

Aus der  
Universitätsmedizin Rostock  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik III - Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Junghanß

**Untersuchungen zur kombinierten Inhibition  
des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs  
bei der akuten lymphatischen Leukämie des B-Zell-Typs**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
der  
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von  
Clemens Holz, geb. am 25.05.1998 in Schwerin  
Rostock | 01.08.2023

### **1. Gutachter**

Prof. Dr. med. Christian Junghanß  
Medizinische Klinik III  
Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin  
Zentrum für Innere Medizin  
Universitätsmedizin Rostock

### **2. Gutachter**

Prof. Dr. med. Monika Brüggemann  
Sektion für Hämatologische Spezialdiagnostik  
Klinik für Innere Medizin II  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel

### **3. Gutachter**

Priv.-Doz. Dr. med. Robert Ramer  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Universitätsmedizin Rostock

**Jahr der Einreichung:** 2023

**Jahr der Verteidigung:** 2024

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 BCL-2-Signalweg .....	1
1.1.1 Funktion und Regulation der Apoptose .....	1
1.1.2 Intrinsischer Signalweg der Apoptose .....	2
1.1.3 Dysregulation des BCL-2-Signalwegs bei der B-ALL .....	3
1.1.4 Inhibition des BCL-2-Signalwegs .....	4
1.2 PI3K/AKT-Signalweg .....	6
1.2.1 Funktion und Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs .....	6
1.2.2 Dysregulation des PI3K/AKT-Signalwegs bei der B-ALL .....	8
1.2.3 Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs.....	9
1.3 Interaktion des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs .....	12
1.4 Rationale der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition bei der B-ALL .....	14
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1 Material .....	16
3.1.1 Laborgeräte.....	16
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	17
3.1.3 Reagenzien.....	18
3.1.4 Inhibitoren .....	19
3.1.5 Antikörper.....	19
3.1.6 Zelllinien.....	20
3.2 Methoden .....	20
3.2.1 Untersuchungen an physiologischen Blutbestandteilen .....	20
3.2.1.1 Hämolyse-Assay .....	20
3.2.1.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes .....	21
3.2.1.3 Calcein-AM-Assay.....	22
3.2.2 Kultivierung der Zelllinien .....	22
3.2.2.1 Auftauroutine.....	22
3.2.2.2 Passagieren .....	23
3.2.2.3 Überprüfung von Kontamination und Authentizität .....	23
3.2.3 Inhibitionsversuche .....	23
3.2.3.1 Inkubation der B-ALL-Zelllinien mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren .....	23
3.2.3.2 Bestimmung der Proliferation .....	24
3.2.3.3 WST-1 Metabolismus-Assay .....	24
3.2.4 Analyse apoptotischer Prozesse .....	25
3.2.4.1 Herstellung von Zytospin-Präparaten .....	25
3.2.4.2 Charakterisierung der Zellmorphologie mittels Pappenheimfärbung .....	25
3.2.4.3 Nachweis von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie .....	26

---

3.2.4.4	Intrazellulärer Nachweis von <i>cleaved</i> -Caspase 3.....	27
3.2.4.5	BAX-Translokations-Assay.....	28
3.2.5	Analyse der intrazellulären Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie.....	29
3.2.6	Analyse der Genexpression mittels <i>targeted RNA sequencing</i> .....	30
3.2.6.1	RNA-Isolierung.....	30
3.2.6.2	<i>Library</i> -Präparation und Sequenzierung.....	31
3.2.6.3	Auswertestrategie der RNA-Sequenzierung.....	32
3.2.7	Statistik.....	33
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
4.1	Zytotoxische Effekte durch kombinierte BCL-2 und PI3K/AKT-Inhibition.....	34
4.2	Antiproliferative Effekte durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition.....	35
4.2.1	Einfluss auf die Proliferation.....	35
4.2.2	Einfluss auf die metabolische Aktivität.....	36
4.2.3	Evaluation sequenzieller Applikationsstrategien.....	38
4.3	Apoptotische Prozesse durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition.....	40
4.3.1	Einfluss auf die Zellmorphologie.....	40
4.3.2	Einfluss auf Apoptose-Marker in der Durchflusszytometrie.....	42
4.3.3	Einfluss auf die Caspase 3-Aktivierung.....	44
4.3.4	Einfluss auf die BAX-Translokation.....	45
4.4	Modulation der Proteinexpression durch kombinierte BCL-2- PI3K/AKT-Inhibitor.....	47
4.4.1	Einfluss auf die BCL-2-Signalwegproteine.....	47
4.4.2	Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung.....	51
4.5	Modulation der Genexpression durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition.....	53
4.5.1	Basale Genexpression in SEM- und RS4;11-Zellen.....	53
4.5.2	Einfluss auf die Genexpression des BCL-2-Signalwegs.....	54
4.5.3	Einfluss auf die Genexpression weiterer Apoptose-relevanter Gene.....	57
4.5.4	Einfluss auf die Genexpression im PI3K/AKT-Signalweg.....	60
4.5.5	Einfluss auf die Genexpression weiterer Leukämie-relevanter Gene.....	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1	Relevanz zytotoxischer Effekte der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition.....	66
5.2	Bedeutung der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition in der B-ALL.....	66
5.2.1	Anitproliferative Effekte.....	67
5.2.2	Induktion apoptotischer Prozesse.....	69
5.2.3	Modulation der Proteinexpression.....	72
5.2.4	Modulation der Genexpression.....	75
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>

<b>9. Anhang</b> .....	<b>100</b>
9.1 Ergänzende Tabellen .....	100
9.2 Ergänzende Abbildungen .....	118
9.3 Abbildungsverzeichnis.....	125
9.4 Tabellenverzeichnis.....	127
<b>Thesen der Dissertation</b> .....	<b>128</b>
<b>Publikationen</b> .....	<b>129</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>130</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>132</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>133</b>

## 1. Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie des B-Zell-Typs (B-ALL) ist eine hämatologische Neoplasie, die durch Akkumulation unreifer lymphatischer Blasten im Knochenmark, Blut und weiteren lymphatischen, sowie nicht-lymphatischen Organen charakterisiert ist. Während sich das Gesamtüberleben der B-ALL in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert hat, ist die Prognose für Erwachsene über 40 Jahre, Rezidive oder genetische Subtypen mit hohem Risiko wie das *KMT2A::AFF1*-Arrangement (t(4;11)(q21;q23), *KMT2Ar*, früher bekannt als *MLL::AF4*), weiterhin schlecht [1]. Neue Therapieansätze fokussieren die gezielte Inhibition aberrant regulierter Signalwege [1,2]. Musterbeispiel ist die Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib zur selektiven Therapie der Folgen des *BCR::ABL1*-Fusionsgens, mit einer deutlichen Verbesserung der Prognose [1].

Aktuelle präklinische Untersuchungen und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die ALL mit *rearrangement* der Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A (*KMT2Ar*-ALL) durch eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins *B-cell-lymphoma-2* (BCL-2) gekennzeichnet ist und eine hohe Sensibilität gegenüber einer spezifischen BCL-2-Inhibition aufweist [3–5]. Ergebnisse zur klinischen Anwendung gezielter BCL-2-Inhibition bei der akuten myeloiden Leukämie (AML) und chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) argumentieren aufgrund Problematiken primärer und sekundärer Resistenzen in der Monotherapie für die Notwendigkeit zur frühzeitigen Erforschung neuartiger Kombinationsansätze [6,7]. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg stellt sich auf Grundlage seiner pathologischen Relevanz in der B-ALL und vielfältigen Interaktionspunkten mit dem BCL-2-Signalweg als eine vielversprechende Zielstruktur zur kombinierten Inhibition dar [8–10]. Mit dieser Arbeit wird erstmalig die kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg-Inhibition in der B-ALL untersucht. Im Folgenden werden die untersuchten Signalwege, etablierte Inhibitoren und die Rationale zur kombinierten Inhibition detailliert dargestellt.

### 1.1 BCL-2-Signalweg

#### 1.1.1 Funktion und Regulation der Apoptose

Die Apoptose bezeichnet eine programmierte Form des Zelltods und dient der physiologischen Reduktion geschädigter oder gealterter Zellen. Als Antagonist der Mitose ist dieser Prozess somit ein wichtiger Regulator der Wachstumskontrolle und Gewebshomöostase [11,12]. Kennzeichnend sind morphologische Veränderungen, wie die Reduzierung der Zellkerngröße und Abschnürungen von apoptotischen Körperchen. Der kontinuierlich stattfindende Abbau der fragmentierten Zellbestandteile durch Phagozyten vermeidet die Freisetzung zytotoxischer Substanzen und nachfolgend inflammatorische Reaktionen. Der strukturelle Abbau der Zelle,

unter Schonung des umliegenden Gewebes, grenzt die Apoptose morphologisch vom unkontrollierten Zelltod (Nekrose) ab [12]. Biochemisch ist die Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen und einer Fragmentierung der DNA charakterisiert. Weitere Formen des Zelltods, wie Ferroptose, Nekroptose oder Pyroptose, weisen alternative biochemische Mechanismen auf, verlaufen jedoch im Vergleich zur Apoptose meist proinflammatorisch [13].

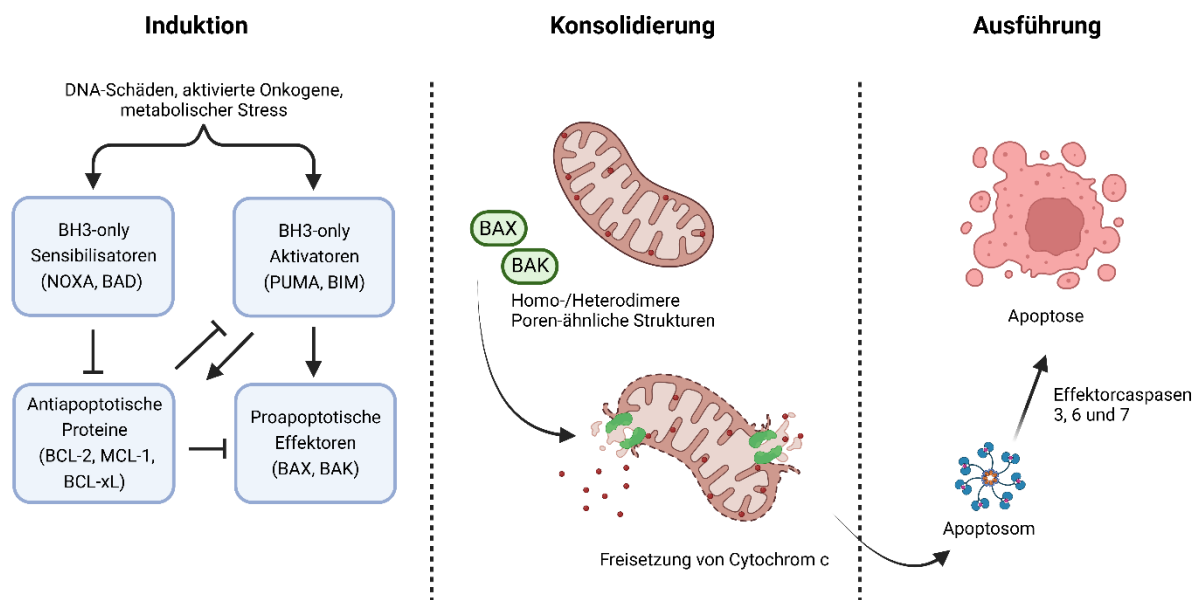
Die Induktion der Apoptose kann sowohl extrinsisch als auch intrinsisch erfolgen, wobei beide Signalwege in einer Aktivierung der exekutiven Effektorcaspasen konvergieren und im weiteren Verlauf zum programmierten Zelltod führen [14]. Der extrinsische Signalweg wird extrazellulär über Rezeptoren der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor-Familie induziert. Diese können etwa durch Bindung des Fas-Liganden (CD95L) oder *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) stimuliert werden und bewirken nachfolgend über die Caspase 8 eine Spaltung der Effektorcaspasen [11]. Die intrinsische Aktivierung der Apoptose kann durch diverse Stimuli wie DNA-Schäden, aktivierte Onkogene oder einen Mangel an Wachstumsfaktoren erfolgen [14–18]. Vor allem der intrinsische Signalweg der Apoptose stellt eine häufig therapeutisch genutzte Zielstruktur in hämatologischen Neoplasien dar und wird daher im Weiteren näher beschrieben [16–18].

### 1.1.2 Intrinsischer Signalweg der Apoptose

Die Regulation des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (Abbildung 1), auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet, erfolgt über die Proteine der BCL-2-Familie [16]. Funktionell gliedern sich die Akteure des BCL-2-Signalweges in pro- und antiapoptotische Proteine [19,20]. Strukturelle Gemeinsamkeit aller Proteine sind die BCL-2-Homologen (BH) Domänen. Die proapoptotischen Proteine werden weiter in die *BH3-only* Proteine, welche ausschließlich die BH3-Domäne als homologe Struktur besitzen, und die Multidomänen (BH1-3)-enthaltenden Effektorproteine untergliedert [14,20].

Der Verlauf der Apoptose kann in drei Phasen differenziert werden: Induktions-, Konsolidierungs- und Ausführungsphase [16]. In der Induktionsphase bewirken Stressstimuli über *BH3-only* Proteine, wie *p53-upregulated modulator of apoptosis* (**PUMA**), *phorbol-12myristate-13-acetate-induced protein 1*; *PMAIP1* (**NOXA**), *BCL-2-interacting mediator of cell death* (**BIM**) und *BCL-2-associated death promotor* (**BAD**) eine Aktivierung der Effektorproteine *BCL-2-associated X protein* (**BAX**) und *BCL-2 homologous antagonist killer* (**BAK**) [16,21,22]. Diese bilden im Schritt der Konsolidierung Homo- und Heterodimere, welche über Verlagerung vom Zytosol an die äußere mitochondriale Membran porenartige Strukturen bilden und zum Verlust des transmembranösen Potentials führen [16,20,21]. Zum Zeitpunkt der BAX/BAK-Aktivierung wird der Verlauf der Apoptose als irreversibel betrachtet [16,23]. Folgend führt dieser Prozess zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem transmembranösen Raum der Mitochond-

rien in das Zytoplasma [24]. In der Ausführungsphase bildet das Cytochrom c mit *dem apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1) und der Pro-Caspase 9 das Apoptosom. Dieser Multiproteinkomplex spaltet die Pro-Caspase 9 zur Caspase 9, was weiterhin die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und damit die typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen bewirkt [14,16,18,25]. Die multiregionären (BH1-4), antiapoptotischen Proteine BCL-2, *myeloid cell leukemia-1* (**MCL-1**), *B-cell lymphoma-extra large* (**BCL-xL**), *B-cell lymphoma-w* (BCL-W) und *BCL-2-related gene expressed in fetal liver-1* (BFL-1) inhibieren sowohl BH3-only, als auch Effektorproteine und wirken somit als Antagonisten der Apoptose positiv auf das Überleben einer Zelle ein [14,16–18].



