbl.pdf#page=54](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208573s026lbl.pdf#page=54).
108. Venclyxto | European Medicines Agency; 2022 [Stand: 22.10.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/venclyxto>.
109. Diepstraten ST, Anderson MA, Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Kelly GL. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nat Rev Cancer* 2022; 22(1):45–64. doi: 10.1038/s41568-021-00407-4.
110. ClinicalTrials.gov. Abt-199, Recruiting, Active, not recruiting studies | Card Results | ClinicalTrials.gov; 2025 [Stand: 24.04.2025]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=abt-199&aggFilters=status:act%20rec&page=1>.
111. Ioanna Ploumaki, Efthymios Triantafyllou, Ioannis-Alexios Koumprentziotis, Konstantinos Karampinos, Konstantinos Drougkas, Ioannis Karavolias et al. Bcl-2 pathway inhibition in solid tumors: a review of clinical trials. *Clinical & Translational Oncology* 2023; 25(6):1554. Verfügbar unter: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10203027/>.
112. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* 2017; 17(1):399. doi: 10.1186/s12885-017-3383-5.
113. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 2016; 538(7626):477–82. doi: 10.1038/nature19830.

114. ClinicalTrials.gov. Mik665 | Card Results | ClinicalTrials.gov; 2025 [Stand: 24.04.2025]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=mik665>.
115. Maragno A-L, Seiss K, Newcombe R, Mistry P, Schnell CR, Arx F von et al. S227928: A Novel Anti-CD74 ADC with MCL-1 Inhibitor Payload for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML) and Other Hematologic Malignancies. *Blood* 2024; 144(Supplement 1):1381. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497124041284>.
116. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189):440–2. doi: 10.1038/335440a0.
117. Glaser SP, Lee EF, Trounson E, Bouillet P, Wei A, Fairlie WD et al. Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev* 2012; 26(2):120–5. doi: 10.1101/gad.182980.111.
118. Fairlie WD, Lee EF. Targeting the BCL-2-regulated apoptotic pathway for the treatment of solid cancers. *Biochem Soc Trans* 2021; 49(5):2397–410. doi: 10.1042/BST20210750.
119. Ramsey HE, Fischer MA, Lee T, Gorska AE, Arrate MP, Fuller L et al. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov* 2018; 8(12):1566–81. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0140.
120. Mukherjee N, Amato CM, Skees J, Todd KJ, Lambert KA, Robinson WA et al. Simultaneously Inhibiting BCL2 and MCL1 Is a Therapeutic Option for Patients with Advanced Melanoma. *Cancers (Basel)* 2020; 12(8). doi: 10.3390/cancers12082182.
121. Weeden CE, Ah-Cann C, Holik AZ, Pasquet J, Garnier J-M, Merino D et al. Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition. *Oncogene* 2018; 37(32):4475–88. doi: 10.1038/s41388-018-0268-2.
122. Luo M-J, Palmieri M, Riffkin CD, Sakthianandeswaren A, Djajawi TM, Hirokawa Y et al. Defining the susceptibility of colorectal cancers to BH3-mimetic compounds. *Cell Death Dis* 2020; 11(9):735. doi: 10.1038/s41419-020-02815-0.

123. Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S et al. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 2006; 44(1):151–7. doi: 10.1016/j.jhep.2005.09.010.
124. Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M et al. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28(1):25–32.
125. Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Mominoki K, Matsuda S, Kobayashi N. Bcl-xL overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 21(3):515–9.
126. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34(1):55–61. doi: 10.1053/jhep.2001.25387.
127. Beerheide W, Tan YJ, Teng E, Ting AE, Jedpiyawongse A, Srivatanakul P. Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 273(1):54–61. doi: 10.1006/bbrc.2000.2891.
128. Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Arai M, Saisho H. Enhanced sensitivity of human hepatoma cells to 5-fluorouracil by small interfering RNA targeting Bcl-2. *DNA and cell biology* 2005; 24(12):805–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332177/>.
129. Chen K-F, Lin J-P, Shiau C-W, Tai W-T, Liu C-Y, Yu H-C et al. Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(3):268–77. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22580047/>.
130. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 2010; 52(4):1310–21. doi: 10.1002/hep.23836.
131. Vogt F, Lieber J, Dewerth A, Hoh A, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S. BH3 mimetics reduce adhesion and migration of hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2013; 319(10):1443–50. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416067/>.