**Abb. 1: Übersicht über den intrinsischen Signalweg der Apoptose**

Diverse Stimuli führen in der Induktionsphase der Apoptose zu einer Dysbalance zugunsten proapoptotischer Faktoren. Infolgedessen hemmen die BH3-only Proteine BAD, NOXA, BIM und BID die antiapoptotischen Proteine BCL-2, MCL-1 und BCL-xL, was letztlich die Inhibition der Effektormoleküle BAX und BAK antagonisiert. Die BAX/BAK-Aktivierung führt durch Verlagerung in die äußere Mitochondrienmembran, anschließende Freisetzung von Cytochrom c und Caspase-Aktivierung irreversibel zur Apoptose. Abbildung adaptiert nach [16]. Erstellt mit BioRender.com.

### 1.1.3 Dysregulation des BCL-2-Signalwegs bei der B-ALL

Die B-ALL kann in eine Vielzahl genetischer Subgruppen untergliedert werden, welche sich durch diverse Mutationen und chromosomale Aberrationen charakterisieren [1].

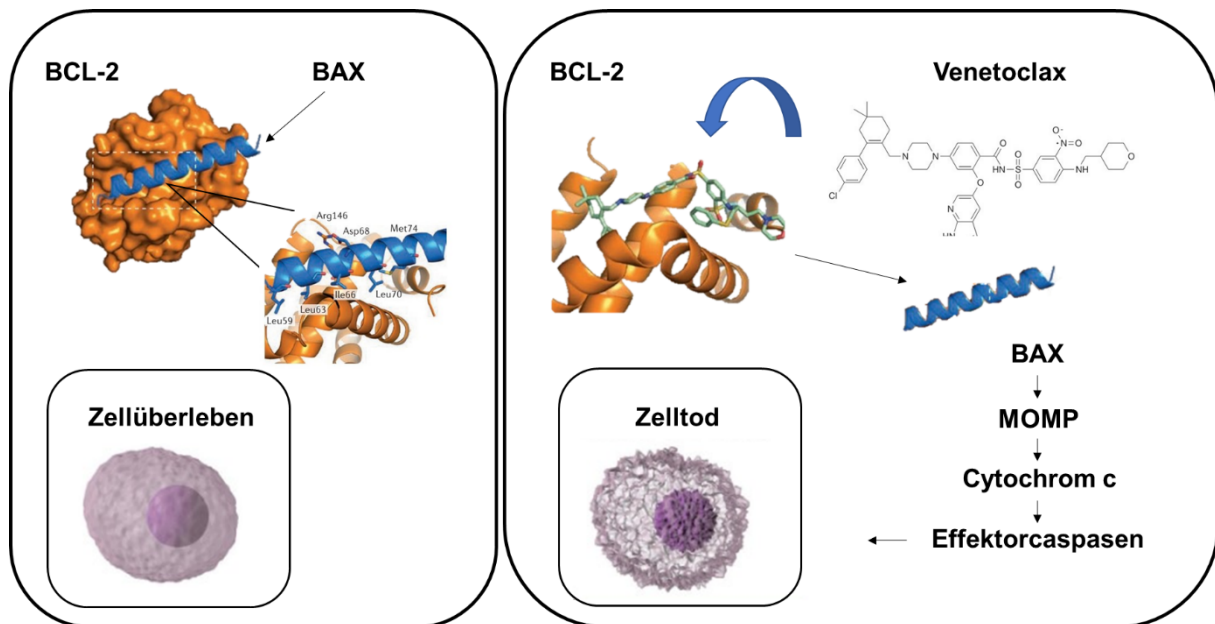
In einer Studie von Robinson *et al.* konnten erhöhte BCL-2-Expressionswerte in ALL mit variierender Zytogenetik, einschließlich einer t(4;11)-Translokation (*KMT2A::AFF1*-Fusionsgen), nachgewiesen werden [26]. Die ALL mit Rearrangement des *KMT2A*-Gens wird meist als pro-B-ALL diagnostiziert [1,5]. Eine Assoziation der erhöhten BCL-2-Expression in ALLs mit *KMT2Ar* wurde durch eine Arbeit von Benito *et al.* bestätigt. Hierbei wurde gezeigt, dass das *KMT2A::AFF1*-Fusionsprotein die Aktivierung des *BCL2*-Gens kontrolliert. Eine spezifische

Regulierung des *BCL2*-Gens konnte auf eine DOT1-ähnliche Histon-H3K79-Methyltransferase (DOT1L)-vermittelte Methylierung von Histon H3 Lysin 79 (H3K79) zurückgeführt werden [5].

### 1.1.4 Inhibition des BCL-2-Signalwegs

Die Überexpression antiapoptotischer Proteine findet sich in einer Vielzahl hämatologischer Neoplasien, unter anderem beim Multiplen Myelom (MM), dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), dem Follikulären Lymphom (FL) und auch bei der ALL [16,27,28]. Erhöhte BCL-2-Expression resultiert in einer Dysbalance der intrinsischen Apoptose zugunsten antiapoptotischer Faktoren und vermittelt Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika [16,18,29]. Die Selektivität der BH3-*only*-Proteine zeigte die pharmakologische Möglichkeit auf, zielgerichtet antiapoptotische Proteine zu inhibieren [16,30]. Die BH3-Domäne ist eine amphipathische Alpha-Helix, welche mit der hydrophoben Tasche der antiapoptotischen Proteine der BCL-2-Familie interagiert [31]. Diese proapoptotische Struktur wurde pharmakologisch als BH3-Mimetikum nachgebildet. Eine Bindung der BH3-Mimetika bewirkt die Freisetzung proapoptotischer Proteine und induziert somit die Apoptose [7,18]. Erste Substanzen inhibieren mehrere antiapoptotische Proteine, wie Navitoclax (ABT-737), welches sowohl BCL-2 als auch BCL-xL hemmt [32]. Arbeiten am Mausmodell zeigten den zytotoxischen Einfluss der BCL-xL-Inhibition gegenüber Thrombozyten auf [33]. Trotz hoher klinischer Effektivität in einer Phase I-Studie bei rezidivierter/refraktärer (R/R) CLL stellten sich die zytotoxischen Effekte gegenüber Blutplättchen als dosislimitierender Faktor dar [16,34].

In diesem Kontext wurde Venetoclax (ABT-199, VEN), ein oral bioverfügbarer und hochselektiver BCL-2-Inhibitor (Abbildung 2), entwickelt und an einem breiten Feld hämatologischer Neoplasien, wie dem MM, Non-Hodgkin-Lymphomen, chronischen und akuten Formen der Leukämien, inklusive der Chronische Myeloischen Leukämie (CML), CLL, AML und der ALL, getestet [16,35,36]. Sowohl die Arbeiten von Seyfried *et al.* als auch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe evaluierten *in vitro* und *in vivo* die präklinische Effektivität einer Venetoclax-Monoapplikation in B-ALL-Zelllinien. *In vitro* bewirkte Venetoclax in *KMT2Ar*-ALL bereits in nanomolaren Konzentrationen starke antileukämische Effekte und induzierte Apoptose [4,37]. *In vivo* konnte anhand eines *KMT2Ar*-Zelllinien-abgeleiteten Xenograftmodels eine reduzierte Tumorzellproliferation und Blastenfrequenz in Knochenmark und Milz nachgewiesen werden [4]. Untersuchungen von Gauert *et al.* erwiesen vergleichbare Ergebnisse [38]. Darüber hinaus konnte in einer Arbeit von Wirth *et al.* unter anderem erhöhte *BCL2*-Genexpression als ein möglicher Resistenzmechanismus gegenüber konventionellen Therapien in der ALL identifiziert werden [39]. Derzeit wird die Effektivität von Venetoclax in einer Vielzahl klinischer Studien in der ALL evaluiert. Die erste Veröffentlichung zur kombinierten Applikation von Venetoclax, Navitoclax und Standard-Chemotherapie-Regime konnte in einer Phase-I Studie vielversprechende Ergebnisse publizieren [40,41].



**Abb. 2: Wirkmechanismus von Venetoclax**

Links: Physiologische Bindungsverhältnisse von BCL-2 und BAX führen zur Inhibition der proapoptotischen Wirkung von BAX. Rechts: Exemplarische Darstellung der Bindung eines BH3-Mimetikums an BCL-2. Die folgende Freisetzung von BAX führt über die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*; MOMP) zur Induktion der Apoptose. Abbildung adaptiert nach [35,42].

Aufgrund der klinischen Effektivität bei der Therapie der CLL und AML erhielt Venetoclax eine Zulassung von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und der Europäischen Arzneimittelkommission (EMA) und ist derzeit (26.07.2023) in Kombination mit Obinutuzumab Bestandteil der Erstlinientherapie der CLL [43–45].

Neben der selektiven BCL-2-Inhibition werden vermehrt spezifische Inhibitoren der weiteren antiapoptotischen Proteine der BCL-2-Familie, wie MCL-1 oder BCL-xL, entwickelt. Eine mögliche Perspektive der Modulation des intrinsischen Signalwegs der Apoptose ist das *BH3-Profilling*. Durch die Identifikation der Abhängigkeit der Neoplasie zu den antiapoptotischen Proteinen könnte zukünftig eine selektive Inhibition oder individuell adaptierte Kombination gewählt werden [16]. Eine gezielte Inhibition hat das Potential Therapieresistenzen durch Regulation der BCL-2-Proteine zu unterbinden und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) zu minimieren [17].

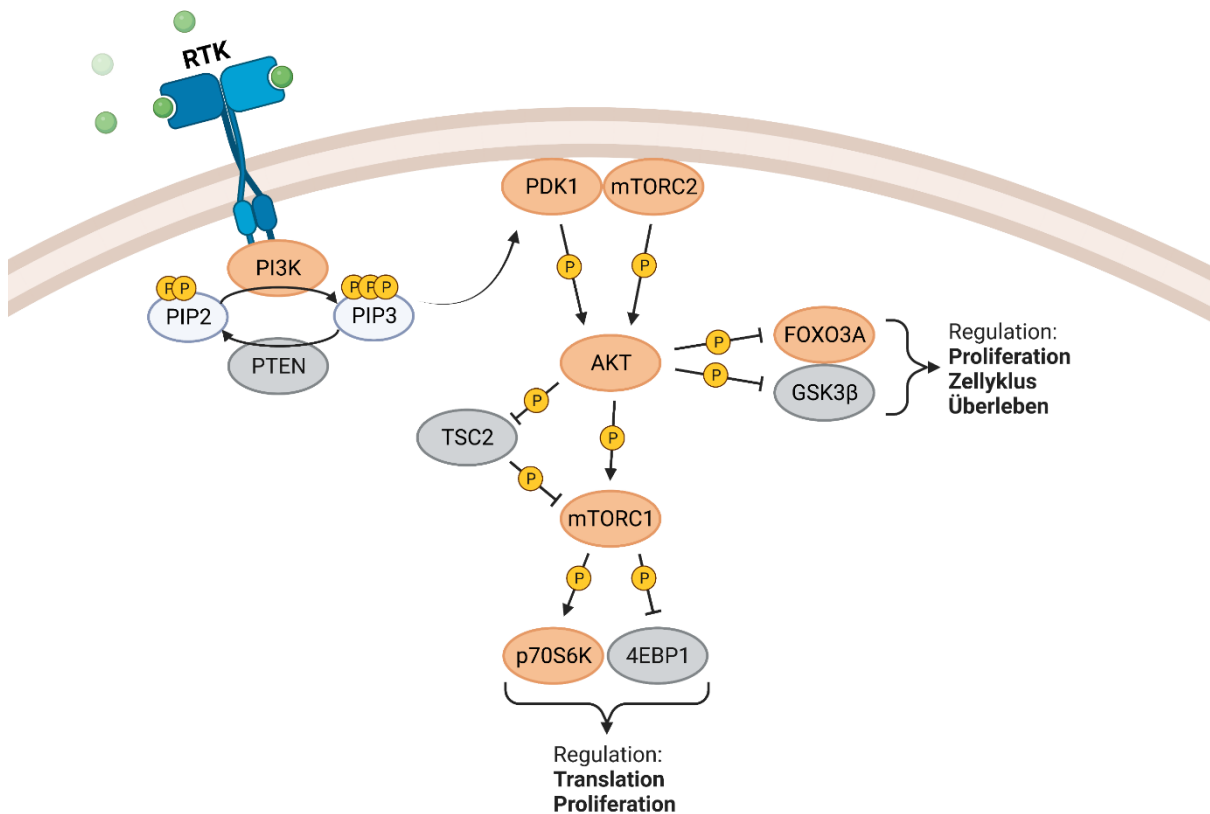
## 1.2 PI3K/AKT-Signalweg

### 1.2.1 Funktion und Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs

Die PI3Ks sind eine Familie von intrazellulären Proteinkinasen mit einer zentralen Funktion in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen [46,47]. Die Aktivierung der PI3Ks erfolgt über Tyrosinkinase, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Onkogene [47]. PI3Ks phosphorylieren den Inositolring von Phospholipiden in der Plasmamembran, was wiederum zur Bindung und Aktivierung von Effektorproteinen wie der Serin/Threonin-Kinase AKT (Proteinkinase B; PKB), Bruton-Tyrosinkinase (BTK) oder weiteren Effektoren führt [48]. Im physiologischen Zustand reguliert dieser Signalweg zentrale zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Proliferation und Überleben (Abbildung 3) [46–48].

Aufgrund struktureller und substratspezifischer Eigenschaften sind die PI3Ks in drei Klassen (I-III) untergliedert [49]. Während die physiologische Funktion der Klasse II-Kinasen noch nicht vollständig geklärt ist, fungieren die Klasse III-PI3Ks in der Regulation des Membrantransportes [47,48]. Die Klasse I-PI3Ks sind die am besten charakterisierte Gruppe und können weiter in Typ IA und Typ IB unterteilt werden. Beide Unterformen sind Heterodimere und bestehen aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Die Klasse IA-PI3Ks werden in die katalytischen Isoformen p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  und p110 $\delta$  unterschieden und über eine p85-Untereinheit reguliert [50]. Die Klasse IB setzt sich aus der katalytischen Untereinheit p110 $\gamma$  und einer der regulatorischen Untereinheiten p101, p84 oder p87 zusammen [47,51]. Zwischen den Isoformen zeigt sich eine gewebeabhängige Verteilung der Expression. Während die katalytischen Untereinheiten p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  ubiquitär vorkommen werden die Isoformen p110 $\delta$  und p110 $\gamma$  überwiegend in Leukozyten exprimiert [48,52]. Alle p110-Untereinheiten der Klasse I-PI3Ks katalysieren die Phosphorylierung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (**PIP2**) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (**PIP3**) und führen zur Aktivierung von Effektorproteinen [48,50].

Die Serin/Threonin-Kinase AKT stellt aufgrund ihrer Vielzahl an *downstream*-Substraten ein Haupteffektorprotein der PI3Ks dar [53]. Es werden drei Isoformen (AKT1, AKT2 und AKT3) unterschieden, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob es sich bei den Isoformen um redundante oder variierende physiologische Funktionen handelt [54,55]. Die Aktivierung von AKT erfolgt über die Rekrutierung vom Zytosol an die Plasmamembran. Über ihre Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne bindet AKT PIP3 und wird von der Kinase *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (**PKD1**) am Threoninrest 308 phosphoryliert [53,56]. Eine vollständige Aktivierung der Kinase besteht erst nach Phosphorylierung am Serin 473 durch den *mTOR complex 2* (**mTORC2**) [53,57].



**Abb. 3: Darstellung des PI3K/AKT-Signalwegs**

Externe Stimuli aktivieren über Rezeptor-Tyrosinkinasen (**RTK**) die PI3K und nachfolgend AKT. Verschiedene *downstream*-Substrate regulieren Proliferation, Zellzyklus, Überleben und Translation. **P** – Phosphorylierung. Orange – antiapoptotisch/proleukämisch, grau – proapoptotisch/antileukämisch. Erstellt mit BioRender.com.

Es sind etwa 400 Substrate, welche Sequenzmotive zur Phosphorylierung durch AKT enthalten, bekannt [53,54,57]. Dies verdeutlicht die Schlüsselrolle der Kinase zur Regulation vielfältiger Prozesse. Über eine Inhibition des *tuberous sclerosis complex 2* (**TSC2**) aktiviert AKT indirekt mTORC1 und greift somit über die nachfolgenden Substrate p70 S6-Kinase (**p70S6K**) und *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (**4E-BP1**) in die Regulation von Metabolismus, Proliferation und Zellwachstum ein [53,58]. Die AKT-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Glykogensynthase-Kinase 3β (**GSK3β**) nimmt unter anderem Einfluss auf den Zellzyklus [54,59].

Wichtigster Gegenspieler der PI3K ist *Phosphatase and tensin homolog* (**PTEN**), welches die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 katalysiert [60]. Ein relevanter Modulator von PTEN ist die Casein Kinase 2 (CK2), die über Phosphorylierung PTEN inhibiert [60,61].

### 1.2.2 Dysregulation des PI3K/AKT-Signalwegs bei der B-ALL

Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert Funktionen, welche mit den wichtigsten Pathomechanismen in der Entstehung von diversen Tumorentitäten eng verknüpft sind [62–64]. Weiterführende Studien implizieren, dass der PI3K/AKT-Signalweg der am häufigsten fehlregulierte Signalweg in humanen Krebszellen ist und machen die Signalkaskade zum intensiven Forschungsfeld in der Onkologie [62,65,66]. Es zeigten sich dabei Aberrationen in verschiedensten soliden Krebserkrankungen, wie Brust-, Kolon-, Prostata- und Hirntumoren, sowie in hämatologischen Neoplasien [47,65,67–69].

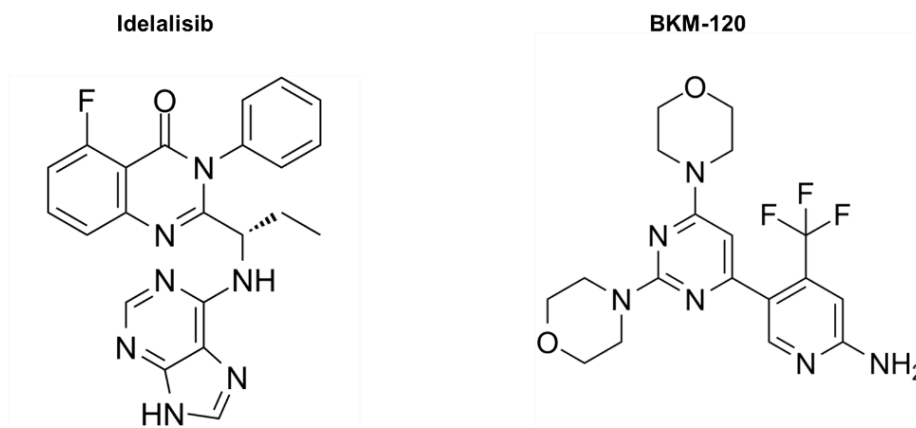
Ursächlich für eine erhöhte PI3K/AKT-Aktivität in Leukämien können eine Vielzahl an Mutationen und chromosomalen Translokationen sein, die zur konstitutiven Aktivierung oder Überexpression von Rezeptoren und nachfolgenden Kinasen führen [53,70]. Neben der Fehlregulation der Apoptose findet sich in der pro-B-ALL auch gehäuft eine konstitutive Hyperaktivität im Bereich des PI3K/AKT-Signalwegs [8,71]. Diese kann an mehreren Punkten der Signaltransduktionskaskade entstehen. Ein konstitutiv aktivierter Vorläufer-B-Zell-Rezeptor oder aberrante Signale des Interleukin-7-Rezeptors können hierfür verantwortlich sein. Ebenfalls erhöhte Aktivitäten des G-Proteins *rat sarcoma* (Ras) oder der Tyrosinkinase Fyn und Lyn scheinen die PI3K in der B-ALL positiv zu regulieren [53]. In Folge von chromosomalen Translokationen können resultierende Fusionsproteine zur konstitutiven Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs beitragen. Beispielhaft ist die Philadelphiachromosom-positive ALL mit t(9;22)(q23;p13)-Translokation und *BCR::ABL1*-Tyrosinkinase, welche über 25 % der adulten ALL-Patienten betrifft. Interaktionen zwischen dem *BCR::ABL1*-Fusionsprotein und der regulatorischen p85 Untereinheit der PI3K scheinen eine mögliche Ursache gesteigerter Signalwegaktivität zu sein [1,53,72–74]. In einer Arbeit von Gomes *et al.* konnte in adulten B-ALL-Zellen eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, unabhängig vom *BCR::ABL1*-Status, gezeigt werden [8]. Auch die *KMT2Ar*-ALL ist mit Mutationen im Bereich der PI3Ks assoziiert [1]. Weitere Mechanismen, die zu einer gesteigerten Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs führen, sind dysfunktionale Negativregulationen, z.B. verminderte PTEN-Expression oder gesteigerte Aktivität der Kinase CK2 [47,53,61]. Neben erhöhter Induktion oder fehlender Inhibition des Signalwegs sind direkte Mutationen der PI3Ks und AKT bekannt. Der PI3K/AKT-Signalweg ist in verschiedenen Neoplasien, einschließlich der B-ALL, einer der am häufigsten mutierten Signalwege [53,62].

Eine gesteigerte Aktivität und Überexpression der Kinase AKT sind assoziiert mit einer schlechten Prognose, Überexpression von BCL-2 und Therapieresistenzen [10,55,75]. In diversen Patienten mit soliden Tumorerkrankungen wie Mamma-, Ovarial-, Lungen- oder kolorektalem Karzinom konnte eine Punktmutation in der PH-Domäne von AKT1 (p.Glu17Lys; E17K) nachgewiesen werden. Diese führt PIP3-unabhängig zur Rekrutierung

von AKT an die Plasmamembran und zu erhöhter pAKT-Expression. Die Übertragung der Mutation in ein Mausmodell konnte eine Leukämie induzieren, allerdings mit unvollständiger Penetranz. Trotz des tumorfördernden Potentials konnte bisher keine Relevanz der beschriebenen Mutation in humanen Leukämiezellen nachgewiesen werden [76–78].

### 1.2.3 Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs

Innerhalb des Signalwegs wurden zielgerichtet Inhibitoren einzelner Schlüsselkinasen, wie der Kinasen PI3K, AKT bzw. deren Isoformen, entwickelt [48,62,63,79]. Isoform-spezifische Funktionen der Klasse I-PI3Ks konnten über Inaktivierung von Genen im Mausmodell nachgewiesen werden [48,62,80]. Insbesondere die Isoform p110 $\delta$  erwies in ihrer Funktion und ihrem Expressionsmuster eine herausragende Bedeutung in Leukozyten, was eine Rationale der isolierten Inhibition bei der Leukämie darstellt [81–83]. Andererseits erscheint eine nicht selektive PI3K-Inhibition aufgrund einer beschriebenen funktionellen Redundanz der Klasse I-PI3Ks in Erhalt des Zellüberlebens und Proliferation ebenfalls als sinnvoller Ansatz [84]. In dieser Arbeit wurden daher der pan-PI3K-Inhibitor BKM-120 (Buparlisib, BKM) und der p110 $\delta$ -Isoform-spezifische Inhibitor Idelalisib (CAL-101; GS1101, IDEL) verwendet (Abbildung 4).



**Abb. 4: Strukturformeln der verwendeten PI3K-Inhibitoren Idelalisib und BKM-120**

BKM-120 ist ein oral bioverfügbarer pan-Klasse I-PI3K-Inhibitor und ist biochemisch als 2,6-Morpholinopyrimidin-Derivat charakterisiert. Die einzelnen Isoformen der PI3K werden equipotent über eine Blockade der ATP-Bindungstasche inhibiert [85]. BKM-120 erwies bereits *in vitro* antiproliferative Effekte und induzierte Apoptose in ALL-Zelllinien mit variierender Zytogenetik [86]. Die *in vivo*-Applikation von BKM-120 in einem Mausmodell des Multiplen Myeloms (MM) resultierte in einer signifikant verminderten Tumorlast und verlängerte das Überleben unter Therapie. Weiterführende Kombinationsansätze mit Dexamethason zeigten bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen ein synergistisches Potential [87]. In einer Phase I-Studie an Patienten mit R/R akuten Leukämien resultierte die Monoapplikation von BKM-120

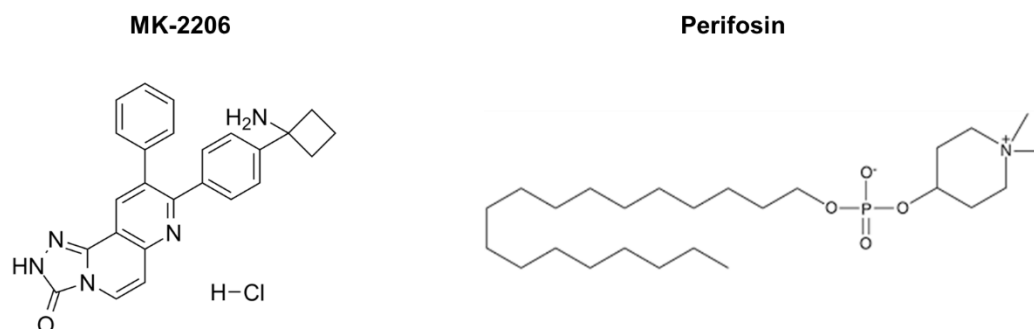
in moderaten Effekten, wobei eine verminderte AKT-Aktivität anhand nachfolgender Substrate nachgewiesen wurde (NCT01396499). Eine spezifische Wirkung und ein tolerables Nebenwirkungsprofil unterstreichen BKM-120 als potenziellen Kandidaten einer Kombinationstherapie [88].

Idelalisib hemmt hochspezifisch die p110 $\delta$ -Isoform der PI3Ks. Der Wirkmechanismus beruht auf einer kompetitiven Inhibition der ATP-Bindungstasche [89]. In Untersuchungen an B-ALL-Zelllinien wirkte Idelalisib zytotoxisch und induzierte Caspase-abhängig Apoptose. Als zugrundeliegender Mechanismus wurden unter anderem eine durch *Forkhead-Box O 3A* (FOXO3A) vermittelte Induktion proapoptotischer Gene vermutet [90]. Adam *et al.* konnte in B-ALL-Patientenzellen eine antiproliferative Wirkung, jedoch keine Induktion der Apoptose nachweisen. Weitere Experimente *in vitro* und *in vivo* wiesen ein vermindertes *homing* der B-ALL-Blasten in das Knochenmark in Folge der Idelalisib-Applikation nach [91]. Aufgrund der klinischen Effektivität erhielt Idelalisib die EMA-Zulassung und ist Bestandteil der Erstlinientherapie der CLL in Kombination mit Rituximab, sowie der Behandlung des refraktären FL in Monotherapie [92]. Aufgrund schwerwiegender Komplikationen im Rahmen von *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonien und Infektionen mit dem Cytomegalievirus besteht ein Rote Hand Brief zur Therapie mit Idelalisib, inklusive überarbeiteter Empfehlungen zur klinischen Anwendung. Nach aktueller Bewertung der EMA ist das Nutzen-Risiko-Verhältnis zur Anwendung von Idelalisib weiterhin positiv [93]. Im Rahmen einer klinischen Phase I/II-Studie wurde eine Idelalisib-Monotherapie an insgesamt 6 Patienten mit R/R ALL untersucht (NCT03742323). Bisher wurden keine Ergebnisse der Studie publiziert (23.07.2023).

Der PI3K/AKT-Signalweg greift vielfältig in die Regulation physiologischer Prozesse ein. Um das Nebenwirkungsprofil der Modulation zu minimieren wurde versucht, selektive Inhibitoren einzelner Kinasen zu entwickeln [62,63]. Aufgrund der häufig aberrant gesteigerten Aktivität der *downstream*-Kinase AKT in Tumorzellen stellt diese eine vielversprechende Zielstruktur dar [62]. Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren zeigte, dass die ATP-Bindungstasche der Kinase AKT vielfache Homologien zu alternativen Strukturen besitzt [53,94,95]. Um dieses Problem zu adressieren, wurden stetig Inhibitoren mit alternativen Bindungsstrukturen der Kinase AKT, wie MK-2206 (MK) oder Perifosin (KRX-0401, PERI), entwickelt (Abbildung 5) [95,96].