132. Tutusaus A, Stefanovic M, Boix L, Cucarull B, Zamora A, Blasco L et al. Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9(24):16701–17. doi: 10.18632/oncotarget.24673.
133. Cucarull B, Tutusaus A, Subías M, Stefanovic M, Hernández-Alsina T, Boix L et al. Regorafenib Alteration of the BCL-xL/MCL-1 Ratio Provides a Therapeutic Opportunity for BH3-Mimetics in Hepatocellular Carcinoma Models. *Cancers (Basel)* 2020; 12(2). doi: 10.3390/cancers12020332.
134. Michels J, Obrist F, Vitale I, Lissa D, Garcia P, Behnam-Motlagh P et al. MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2014; 92(1):55–61. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.029.
135. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* 2017; 17(1):399. doi: 10.1186/s12885-017-3383-5.
136. Institut de Recherches Internationales Servier|ADIR, a Servier Group company|Servier. Phase I Dose Escalation Study of Intravenously Administered S64315 in Combination With Orally Administered Venetoclax in Patients With Acute Myeloid Leukaemia: NCT03672695, CL1-64315-002|2018-001809-88. Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03672695>.
137. Li Z, He S, Look AT. The MCL1-specific inhibitor S63845 acts synergistically with venetoclax/ABT-199 to induce apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2019; 33(1):262–6. doi: 10.1038/s41375-018-0201-2.
138. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoëlen C, Descamps G et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis* 2020; 11(5):316. doi: 10.1038/s41419-020-2505-1.
139. Algarín EM, Díaz-Tejedor A, Mogollón P, Hernández-García S, Corchete LA, San-Segundo L et al. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica* 2020; 105(3):e116-e120. doi: 10.3324/haematol.2018.212308.

140. Fairchild CK, Floros KV, Jacob S, Coon CM, Puchalapalli M, Hu B et al. Unmasking BCL-2 Addiction in Synovial Sarcoma by Overcoming Low NOXA. *Cancers (Basel)* 2021; 13(10). doi: 10.3390/cancers13102310.
141. Ham J, Costa C, Sano R, Lochmann TL, Sennott EM, Patel NU et al. Exploitation of the Apoptosis-Primed State of MYCN-Amplified Neuroblastoma to Develop a Potent and Specific Targeted Therapy Combination. *Cancer Cell* 2016; 29(2):159–72. doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.002.
142. Tatsuo Kanda, Osamu Yokosuka, Fumio Imazeki, Makoto Arai, and Hiromitsu Saisho. Enhanced Sensitivity of Human Hepatoma Cells to 5-Fluorouracil by Small Interfering RNA Targeting Bcl-2.
143. Zhu H, Yang W, He L, Ding W, Zheng L, Liao S et al. Upregulating Noxa by ER stress, celastrol exerts synergistic anti-cancer activity in combination with ABT-737 in human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2012; 7(12):e52333. doi: 10.1371/journal.pone.0052333.
144. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2012; 2(1):1–5. doi: 10.4161/spmg.19885.
145. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci* 2021; 22(23). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884942/>.
146. Cagatay T, Ozturk M. P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(52):7971–80. doi: 10.1038/sj.onc.1205919.
147. Kiessling MK, Linke B, Brechmann M, Süß D, Krammer PH, Gülow K. Inhibition of NF- $\kappa$ B induces a switch from CD95L-dependent to CD95L-independent and JNK-mediated apoptosis in T cells. *FEBS Lett* 2010; 584(22):4679–88. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.047.
148. Kennedy R, Celis E. T helper lymphocytes rescue CTL from activation-induced cell death. *J Immunol* 2006; 177(5):2862–72. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.2862.
149. Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, Pappa A, Fricker N, Krammer PH et al. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol* 2010; 6:352. doi: 10.1038/msb.2010.6.

150. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide by T Cell Receptor Stimulation: Selective Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Fas Ligand Expression. *J Exp Med* 2002; 195(1):59–70. doi: 10.1084/jem.20010659.
151. Kaminski M, Kiessling M, Süß D, Krammer PH, Gülow K. Novel role for mitochondria: protein kinase C $\theta$ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol* 2007; 27(10):3625–39. doi: 10.1128/MCB.02295-06.
152. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 2009; 138(4):628–44. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4099469/>.
153. Atale N, Gupta S, Yadav UCS, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc* 2014; 255(1):7–19. doi: 10.1111/jmi.12133.
154. Wu C-C, Lee S, Malladi S, Chen M-D, Mastrandrea NJ, Zhang Z et al. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun* 2016; 7:13565. doi: 10.1038/ncomms13565.
155. Yuan S, Akey CW. Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure* 2013; 21(4):501–15. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3644875/>.
156. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR et al. Yama/ CPP3 $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; 81(5):801–9. doi: 10.1016/0092-8674(95)90541-3.
157. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53(17):3976–85.
158. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):76–100. doi: 10.1038/sj.cdd.4401160.

159. Nagata S, Sakuragi T, Segawa K. Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Curr Opin Immunol* 2020; 62:31–8. doi: 10.1016/j.coi.2019.11.009.
160. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3):621–81. doi: 10.1124/pr.58.3.10.
161. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32608–13. doi: 10.1074/jbc.273.49.32608.
162. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* 2017; 22(10):1189–204. doi: 10.1007/s10495-017-1413-z.
163. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69(1):182–236. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827818302150>.
164. SEER\*Explorer Application; 2024 [Stand: 17.04.2024]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html>.
165. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(10):589–604. doi: 10.1038/s41575-019-0186-y.
166. Mérimo D, Khaw SL, Glaser SP, Anderson DJ, Belmont LD, Wong C et al. Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* 2012; 119(24):5807–16. doi: 10.1182/blood-2011-12-400929.
167. Fowler-Shorten DJ, Hellmich C, Markham M, Bowles KM, Rushworth SA. BCL-2 inhibition in haematological malignancies: Clinical application and complications. *Blood Reviews* 2024; 65:101195. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X24000286>.
168. Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. *Cancers (Basel)* 2021; 13(6). doi: 10.3390/cancers13061292.