MK-2206 wirkt über die Inhibition der katalytischen und der PH-Domäne im Vergleich zu den AKT-Inhibitoren der ersten Generation hochspezifisch [53,97]. Bestehende Literatur, sowie Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bestätigen die antileukämische Wirkung und verminderte pAKT-Expression nach Applikation von MK-2006 in B-ALL-Zelllinien mit variierender Zytogenetik [98–101]. Weiterhin haben Vorarbeiten eine signifikant antiproliferative Wirkung von

MK-2206 gegenüber primären Patientenproben in einer protektiven Co-Kultur gezeigt. Während in den primären Patientenproben Apoptose induziert werden konnte, ließ sich dies in den B-ALL-Zelllinien nicht nachweisen [99]. In AML-Zelllinien bewirkte MK-2206 bereits in niedermolaren Konzentrationen einen Zellzyklusarrest und ein vermindertes Zellwachstum, während Apoptose erst im Konzentrationsbereich von 5-10  $\mu\text{M}$  induziert wurde [102]. In einer Arbeit von Sandhöfer *et al.* konnte die *mixed-lineage leukemia (MLL)-rearranged* AML als eine Subgruppe mit erhöhter Sensitivität gegenüber einer PI3K/AKT/mTOR-Inhibition, inklusive der Applikation von MK-2206, identifiziert werden [103]. Klinische Ergebnisse im Rahmen einer Phase II-Studie an R/R AML erwiesen bei einer Monotherapie mit MK-2206 geringe Ansprechraten mit Aktivierung kompensatorischer Signalwege. Um das volle Potential einer AKT-Inhibition zu nutzen und kompensatorische Mechanismen zu inhibieren, werden perspektivisch Kombinationsstrategien untersucht (NCT01253447) [62].



**Abb. 5: Strukturformeln der verwendeten AKT-Inhibitoren MK-2206 und Perifosin**

Perifosin gehört zu der Gruppe der Alkylphospholipide und ist ein oral bioverfügbares Phospholipid-Analogon. Zentraler Wirkmechanismus ist die Interaktion mit der PH-Domäne von AKT, wodurch die Translokation und Aktivierung der Kinase inhibiert wird [95,104]. Aufgrund der Modulation von zellulären Membranen, *lipid rafts* und des Phospholipid-Stoffwechsels scheinen die Effekte von Perifosin nicht auf den PI3K/AKT-Signalweg beschränkt zu sein, sondern werden vermutlich auch über weitere Signalwege, wie dem MAPK-Signalweg, vermittelt [95,104,105]. In humanen T-ALL-Zelllinien wirkt Perifosin antileukämisch und reduziert das pAKT-Level der Blasten. Es konnte eine mitochondriale Induktion der Apoptose mit gesteigerter Freisetzung von Cytochrom c nachgewiesen werden. Die apoptotischen Prozesse schießen nicht auf den intrinsischen Signalweg begrenzt, sondern zeigten teilweise eine Abhängigkeit von der Integrität der *lipid rafts* und dem extrinsischen Signalweg über die Fas/FasL-Interaktion [105]. Vergleichend konnte bei Zellen des MM *in vitro* und *in vivo* eine reduzierte Viabilität bei verminderter pAKT-Expression nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten die Ergebnisse eine Caspase-abhängige Induktion der Apoptose unter Beteiligung der c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) [106].

Untersuchungen an humanen Lungenkrebszelllinien erwiesen synergistische Aktivität der Kombination von dem dualen BCL-2- und BCL-xL-Inhibitor ABT-737 und Perifosin über Degradation von MCL-1 *in vitro* und *in vivo* [107]. In einer Phase II-Studie zur Effektivität einer Perifosin-Monotherapie bei R/R CLL konnte vorwiegend eine krankheitsstabilisierende Wirkung beobachtet werden. Die Effekte waren dabei unabhängig vom pAKT-Status [108].

Neben den dargestellten Substanzen existieren noch eine Vielzahl weiterer PI3K/AKT-Inhibitoren, wobei es sich häufig um Vorläufer oder abgeleitete Strukturen handelt [62,109]. In dieser Arbeit wurde die Modulation des PI3K/AKT-Signalwegs auf die vier dargestellten und weit verbreiteten Inhibitoren beschränkt. Zusammengefasst ergaben Testungen von PI3K/AKT-Inhibitoren an hämatologischen Neoplasien, inklusive der B-ALL, bisher vielversprechende Ergebnisse. Dosislimitierung, kompensatorisch aktivierte Signalwege und unzureichende Remission unterstreichen jedoch die Notwendigkeit rationaler Kombinationsstrategien [62,83,110,111].

### 1.3 Interaktion des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs

Im physiologischen Zustand einer Zelle finden sich zwischen dem BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg eine Vielzahl an Verbindungen. Durch Interaktionen auf verschiedenen Ebenen des apoptotischen Netzwerkes kann durch beide Signalwege das Überleben der Zelle begünstigt werden [54]. Diese Zusammenhänge spiegeln sich in der Pathologie wider: Aberrationen im Bereich des PI3K/AKT-Signalwegs sind häufig mit einer Dysregulation des programmierten Zelltodes assoziiert [47,53–55]. Zunehmend erlangt die Kinase AKT eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Apoptose und scheint über ihre Substrate ein wichtiger Integrator des PI3K/AKT- und BCL-2-Signalwegs zu sein (Abbildung 6) [54,55,112].

Über die Aktivierung von mTORC1 und nachfolgender Inhibition von 4E-BP1 vermittelt AKT eine antiapoptotische Wirkung durch die indirekte Aktivierung des Translations-Initiationsfaktors *eukaryotic translation initiation factor 4E* (**eIF-4E**) [58,112]. Unter anderem wird das antiapoptotische Protein MCL-1 als mRNA-Substrat von eIF-4E reguliert [113].

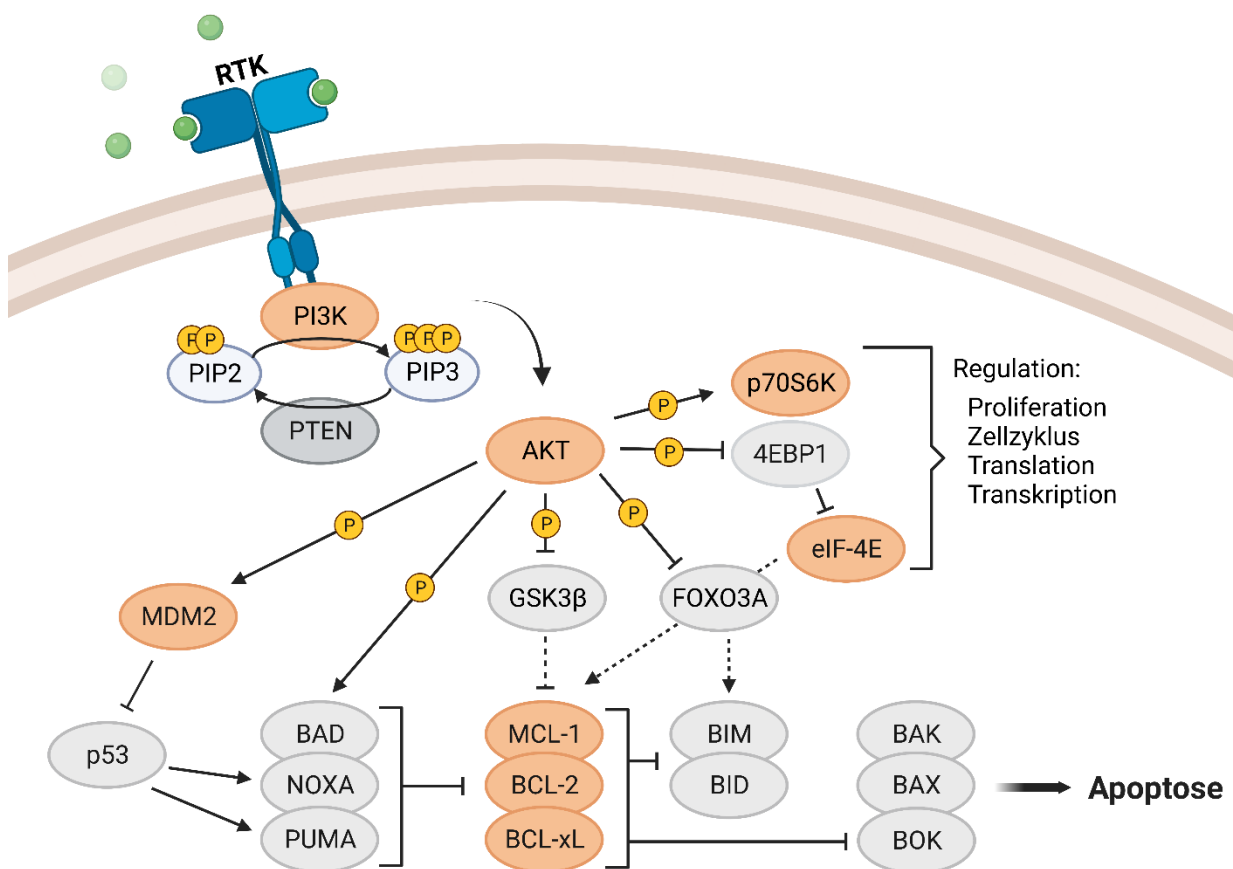
Weiteren Einfluss auf BCL-2-Proteine bedingt AKT durch eine Negativregulation auf Expression und Funktion der proapoptotischen BH3-*only*-Proteine [54]. Eine direkte Schnittstelle des PI3K/AKT- und BCL-2-Signalwegs ist die Phosphorylierung des proapoptotischen BH3-*only*-Proteins BAD an Serin 136 durch AKT. Durch diese Modulation interagiert BAD mit regulatorischen 14-3-3-Proteinen und zeigt eine verminderte Assoziation zu den antiapoptotischen Proteinen BCL-xL und BCL-2, was sich folglich positiv auf das Überleben der Zellen auswirkt [54,114,115]. Die Transkriptionsfaktoren der *forkhead-box-protein O* (FOXO)-Familie besitzen AKT-Phosphorylierungsstellen und wirken auf Zellwachstum, Proliferation und das Überleben der Zellen ein [116,117]. Über die Inhibition von FOXO3A beeinflusst AKT den intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Apoptose [54,116–118]. Dabei reguliert der

Transkriptionsfaktor FOXO3A unter anderem die Expression der proapoptotischen Proteine BIM und PUMA [116,119].

Der Tumorsuppressor p53 wird durch den PI3K/AKT-Signalweg moduliert und induziert über eine gesteigerte Transkription der proapoptotischen Proteine PUMA und NOXA die Apoptose [120]. AKT inhibiert diese Induktion durch Phosphorylierung der *E3-Ubiquitin-Ligase murine double minute 2 (MDM2)*, welche anschließend in den Kern transloziert und eine Degradation von p53 bewirkt [54,121].

Neben einer Inhibition der BH3-*only*-Proteine wirkt eine PI3K/AKT-Aktivierung positiv auf die Expression des antiapoptotischen Proteins MCL-1 ein [54]. Hintergrund ist die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , durch dessen Inhibition die Ubiquitin-proteosomal gesteuerte Degradation von MCL-1 verhindert wird [110,122].

Zusätzlich zur Modulation der Initiierungsphase des mitochondrialen Signalwegs steht eine direkte Inhibition des Apoptosoms über Phosphorylierung der Pro-Caspase 9 durch AKT zur Diskussion [54].



**Abb. 6: Interaktionen des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs**

Die Kinase AKT bewirkt sowohl direkt über die Phosphorylierung von BAD, als auch indirekt eine antiapoptotische Regulierung des BCL-2-Signalwegs. Über Aktivierung von MDM2 inhibiert AKT die p53-vermittelte Induktion von BH3-*only*-Proteinen. Die Inhibition von GSK3 $\beta$  vermindert die MCL-1-Degradation. Die Phosphorylierung von FOXO3A inhibiert die Transkription von BIM und PUMA. Über den Translationsfaktor eIF-4E wird MCL-1 positiv durch AKT reguliert. **RTK** – Rezeptortyrosinkinase, **P** – Phosphorylierung. Orange – antiapoptotisch/proleukämisch, grau – proapoptotisch/antileukämisch. Erstellt mit BioRender.com.

#### **1.4 Rationale der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition bei der B-ALL**

In zahlreichen hämatologischen Neoplasien, inklusive der B-ALL, finden sich Aberrationen im Bereich des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs [16,53,62]. Die CLL oder das Mantelzell-Lymphom charakterisieren sich regelhaft durch eine Überexpression von BCL-2 [16,35]. Die B-ALL weist hingegen in ihrer Pathogenese eine höhere Variabilität zwischen den antiapoptotischen BCL-2-Proteinen auf [3,16]. Neue Studien und eigene Vorarbeiten der Arbeitsgruppe identifizierten die Hochrisikogruppe der *KMT2A*-B-ALL als hochsensitiv gegenüber einer selektiven BCL-2-Inhibition [3–5,26]. Trotz klinischer Effektivität zeigen die Problematiken primärer und sekundärer Resistenzen während der Venetoclax-Monotherapie bei AML und CLL die Notwendigkeit zur frühzeitigen Erforschung neuartiger Kombinationstherapien auf [6,7,123].

Eine Blockade des PI3K/AKT-Signalwegs stellt sich in mehreren Punkten als geeigneter Kombinationspartner einer BCL-2-Inhibition dar. Zunächst finden sich in seiner physiologischen Funktion diverse Interaktionen mit dem BCL-2-Signalweg, die das Überleben der Zelle positiv beeinflussen [54,62]. Darüberhinaus ist die B-ALL mit Aberrationen im PI3K/AKT-Signalweg assoziiert [1]. Eine gesteigerte Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs steht in Zusammenhang mit einer Überexpression von BCL-2, schlechter Prognose und Therapieresistenzen [8–10]. Aufgrund der dargestellten Verbindungen beider Signalwege scheint es wahrscheinlich, dass antiapoptotische Faktoren der Zelle durch kombinierte Inhibition synergistisch reduziert werden. Eine PI3K/AKT-Inhibition könnte somit die Zelle für die Applikation von Venetoclax sensitivieren und potenzielle Resistenzmechanismen unterbinden [54,62].

Präklinische Arbeiten am Richter-Syndrom, DLBCL und in AML-Zellen zur kombinierten BCL-2- und PI3K-Inhibition stützen diese These [110,124–127]. Bisher existierten keine Daten zur Effektivität einer kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition in der B-ALL. Diese wurden mit dieser Arbeit erstmalig publiziert.

## 2. Zielstellung

Die zielgerichtete BCL-2-Inhibition demonstrierte sowohl präklinische als auch klinische Wirksamkeit in einem breiten Feld hämatologischer Neoplasien. Dosislimitierung, primäre oder sekundäre Resistenzen zeigen jedoch die Notwendigkeit auf, nach weiteren Kombinationsansätzen zu suchen, um das volle Potential der Modulation der Apoptose in malignen Zellen auszuschöpfen. Der PI3K/AKT-Signalweg stellt sich aufgrund der Interaktionen mit dem BCL-2-Signalweg und der pathomechanistischen Bedeutung in der Genese der ALL als vielversprechende Zielstruktur für eine kombinierte Inhibition dar.

In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg-Inhibition auf zwei B-ALL-Zelllinien mit *KMT2A::AFF1*-Translokation untersucht. Dabei soll analysiert werden, ob die kombinierte Applikation:

- eine zytotoxische Wirkung auf physiologische Blutbestandteile hat;
- synergistisch antiproliferativ auf B-ALL-Zellen wirkt;
- in unterschiedlichen Applikationssequenzen die antileukämische Wirkung differenziert beeinflusst;
- zu Veränderungen der Zellmorphologie führt;
- die BCL-2-Signalweg-abhängige Apoptoseinduktion verstärkt;
- zu einer relevanten Modulation der Gen- und Proteinexpression von BCL-2-, PI3K/AKT- und Apoptose-relevanten Molekülen führt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius
Axio Observer <i>inverted microscope</i>	Zeiss
Brutschrank (37 °C)	Heraeus Instruments
Captair™ Chem Filterabzug, Filtair 834	Erlab
Cytofunnel	Thermo Fisher Scientific
Eclipse TE 200	Nikon
EVOS™ XL Core Bildgebungssystem	Thermo Fisher Scientific
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD
FACSVerse™ Durchflusszytometer	BD
Ion S5™ Plus System	Thermo Fisher Scientific
Kühlschränke	Liebherr
Kühltruhe -20°C	Liebherr
Kühltruhe -80°C	Thermo Fisher Scientific
Multipipette	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Photometer (GloMax®-Multi Detection System)	Promega
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe, acu	INTEGRA Bioscience
Pipettierhilfe	Brand
Plattenschüttler, Duomax 1030	Heidolph
Präzisionswaage, 572	Kern & Sohn
Rotilabo®-Heiz- und Magnetrührer, MH 15	Carl Roth
Sterilwerkbank, Herasafe	Heraeus Instruments
Vakuumpumpe, Vacusafe	INTEGRA Biosciences
Vortexer	Scientific Industries

Wasserbad	GFL
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge, 5418	Eppendorf
Zentrifuge, Cytospin 3	Shandon
Zentrifuge, J6-MI	Beckman
Zentrifuge, ROTINA 38R	Hettich

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
24- und 96- <i>flat-bottom-well</i> Platten	Greiner Bio-One
96-U-Boden-Platten	Greiner Bio-One
Deckgläschen (Neubauer Zählkammer)	Marienfeld
EDTA-Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt
Filterkarten	Tharmac
Flügelkanüle	Sarstedt
Objektträger	Marienfeld
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl und 1000 µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf
Rundbodenröhrchen 5 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One

### 3.1.3 Reagenzien

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Alpha-Medium	PAN-Biotech
Annexin-V-FITC	BD
BSA (Bovines Serum Albumin) Pulver	Serva
Calcein AM <i>working solution</i>	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Eindeckmedium (ROTI®Mount FluorCare)	Carl Roth
Ethanol 96 %	Walter CMP
Annexin V Binding Buffer	BD
FKS (fetales Kälberserum)	PAN-Biotech
Formaldehyd	Polysciences Europe
Giemsa-Lösung	Merck
Immersionsöl	AppliChem
IMDM-Medium	PAN-Biotech
Ion 540™ Kit-Chef	Thermo Fisher Scientific
Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus	Thermo Fisher Scientific
Ion Library TaqMan™ QuantitationKit	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM Hi-Q View Chef 400 Kit	Thermo Fisher Scientific
May-Grünwald-Lösung	Merck
Methanol	Biologend
MitoSpy™ Red	Biologend
Pancoll	PAN-Biotech
PBS ( <i>phosphate-buffered saline</i> )	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)	Biochrom
Propiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
RNeasy Mini Kit	Qiagen

SuperScript™ IV VILO™ Master-Mix	Thermo Fisher Scientific
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Merck
Triton X 100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tween 20	Roth
WST-1 ( <i>water-soluble tetrazolium salt</i> )	Sigma Aldrich

### 3.1.4 Inhibitoren

Tabelle 4: Liste der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Wirkmechanismus	Hersteller
BKM-120	Pan-PI3K-Inhibitor	Selleckchem
Idelalisib	PI3K $\delta$ -Inhibitor	Hycultec
MK-2206	AKT-Inhibitor	Selleckchem
Perifosin	AKT-Inhibitor	Hycultec
Venetoclax	BCL-2-Inhibitor	Hycultec

### 3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie	Hersteller	Klon
BAX (PE Konjugat)	Santa Cruz	2D2
BCL-xL (PerCP-Cy5.5 Konjugat)	Santa Cruz	H-5
BCL-2 (PerCP-Cy5.5 Konjugat)	BioLegend	C-2
<i>cleaved</i> -Caspase 3 (Alexa Fluor 488 Konjugat)	Cell Signaling	polyclonal
MCL-1 (PE Konjugat)	Santa Cruz	22
pAKT (Alexa Fluor 488 Konjugat)	Cell Signaling	-
pBCL-2 (Alexa Fluor 647 Konjugat)	Santa Cruz	A-11

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz**

Immunfluoreszenz	Hersteller	Klon	Verdünnung
BAX	Cell Signaling	D2E11	1:50
Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 <i>goat anti-rabbit</i> )	Invitrogen	-	1:1000

### 3.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei pro-B-ALL-Zelllinien (SEM und RS4;11) mit t(4;11)(q21;q23)-Translokation von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen und verwendet. Während die SEM-Zellen von einem juvenilen Patienten mit Rezidiv abstammen und eine hypodiploide Zytogenetik aufweisen, handelt es sich bei RS4;11 um Zellen eines adulten Patienten mit Rezidiv und hyperdiploider Chromosomenzahl [128,129]. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden mittels Western Blot und Cancer Hotspot Panel v2 die basale Proteinexpression von PI3K/AKT- und BCL-2-Signalwegproteinen sowie Mutationen im Bereich von Tumor-relevanten genomischen Regionen charakterisiert. Sowohl bei SEM (c.215C>G; c.639A>G; c.743G>A) als auch bei RS4;11 (c.215C>G; c.214G>C) wurden Mutationen in *TP53* nachgewiesen. Die Zelllinie SEM zeigte zudem Mutationen in den Genen *APC*, *CDKN2A*, und heterozygot im *PIK3CA* Gen [68]. Analysen der Proteinexpression erwiesen in beiden Zelllinien eine starke basale Expression und Aktivität von AKT und BCL-2. Der Tumorsuppressor p53 wurde in SEM-Zellen stark exprimiert, jedoch kaum in RS4;11-Zellen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Untersuchungen an physiologischen Blutbestandteilen

Zur Untersuchung physiologischer Blutbestandteile wurden fünf freiwilligen und gesunden Probanden jeweils 15 ml venöses Vollblut entnommen und durch EDTA-Blutentnahmeröhrchen die Gerinnung inhibiert. Anschließend erfolgte die direkte Aufarbeitung ohne weitere Lagerung der Proben.

#### 3.2.1.1 Hämolyse-Assay

Zum Ausschluss zytotoxischer Effekte der neuartigen Kombinationsansätze auf Erythrozyten wurde ein Hämolyse-Assay durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Vollblut wurde für jeden Ansatz in Triplikaten mit 20 µl je Well in eine 96-Well-U-Boden-Platte eingesetzt. In jedes Well wurden anschließend 75 µl der Inhibitor-Lösung pipettiert. Die Ansätze erfolgten einzeln oder in Kombinationen von Venetoclax und

PI3K/AKT-Inhibitoren. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren (Tabelle 7) entsprachen den Maximalkonzentrationen in den B-ALL-Zelllinien-Versuchen und wurden durch eine Verdünnung mit PBS hergestellt.

Vergleichend diente als Nullkontrolle ein Zusatz von 75 µl PBS. Zur Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden 75 µl SDS (1 %) oder Vollblut pipettiert. Der Ansatz inkubierte anschließend für 120 min im Brutschrank. Darauf folgend wurden die Platten für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und der zellfreie Überstand in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden zur photometrischen Messung überführt. Diese erfolgte am GloMax®-Photometer bei 560 nM.

**Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen im Hämolyse-Assay**

Substanz	Wirkmechanismus	Konzentration
Venetoclax	BCL-2-Inhibitor	10 nM
BKM-120	Pan-PI3K-Inhibitor	750 nM
Idelalisib	PI3Kδ-Inhibitor	10 µM
MK-2206	AKT-Inhibitor	250 nM
Perifosin	AKT-Inhibitor	7,5 µM
DMSO	-	10 µM

### 3.2.1.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Das Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation basiert auf einer Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte. Innerhalb eines Zentrifugenröhrchens wird das Blut über eine Flüssigkeit mit definierter Dichte geschichtet (Pancoll;  $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$ ). Anschließend erfolgt durch Zentrifugation die Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit. Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich aufgrund ihrer höheren Dichte ( $\rho > 1,077 \text{ g/ml}$ ) unterhalb des Pancolls. Die mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) hingegen weisen eine geringe Dichte auf und sammelten sich als Interphase zwischen dem Pancoll und Plasma an. Diese Auftrennung ermöglicht die isolierte Entnahme der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) im Anschluss der Dichtegradienten-Zentrifugation.

Für die Isolation der PBMC wurden 10 ml Vollblut im Verhältnis 1:1 mit kaltem PBS verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Vollblut in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig über 15 ml kaltes Pancoll geschichtet. Die Auftrennung in die einzelnen zellulären Komponenten des Blutes erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (15 min, 1140 x g, ohne Bremse). Folgend wurden die isolierten Zellen zweimal mit 15 ml kaltem PBS gewaschen (10 min, 200 x g). Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurden diese mit Trypanblau (0,04 % in PBS) versetzt und anschließend 10 µl Zellsuspension in die Neubauerzählkammer pipettiert. Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau reichert sich aufgrund von fehlender

Membranintegrität ausschließlich in toten Zellen an. Folglich erscheinen unter dem Mikroskop tote Zellen blau gefärbt, wohingegen sich vitale Zellen hell darstellen. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anschließend anhand nachfolgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl (Mittelwert)} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

### 3.2.1.3 Calcein-AM-Assay

Der Acetoxymethylester von Calcein (Calcein AM) ist permeabel für Zellmembranen und in seinem Grundzustand nicht fluoreszierend. In vitalen Zellen wird das Calcein AM intrazellulär durch Esterasen zu Calcein hydrolysiert. Die dadurch bewirkte Demaskierung von Bindungsstellen ermöglicht dem Calcein, intrazellulär Kalziumionen zu komplexieren. Dieser Komplex kann nicht erneut die Zellmembran passieren und fluoresziert nach Anregung im grünen Wellenlängenbereich. Aufgrund der Tatsache, dass das Calcein AM kaum Zytotoxizität aufweist und die Esterasen ausschließlich in vitalen Zellen aktiv sind, eignet sich die Substanz zur Analyse der Zellviabilität.

Es wurden Triplikate mit jeweils 150 µl und einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  PBMC in eine 96-Well-Platte eingesät und mit den Inhibitoren inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen sind unter 3.2.1.1. aufgeführt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde in jedes Well 50 µl Calcein AM *working solution* mit einer Konzentration von 4 µM pipettiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte am GloMax®-Photometer mittels Anregung bei 485 nm und folgender Detektion bei 535 nm.

### 3.2.2 Kultivierung der Zelllinien

Die beiden Zelllinien SEM und RS4;11 wurden gemäß den Vorgaben der DSMZ kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten dabei in steriler Umgebung unter einer Sicherheitswerkbank. Beide Zelllinien wurden in einer Zellkulturflasche mit einer Oberfläche von 75 cm<sup>2</sup> in ihrem Medium mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin suspendiert. Für die Zelllinie SEM wurde das IMDM-Medium verwendet und für RS4;11-Zellen das Alpha-Medium. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.2.1 Auftauroutine

Beide Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und vor Beginn der Versuchsreihen aufgetaut. Die Lagerung erfolgte in Aliquots zu jeweils 1 ml. Zur Kryokonservierung wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in PBS mit 20 % FKS in ein Gesamtvolumen von 900 µl suspendiert und mit 100 µl DMSO versetzt. Die Auftauroutine erfolgte durch die Laborassistenz durch schonende Erwärmung in einem Wasserbad bei 37°C. Zur Trennung der Suspension vom zytotoxischen Einfriermedium DMSO wurden die Zellen zweimal mit 10-20 ml angewärmtem Medium

gewaschen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte zunächst in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche im entsprechenden Medium.

### 3.2.2.2 Passagieren

Ein Wechsel des Mediums erfolgte, an der Teilungsrate der Zellen orientiert, zweimal pro Woche. Die Zellen wurden hierzu geerntet und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss an die Zentrifugation (180 x g, 10 min) wurde der zellfreie Überstand entfernt und die Zellen in 5-7 ml Medium suspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie unter 3.2.1.2 beschrieben. Im Anschluss wurde konstant eine Zellzahl von  $8 \times 10^6$  Zellen in 24 ml Medium eingesät und im Brutschrank kultiviert.

### 3.2.2.3 Überprüfung von Kontamination und Authentizität

In regelmäßigen Abständen wurde eine Testung auf Kontamination und Authentizität durchgeführt, sowie die Zelllinien maximal bis zur Passage 50 kultiviert. Dies erfolgte routinemäßig durch die technische Assistenz mittels Mycoalert Mycoplasma Detection Kit und einer durchflusszytometrischen Charakterisierung der Oberflächenantigene.