169. Lasica M, Anderson MA. Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *J Pers Med* 2021; 11(6). doi: 10.3390/jpm11060463.
170. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006; 9(5):351–65. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610806001139>.
171. Touzeau C, Ryan J, Guerriero J, Moreau P, Chonghaile TN, Le Gouill S et al. BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia* 2016; 30(3):761–4. doi: 10.1038/leu.2015.184.
172. Kudo M, Ueshima K, Ikeda M, Torimura T, Tanabe N, Aikata H et al. Randomised, multicentre prospective trial of transarterial chemoembolisation (TACE) plus sorafenib as compared with TACE alone in patients with hepatocellular carcinoma: TACTICS trial. *Gut* 2020; 69(8):1492–501. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318934.
173. Duffy AG, Ulahannan SV, Makorova-Rusher O, Rahma O, Wedemeyer H, Pratt D et al. Tremelimumab in combination with ablation in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2017; 66(3):545–51. doi: 10.1016/j.jhep.2016.10.029.
174. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood* 2016; 127(25):3215–24. doi: 10.1182/blood-2016-01-688796.
175. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015; 149(5):1226-1239.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.
176. Long J, Wang A, Bai Y, Lin J, Yang X, Wang D et al. Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2019; 42:363–74. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.022.
177. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther* 2021; 221:107753. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.

178. Ma S, Chen GG, Lai PB. Bcl-2 Family Members in Hepatocellular Carcinoma (HCC) – Mechanisms and Therapeutic Potentials. In: Chen GG, Lai PB, Hrsg. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. S. 219–35.

## 9 Danksagung

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

Mein aufrichtiger Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling. Sie hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, meine Forschungsarbeit in ihrem Labor durchzuführen, sondern mich auf meinem wissenschaftlichen Weg mit wertvollen Anregungen und kritischem Feedback begleitet. Sie hat meine Arbeit auf vielfältige Weise gefördert – indem sie mir die Teilnahme an Kongressen ermöglichte und mir während des Publikationsprozesses mit ihrer Expertise zur Seite stand. Ihr Engagement und ihr Vertrauen in mich waren eine große Motivation, wofür ich ihr von Herzen danke.

Ein ebenso großer Dank gebührt Herrn PD Dr. Karsten Gülow, meinem Doktorvater. Mit seinem Fachwissen, seinen inspirierenden Ideen und seiner stetigen Unterstützung hat er mich durch meine Forschungsarbeit geführt. Er hat mich ermutigt, wissenschaftliche Fragestellungen aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und stets nach neuen Lösungsansätzen zu suchen. Die gemeinsame Arbeit an unserer Publikation war für mich eine wertvolle Erfahrung, für die ich ihm sehr dankbar bin.

Von Herzen danke ich auch Frau Prof. Dr. Claudia Kunst. Ihre wertvollen Ratschläge, ihre kreativen Ideen und ihr offenes Ohr haben mir in vielen Phasen meiner Arbeit geholfen. Sie war immer eine verlässliche Ansprechpartnerin und hat mich sowohl fachlich als auch persönlich bereichert.

Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. Marlen Michalski, die mich von Anfang an mit Geduld und Fachwissen unterstützt hat. Sie hat mich mit großer Sorgfalt in die Laborarbeit eingeführt und mir viele praktische Kniffe beigebracht. Ihre Zeit, ihr Engagement und die stets konstruktive Zusammenarbeit haben meine Promotion entscheidend geprägt. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Mein aufrichtiger Dank gilt außerdem den technischen Assistentinnen unserer Abteilung – Heidi Gschwendtner, Kirstin Pollinger, Lisa Aschenbrenner und Manuela Peisl-Gunckel für ihre Unterstützung, das Beantworten jeglicher Fragen und ihre stets hilfsbereite Art. Zusammen mit Martina Meisinger haben sie den Laboralltag nicht nur erleichtert, sondern auch zu einer angenehmen Atmosphäre beigetragen, die mich gerne an die Zeit im Labor zurückdenken lässt.

Nicht zuletzt danke ich allen, die mich auf diesem Weg begleitet haben – für die inspirierenden Gespräche, die wertvollen Ratschläge und die vielen kleinen Gesten, die meine Promotion bereichert haben.

## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Ich 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 (Promotionsberaterinnen oder -berater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Biomedicines. 2023 Jun 8;11(6):1666. doi: 10.3390/biomedicines11061666