## 3.2.3 Inhibitionsversuche

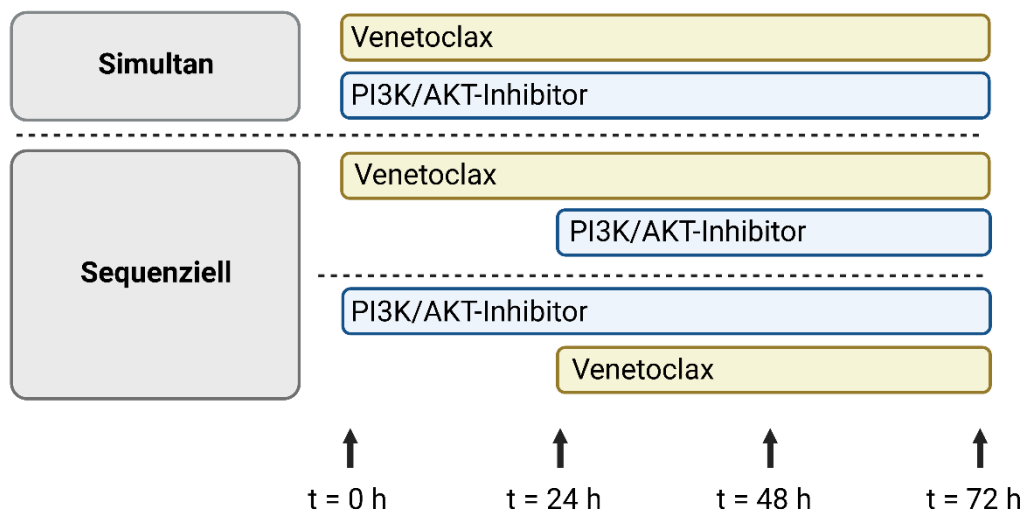
### 3.2.3.1 Inkubation der B-ALL-Zelllinien mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren

Alle durchgeführten Inhibitionsversuche erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, in mindestens drei biologischen Replikaten. Die verwendeten Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und als 10 mM Stocklösung aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Ansätze erfolgten in einer 24-Well-Platte. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml Medium suspendiert und die benötigte Verdünnung der Stocklösungen mit PBS angesetzt. Die verwendeten Konzentrationen (Tabelle 8) basieren auf bereits durchgeführten Dosisfindungsstudien der Arbeitsgruppe.

**Tabelle 8: Verwendete Konzentrationen der Inhibitionsversuche**

Substanz	Wirkmechanismus	SEM	RS4;11
Venetoclax	BCL-2-Inhibitor	10 nM	2,5 nM
BKM-120	Pan-PI3K-Inhibitor	750 nM	500 nM
Idelalisib	PI3K $\delta$ -Inhibitor	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M
MK-2206	AKT-Inhibitor	250 nM	250 nM
Perifosin	AKT-Inhibitor	5 $\mu$ M	7,5 $\mu$ M

Zur Inhibition wurden Konzentrationen im Bereich der IC-20/30-Werte gewählt, um potenzielle synergistische Ansätze zu identifizieren. Als Negativkontrolle erfolgte ein Ansatz mit DMSO. Die Applikation der Inhibitoren erfolgte einzeln oder in Kombination von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren. Neben der simultanen Gabe wurden auch verschiedene Applikationssequenzen untersucht. Hierzu wurde entweder zunächst Venetoclax und 24 h später der PI3K/AKT-Inhibitor oder die Inhibitoren in umgekehrter Reihenfolge hinzugefügt (Abbildung 7). Die Inkubation erfolgte anschließend unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24–72 h.



**Abb. 7: Darstellung untersuchter Applikationssequenzen**

Erstellt mit BioRender.com.

### 3.2.3.2 Bestimmung der Proliferation

Zur Untersuchung antiproliferativer Effekte wurden die beiden Zelllinien SEM und RS4;11 wie unter 3.2.3.1 beschrieben einzeln oder simultan mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren für 72 h inkubiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauerzählkammer und Lichtmikroskopie (3.2.1.2). Zellen, die eine Färbung durch Trypanblau (3.2.2.1) aufwiesen, wurden nicht in die Zählung miteinbezogen.

### 3.2.3.3 WST-1 Metabolismus-Assay

Die metabolische Aktivität wurde anhand eines *water soluble tetrazolium* (WST-1)-Assays untersucht. Es handelt sich bei WST-1 um ein schwach rot gefärbtes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz. Die Biorreduktion des WST-1 zu einem dunkelroten Formazansalz hängt überwiegend von der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Produktion ab und ist somit proportional zur Aktivität des zellulären Metabolismus. Der dadurch erzeugte Farbumschlag kann folglich als Indikator der metabolischen Aktivität verwendet werden.

Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren und variierende Applikationssequenzen entsprechen den Angaben unter 3.2.3.1. Der Ansatz erfolgte in einer 96-Well-Platte. Dabei wurden Triplikate mit jeweils 150 µl und einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  nach Zusatz der Inhibitoren eingesetzt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 72 h wurden in jedes Well 15 µl WST-1 pipettiert und anschließend für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Die Detektion am Spektralphotometer (GloMax®) erfolgte bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Zur Auswertung der gemessenen Werte wurde anschließend der Leerwert (Medium mit WST-1 Zusatz) abgezogen.

### **3.2.4 Analyse apoptotischer Prozesse**

#### **3.2.4.1 Herstellung von Zytospin-Präparaten**

Die Zytozentrifugation, auch Zytospin genannt, ist eine Methodik zur Fixierung von Suspensionzellen auf Objektträgern und ermöglicht dadurch die Durchführung verschiedener Untersuchungsmethoden wie Immunfluoreszenz- oder Pappenheimfärbung.

Der Ansatz erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben in einer 24-Well-Platte, aus welcher die Zellen nach der Inkubationszeit in FACS-Röhrchen geerntet, abzentrifugiert (8 min, 180 x g) und folgend zweimal mit 2 ml PBS gewaschen wurden. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl PBS suspendiert und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer und Lichtmikroskopie bestimmt (3.2.1.2). Für jedes Präparat wurden 200 µl Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen in einen Zytofunnel pipettiert und mittels Cytospin 3 Zentrifuge für 10 Minuten bei 700 rpm auf die Objektträger zentrifugiert.

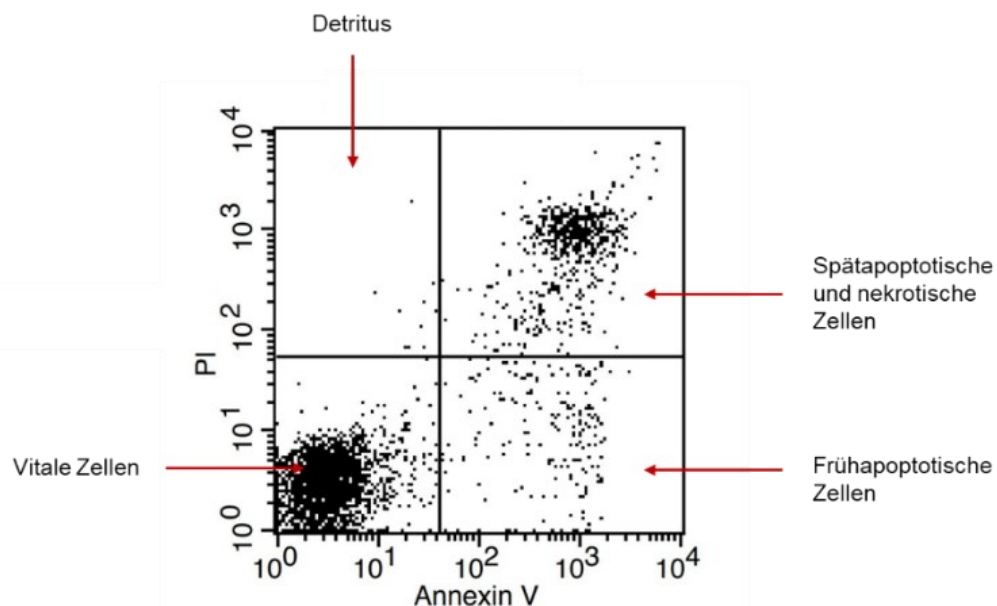
#### **3.2.4.2 Charakterisierung der Zellmorphologie mittels Pappenheimfärbung**

Die Pappenheimfärbung ist eine kombinierte Anwendung der May-Grünwald- (Eosin-Methylenblau) und Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau). Das resultierende panchromatische Spektrum färbt Zellkern, Zytoplasma und Granula hämatologischer Präparate an. Im Ergebnis färben sich basophile Zellbestandteile wie das Zytoplasma von Lymphozyten bläulich-violett und eosinophile Strukturen wie der Zellkern rötlich an.

Im ersten Färbeschritt wurden die Präparate für 6 min in einer Küvette mit May-Grünwald-Lösung gefärbt und folgend dreimal für je 1 min mit Waschpuffer (pH = 7,2) inkubiert. Im zweiten Färbeschritt wurden die Objektträger für 20 min in einer 1:10 mit Waschpuffer verdünnten Giemsa-Lösung inkubiert und weitere drei Male gewaschen. Nach kurzem Spülen in *Aqua dest.* wurden die Präparate für 24 h bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Mikroskopie erfolgte am EVOS® XL Core Bildgebungssystem, unter Verwendung von Immersionsöl bei 100-facher Vergrößerung.

### 3.2.4.3 Nachweis von Apoptose und Nekrose mittels Durchflusszytometrie

Die Differenzierung vitaler, früh- und spät-apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) mittels Durchflusszytometrie. Grundlage zur Unterscheidung des Vitalitätszustandes der Zellen sind variierende Membraneigenschaften. Im Prozess der frühen Apoptose verlagert sich das in gesunden Zellen vorrangig in der Membranınnenseite lokalisierte Phosphatidylserin auf die Außenseite. Im weiteren Verlauf des Zelltods verliert die Membran spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen ihre Integrität, wodurch die Passage hydrophiler und größerer Moleküle passiv ermöglicht wird. Durch eine hohe Affinität zu Phospholipiden korreliert die Bindung des Annexin V mit dem translozierten Phosphatidylserin und dient somit als Nachweis früh-apoptotischer Zellen. Der fluoreszierende Farbstoff PI kann sich bei reduzierter Membranintegrität spätapoptotischer Zellen durch Diffusion in die DNA einlagern. Durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung wird der Durchmesser der Messkammer (Flusszelle) stark reduziert, sodass die Proben als Einzelzellsuspension durch einen dünnen Kanal innerhalb des Zytometers laufen. Während der Passage innerhalb der Flusszelle wird die Probe mittels Laser bestrahlt, das Fluoreszenzsignal angeregt und gemessen. Durch Integration der beiden Indikatoren ist eine Differenzierung des Vitalitätszustandes der Zellen im *dot-plot* möglich (Abbildung 8). Vitale Zellen weisen keine Färbung auf, wohingegen früh-apoptotische Zellen ausschließlich durch Annexin V angefärbt sind. Bei reduzierter Membranintegrität findet sich eine doppelt positive Färbung von Annexin V und PI.



**Abb. 8: Durchflusszytometrische Differenzierung der frühen und späten Apoptose/Nekrose**

Exemplarische Darstellung eines *dot-plot*-Diagramms nach Färbung mittels Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) zur Identifizierung apoptotischer Zellen (SEM, Venetoclax 10 nM, 48 h).

Der Ansatz erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben für 48 h. Zur Analyse wurden die Zellen zunächst aus der 24-Well-Platte geerntet, zentrifugiert (180 x g, 10 min, 4°C) und zweimalig mit 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 100 µl Annexin V Binding Buffer (1x) suspendiert und nach Zusatz von 5 µl Annexin V (20 µg/ml) für 15 min im Dunklen bei RT inkubiert. Es folgte ein Zusatz von weiteren 400 µl Annexin V Binding Buffer. Unmittelbar vor der Messung am FACSCalibur™ Durchflusszytometer wurden 15 µl PI (0,6 µg/ml) in die FACS-Röhrchen pipettiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software CellQuest Pro (BD, Version 4.0.2).

### 3.2.4.4 Intrazellulärer Nachweis von *cleaved-Caspase 3*

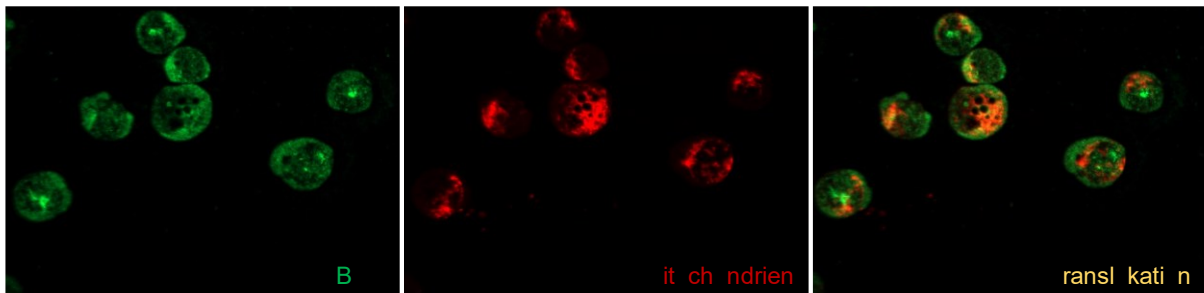
Der Prozess der Apoptose mündet in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und führt nachfolgend zum programmierten Zelltod. Aufgrund der engen Assoziation zu morphologischen und biochemischen Veränderungen gilt die Aktivität der Caspase 3 als universeller Marker der Apoptose [130,131]. Der Nachweis von *cleaved-Caspase 3*, der aktivierten Form, ist somit ein Indikator dafür, dass Zellen sich im exekutiven Schritt der Apoptose befinden [16].

Der quantitative Nachweis der *cleaved-Caspase 3* erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Nach Permeabilisierung der Zellmembran erfolgt eine intrazelluläre Färbung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern und anschließender Detektion am Durchflusszytometer.

Die Ansätze erfolgten in einer T75-Zellkulturflasche mit  $6 \times 10^6$  Zellen in 18 ml Vollmedium für 48 h. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimalig gewaschen und die Zellzahl bestimmt (3.2.1.2). Pro Ansatz wurden in 2 FACS-Röhrchen je  $1 \times 10^6$  Zellen in 450 µl PBS pipettiert. Ein Röhrchen diente ohne Zusatz von Antikörpern als Kontrolle. Im nächsten Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 min bei RT. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert (8 min, 200 x g), in 450 µl PBS suspendiert und 150 µl 16 %iges Formaldehyd zugesetzt. Im Anschluss wurden 2 ml PBS je Röhrchen hinzu pipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Zur Permeabilisierung wurde das Zellpellet in 100 µl PBS suspendiert und langsam mit 900 µl eiskaltem Methanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte die Lagerung über Nacht bei -20°C. Am folgenden Tag wurden die Proben zweimalig gewaschen, zunächst mit 2 ml PBS und anschließend mit 2 ml Inkubationspuffer (0,5 g BSA in 100 ml PBS gelöst). Die Zellpellets wurden daraufhin 10 min bei RT mittels einer 0,5 %igen BSA-Lösung in PBS geblockt und im Anschluss für 1 h mit dem Antikörper im Dunkeln bei RT inkubiert. Vor der Messung am BD FACSVerser™ Durchflusszytometer erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 2 ml Inkubationspuffer und die anschließende Resuspendierung in 300 µl PBS. Die Auswertung erfolgte mit der FACSuite™ Software (BD, Version 1.0.6.5230). Nach Kompensation mittels Istopenkontrolle wurde die *cleaved-Caspase-3* als relative Veränderung zur Kontrolle gemessen.

### 3.2.4.5 BAX-Translokations-Assay

Das proapoptotische BAX-Protein transloziert im Prozess der intrinsischen Apoptoseinduktion vom Zytosol an die äußere mitochondriale Membran. Durch Homo- und Heterodimerisierung der Effektorproteine BAX und BAK führt dies über Porenbildung zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und über die nachfolgende Freisetzung von Cytochrom c zum programmierten Zelltod. Ziel der Methodik ist der Nachweis der BAX-Translokation mittels Immunfluoreszenz. Hierzu werden die Mitochondrien mittels Mitospy-Red-Farbstoff und das BAX-Protein über einen Primärantikörper und einen farblich markierten Sekundärantikörper spezifisch gebunden. In der Immunfluoreszenzmikroskopie stellen sich somit die Mitochondrien rot und das BAX-Protein grün dar. Im Fall einer Translokation des Proteins BAX an die mitochondriale Membran kommt es zu einer Überlagerung beider Farbsignale, was als Korrelat der Translokation in der Immunfluoreszenz ein gelbes Farbsignal emittiert (Abbildung 9).



**Abb. 9: BAX-Translokations-Assay**

Exemplarische Immunfluoreszenzmikroskopie (SEM, DMSO, 400-fache Vergrößerung). Von links nach rechts: das angefärbte Protein BAX, die Mitochondrien und zuletzt die simultane Darstellung.

Die Ansätze erfolgten wie unter 3.2.3.1 beschrieben in einer 24-well-Platte für 48 h. Vor der Zytozentrifugation erfolgte die Inkubation mit dem Farbstoff Mitospy-Red. Dazu wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (180 x g, 10 min) und mit 3 ml warmem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 250 nM Mitospy-Red in 1,5 ml Vollmedium suspendiert und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Zytospins, wie unter 3.2.4.1 beschrieben. Nach kurzem Trocknen wurden die Objektträger für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert. Im ersten Schritt der BAX-Färbung wurden die Objektträger mit je 50 µl 0,1 % Triton X100 in PBS für 10 min in einer feuchten Kammer permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 20) wurden die Zellen für 60 min in 1 % BSA in PBS geblockt. Es folgte direkt die Inkubation mit dem gegen BAX gerichteten Primärantikörper in einer feuchten Kammer für 60 min bei RT. Nach weiteren drei Waschschritten für je 10 min mit PBST wurde anschließend der Sekundärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Zuletzt erfolgten drei weitere Waschschriffe mit PBST und darauffolgend einer mit PBS für je 10 min, bevor die Objektträger mit einen Tropfen Eindeckmedium (ROTI®Mount FluorCare)

eingedeckelt wurden. Nach 1 h Trocknungszeit bei RT erfolgte die Analyse am Zeiss Mikroskop (Axio Observer inverted microscope mit Apotom) bei 400-facher Vergrößerung. Zur Darstellung der überlagerten Aufnahmen wurde die ZEN lite-Software (Version 3.5) genutzt. Die Kontrastanpassung erfolgte orientiert am „optimal fit“, um eine Überbelichtung zu vermeiden.

Zur weiteren Auswertung wurde eine quantitative Colokalisationsanalyse der BAX/Mitochondrien-Überlagerung mittels Coloc2-Plugin in der Fiji-Software und Korrelation über Pearson-Koeffizient angedacht. Aufgrund schwerer morphologischer Schäden der Zellen infolge der Inhibitor-Inkubation war diese nicht zuverlässig durchführbar. Es erfolgten stattdessen in mindestens drei biologischen Replikaten Analysen von mindestens drei separaten Bereichen pro Replikat. Nach visueller Einschätzung ist eine repräsentative graphische Darstellung der Translokation in den Ergebnissen abgebildet.

### 3.2.5 Analyse der intrazellulären Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie

Die quantitative Analyse der intrazellulären Proteinexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Grundlage der Methodik ist eine spezifische Bindung der zu untersuchenden Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierzu erfolgt nach Permeabilisierung der Zellen eine intrazelluläre Färbung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern und anschließender Detektion am Durchflusszytometer. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome mit variierenden Absorptions- und Emissionsbereichen (Tabelle 9) kann die Expression von bis zu vier Proteinen gleichzeitig nachgewiesen werden. Die Inkubation beider Zelllinien mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren, sowie die weitere Aufarbeitung der Proben bis zur Analyse am BD FACSVerser™ Durchflusszytometer erfolgte analog zu der Methodik 3.2.4.4. Alle Ansätze wurden in mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt und für 48 h inkubiert.

**Tabelle 9: Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe**

Fluorochrom	Absorptions-max. [nm]	Emissions-max. [nm]	Farbbereich
Alexa Fluor 488	495	519	grün
PE	480; 565	578	gelb
Alexa Fluor 647	650	668	rot
PerCP-Cy5.5	482	695	stark rot

Die Auswertung erfolgte mit der FACSuite™ Software (BD, Version 1.0.6.5230). Nach Kompensation mittels Isotypenkontrollen wurde innerhalb der *dot-plot*-Diagramme das Gate an die basale Expression der Kontrolle angeglichen. In folgenden Detektionen wurden somit die prozentualen Veränderungen zur Kontrolle gemessen. Die simultan nachgewiesenen Proteine je

Panel sind in Tabelle 10 als Übersicht zusammengestellt. Für jeden Ansatz erfolgte zudem eine Kontrolle ohne Antikörperzusatz.

**Tabelle 10: Simultaner Nachweis der Proteinexpression**

Antikörper-Konjugat	Panel 1	Panel 2	Kontrolle
Alexa Fluor 488	pAKT	<i>cleaved</i> -Caspase-3	-
PerCP-Cy5.5	BCL-2	BCL-xL	-
Alexa Fluor 647	pBCL-2	-	-
PE	MCL-1	BAX	-

### 3.2.6 Analyse der Genexpression mittels *targeted RNA sequencing*

Zur Analyse der Genexpression wurden die Versuchsreihen eigenständig angesetzt und bis zur RNA-Isolierung selbständig durchgeführt. Alle weiteren Schritte, die sich der RNA-Isolierung anschlossen, erfolgten durch das hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin, Klinik III – Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, nach Qualitätsstandards der Routinediagnostik. Nachfolgend wird daher vorwiegend das Funktionsprinzip des *targeted RNA sequencing* und nicht der detaillierte Handlungsablauf beschrieben. Die bioinformatische Auswertung der Daten war wiederum Bestandteil der Promotionsarbeit.

#### 3.2.6.1 RNA-Isolierung

Das Prinzip der Säulen-basierten RNA-Isolierung beruht auf einer spezifischen Bindung der RNA an eine Silica-Membran, während andere Zellbestandteile ausgewaschen werden. Die Zellen werden zunächst lysiert und mittels Guanidin-Thiozyanat-Puffer die enthaltenen RNAsen deaktiviert. Das bearbeitete Zell-Lysat wird anschließend auf eine Silica-Membran pipettiert. Durch Zentrifugation und Waschschriffe werden ungebundene Fraktionen aus dem System entfernt und erst im letzten Schritt die aufgereinigte RNA von der Membran eluiert. Nach 24-stündiger Inkubation mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren (3.2.3.1) wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen (180 x g, 10 min). Im Anschluss wurde das Zellpellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (2000 x g, 5 min) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 700 µl QIAzol Lysis Reagent gelöst. Falls keine direkte Aufarbeitung erfolgte, wurde die Suspension unmittelbar bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolierung wurde mittels RNeasy Mini Kit und DNase zur Aufreinigung der Probe nach Protokoll des Herstellers unter dem Abzug durchgeführt und in

20µl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration am Nanodrop-Spektralphotometer und eine unmittelbare Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung.

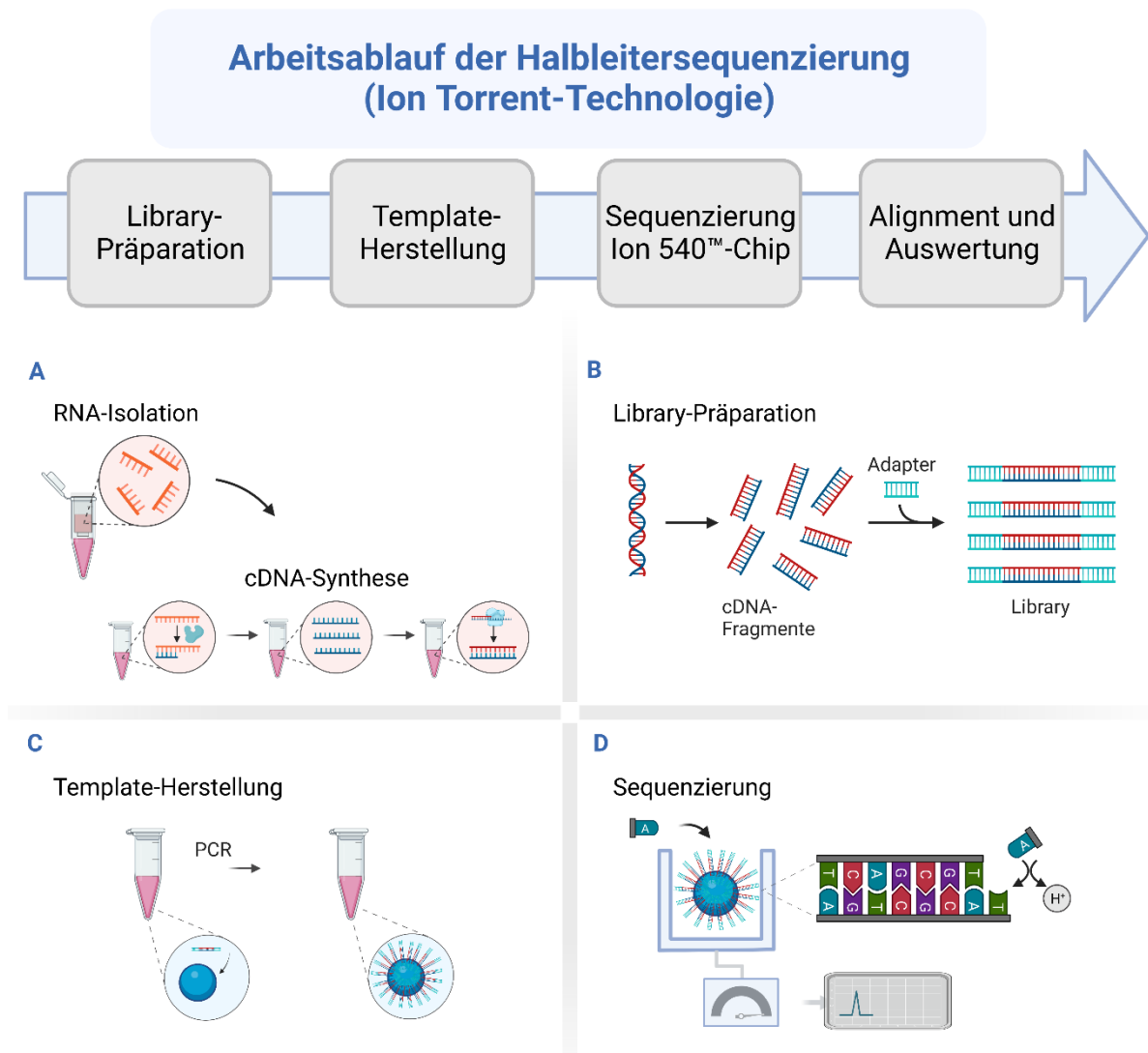
### 3.2.6.2 *Library-Präparation und Sequenzierung*

Die Sequenzierung der RNA-Proben erfolgte mittels Ion Torrent-basiertem *Next Generation Sequencing* (NGS) und gliedert sich in die Synthese einer komplementären DNA (cDNA), *library-Präparation*, *template*-Herstellung und die Sequenzierung (Abbildung 10). Das Funktionsprinzip von Ion Torrent™ basiert auf einer pH-Wert-Änderung, welche nach Bindung eines Nukleotids über die Protonenabspaltung detektiert und folgend in elektrische Signale umgewandelt wird.

Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase Reverse Transkriptase wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und ist zunächst mit der RNA hybridisiert. Anschließend wird über eine RNase die RNA abgebaut und mittels Ligation eines Primers und DNA-abhängiger DNA-Polymerase eine doppelsträngige cDNA synthetisiert. Im Vergleich zur genomischen DNA enthält die cDNA keine Intron-Bereiche.

Nach Vervielfältigung der cDNA über eine Multiplex-PCR erfolgt die Ligation von Adaptoren und probenindividuellen Barcodes. In der weiteren Aufarbeitung erfolgt eine *library*-Quantifizierung durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) zur Einstellung gleicher DNA-Konzentrationen. Die präparierten DNA-Stränge werden anschließend an *spheres* gebunden und hiermit der Chip zur Sequenzierung beladen. Im Prozess der Sequenzierung wird mit jedem Spülvorgang (*flow*) die DNA in einer Pore mit einem definierten Nukleotid umspült. Im Falle einer Bindung wird über die Abspaltung eines Protons ein Spannungswechsel gemessen und somit die Nukleotidsequenz der Probe ermittelt.

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ IV VILO™ Master-Mix gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Expressionsanalysen erfolgten mit dem Ion GeneStudio S5™ Plus System. Hierzu wurde mit dem Ion AmpliSeq Designer ein individuelles Panel mit 214 Genen zum Nachweis der Regulation von Schlüsselgenen der Apoptose, des PI3K/AKT-Signalwegs und anderer relevanter Kaskaden leukämischer Zellen erstellt (Anhang, Tabelle S1). Die Ion AmpliSeq RNA Libraries wurden gemäß Herstellprotokoll mit dem Qubit™ RNA HS Assay Kit, Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus und dem Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit präpariert. Die sich anschließende Aufarbeitung des *templates* wurde mit dem Ion 540™ Kit-Chef mittels Ion Chef durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Ion GeneStudio S5™ Plus System und 500 *flows*.



**Abb. 10: Übersicht des Ion Torrent-NGS-Verfahrens**

Abbildung adaptiert nach [132,133]. Erstellt mit BioRender.com.

### 3.2.6.3 Auswertestrategie der RNA-Sequenzierung

Die Datenanalyse erfolgte mit der *Transcriptome Analysis Console (TAC)* Software (Thermo Fisher Scientific, Version 4.0.2.15). Die durchgeführten biologischen Replikate ( $\geq 2$ ) wurden als wiederholte Messung definiert. Gene mit einer mittleren Lesetiefe von weniger als 50 *total reads* wurden aufgrund mangelnder biologischer Relevanz in den Analysen nicht betrachtet (*cut off*). Als signifikant reguliert wurden Gene mit p-Wert  $< 0,05$  und einer Veränderung der Expression mit einem *fold change* von  $> 2$  oder  $< -2$  gegenüber der Kontrolle definiert. Eine vollständige Auflistung der untersuchten Gene und verwendete Abkürzungen sind im Anhang der Arbeit beigefügt (9.2, Tabelle S1).

### 3.2.7 Statistik

Um valide und reproduzierbare Ergebnisse zu generieren, wurden für jeden Versuch mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Hierzu stammte jeder Ansatz aus einer anderen Passage der Zelllinie. Für Datenreihen mit weniger als drei Replikaten erfolgte keine statistische Analyse. Die statistische Auswertung erfolgte in dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 8.0.2). Im ersten Schritt wurden die erhobenen Werte mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und daraus der entsprechend zu verwendende parametrische oder nicht-parametrische statistische Test abgeleitet. Die jeweils genutzten Testverfahren für alle statistischen Analysen sind in den Abbildungslegenden aufgeführt. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt festgelegt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

Zur Identifikation synergistischer Kombinationen wurde das Unabhängigkeitsmodell nach Bliss angewandt [134]. Basierend auf dargestellter Formel wurde ein Erwartungswert (E) der Kombination berechnet. Dieser ergibt sich aus der Wirkung der beiden Einzelsubstanzen, in der Formel als A und B bezeichnet.

$$E = (A + B) - (A * B)$$

Zur Errechnung des Bliss-Wertes der synergistischen Aktivität wurde von dem Ergebnis der Kombination der Erwartungswert subtrahiert. Resultierende Werte  $> 0$  implizieren eine synergistische Wirkung der Kombination, während Werte  $< 0$  auf antagonistische Effekte hindeuten.

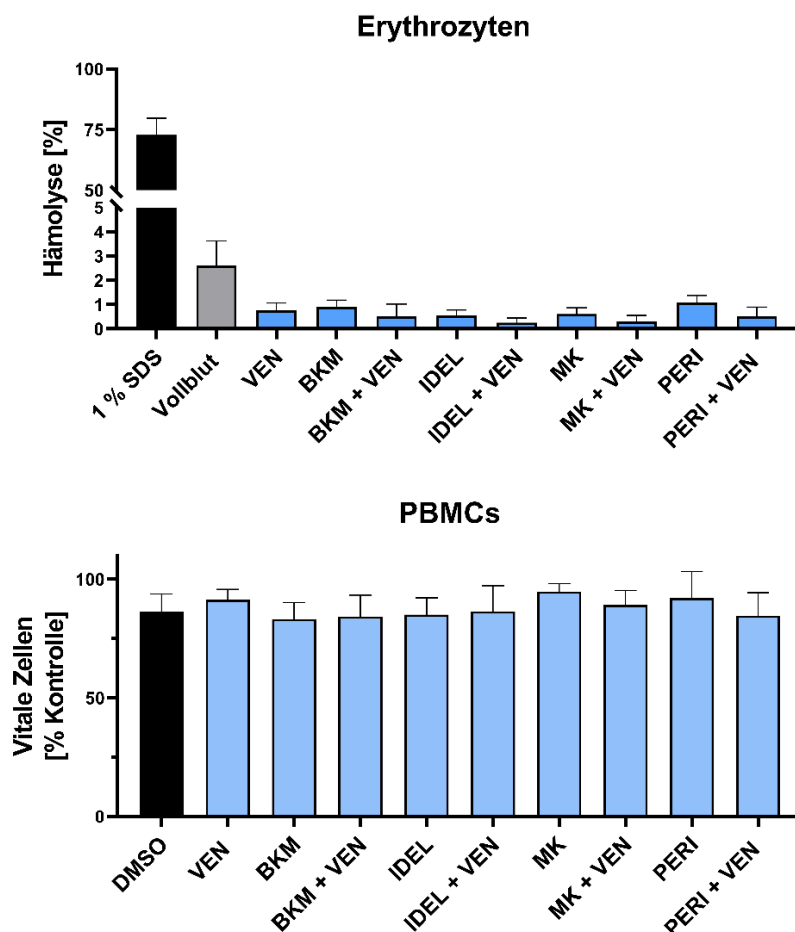
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zytotoxische Effekte durch kombinierte BCL-2 und PI3K/AKT-Inhibition

Zum Ausschluss unspezifischer zytotoxischer Effekte auf physiologische Zellen des Blutes wurde vor den Versuchsreihen in den leukämischen Zelllinien ein Hämolyse- und Zytotoxizitäts-Assay mit den Maximalkonzentrationen der verwendeten Inhibitoren durchgeführt (Abbildung 11).

Im Hämolyse-Assay konnte nach Inkubation mit 1 % SDS ein Anteil von 72,8 % Hämolyse nachgewiesen werden, wohingegen der Zusatz von Vollblut einen Anteil von 2,6 % aufwies. Der höchste detektierte Hämolyse-Anteil unter den Ansätzen mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren zeigte sich nach einzelner Applikation von Perifosin mit 1,1 %.

Die Ergebnisse des Calcein AM-Assays sind in prozentualer Relation zu einer Probe ohne Zusatz dargestellt. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in keinem Ansatz eine relevante Minderung der Vitalität der PBMCs.



**Abb. 11: Einfluss der getesteten Kombinationen auf die Viabilität physiologischer Blutzellen**

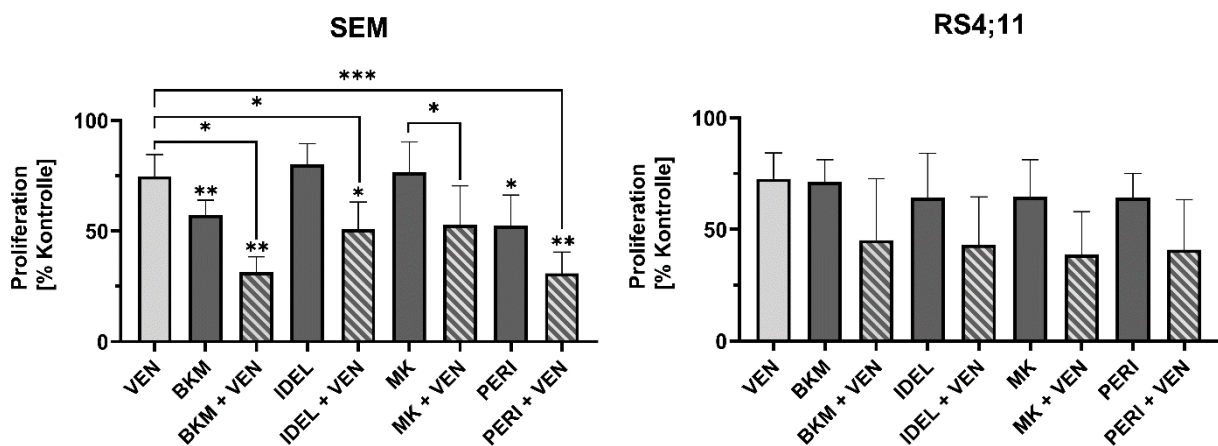
Hämolyse- und Calcein AM-Assay zur Evaluation der Toxizität gegenüber Erythrozyten und PBMCs nach 24 h Inkubation. MW  $\pm$  SD, n = 5 gesunde Spender.

## 4.2 Antiproliferative Effekte durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition

Zur Untersuchung antiproliferativer Effekte durch Venetoclax und der PI3K/AKT-Inhibitoren wurde der Einfluss auf Proliferation und metabolische Aktivität in den beiden B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 analysiert. Neben den einzelnen und simultanen Applikationen der Inhibitoren wurden sequenzielle Kombinationsstrategien mittels WST-1-Assay untersucht. Die verwendeten Konzentrationen basieren auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und entsprechen den IC<sub>20/30</sub>-Konzentrationen, was eine sinnvolle Beurteilung potenzieller synergistischer Effekte zulässt. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 7 (Methodenteil, 3.2.3.1) angegeben.

### 4.2.1 Einfluss auf die Proliferation

In beiden Zelllinien zeigte sich in allen Ansätzen eine Reduktion der Proliferation nach 72 h. Die Einzelapplikationen lagen nahe an der angestrebten Proliferation von 70 % gegenüber der Kontrolle. Vergleichend wiesen die mit Venetoclax kombinierten Applikationen eine stärkere Hemmung der Proliferation auf als die Monoapplikationen. Als Kontrolle diente eine mit DMSO inkubierte Probe, welche uneingeschränkt proliferierte (Abbildung 12).



**Abb. 12: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Proliferation**

Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung und lichtmikroskopischer Auswertung nach 72 h Inkubation. W + SD, n ≥ 3, N OV und *post-hoc Tukey's multiple comparison* Test. Signifikanz gegenüber der DMSO-Kontrolle, wenn nicht anders angegeben.

In der Zelllinie SEM resultierten die kombinierten Applikationen von Venetoclax mit den PI3K-Inhibitoren BKM-120 und Idelalisib, sowie des AKT-Inhibitors Perifosin in einer signifikant reduzierten Zellzahl gegenüber der Kontrolle und einzelner Applikation von Venetoclax. Der pan-AKT-Inhibitor MK-2206 bewirkte in simultaner Gabe mit Venetoclax vergleichbare, jedoch nicht signifikante Effekte. Die Kombinationen mit Perifosin, BKM-120 und Idelalisib wiesen in RS4;11-Zellen eine zwar nicht signifikante, aber tendenziell vergleichbare Hemmung der Proliferation zur Zelllinie SEM auf.

Zur Identifikation synergistischer Kombinationen wurde das Unabhängigkeitsmodell nach Bliss verwendet (Tabelle 11) [134]. In beiden Zelllinien ergab die Kalkulation nach Bliss für alle Kombinationen positive Werte. Den höchsten Wert zeigte die Kombination von Venetoclax und BKM-120 in SEM-Zellen (0,113). Alle weiteren Kombinationen ergaben leicht geringere Werte.

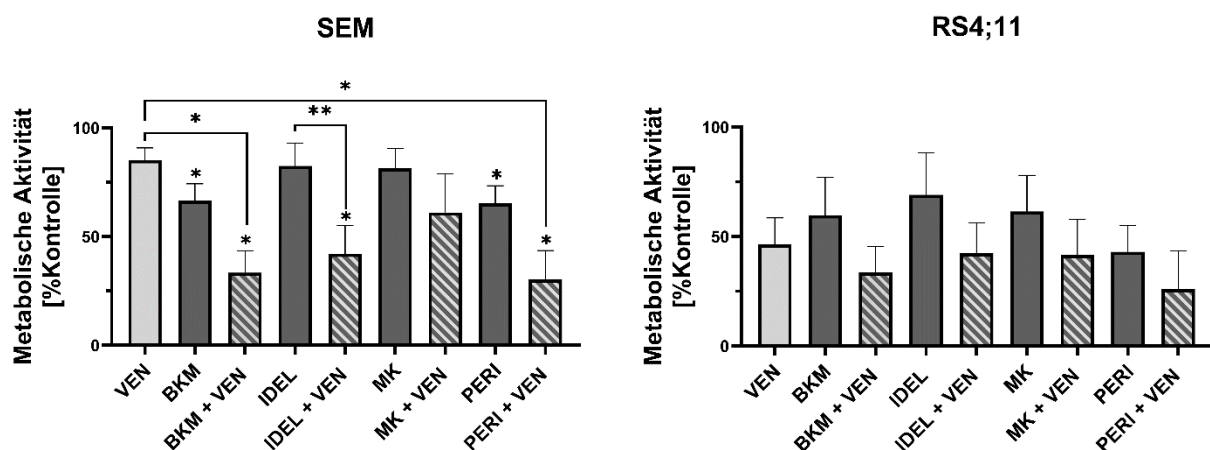
**Tabelle 11: Evaluation synergistischer antiproliferativer Aktivität**

Kombinationen mit Venetoclax	SEM	RS4;11
BKM-120	0,113	0,066
Idelalisib	0,092	0,036
MK-2206	0,045	0,082
Perifosin	0,084	0,057

Werte im Bereich  $\Delta > 0$  implizieren eine synergistische Wirkung der Kombination (grün), während  $\Delta < 0$  auf antagonistische Effekte hinweisen (rot).

#### 4.2.2 Einfluss auf die metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der B-ALL-Zellen wurde mittels WST-1-Assay bestimmt (Abbildung 13). Die kombinierte Applikation von Venetoclax mit Perifosin, BKM-120 oder Idelalisib reduzierte signifikant die metabolische Aktivität in SEM-Zellen gegenüber der Kontrolle. Die simultane Inkubation von Venetoclax und MK-2206 erwies geringere Effekte, jedoch stärkere als die Einzelapplikationen.



**Abb. 13: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die metabolische Aktivität**

Analyse der metabolischen Restaktivität mittels WST-1-ssay nach 72 h Inkubation. W + SD,  $n \geq 3$ , ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison* Test. Signifikanz zu der DMSO-Kontrolle, wenn nicht anders angegeben.

In der Zelllinie RS4;11 resultierten alle Kombinationen in einer stärkeren Inhibition des Metabolismus als die Monoapplikationen. Perifosin induziert unter den PI3K/AKT-Inhibitoren die

stärksten Effekte und die Kombination von Perifosin und Venetoclax wies die höchste Reduktion der metabolischen Aktivität auf. Die simultane Gabe von BKM-120, Idelalisib oder MK-2206 mit Venetoclax zeigte vergleichbare Resultate zu den Ergebnissen in SEM-Zellen. Auf Grundlage der metabolischen Inhibition wurde für jede Kombination von Venetoclax mit den PI3K/AKT-Inhibitoren ein Bliss-Wert errechnet (Tabelle 12). Die Kombinationen von Venetoclax und BKM-120 (0,233), Idelalisib (0,281) oder Perifosin (0,252) implizieren auf gleichem Niveau hohe synergistische Werte in SEM-Zellen. Die simultane Applikation von Venetoclax und MK-2206 (0,082) induzierte leicht geringere, jedoch synergistische Effekte nach Bliss. In der Zelllinie RS4;11 erwies einzig die Kombination von Venetoclax und Perifosin einen positiven Bliss-Wert. Die simultane Gabe von Venetoclax und BKM-120 deutet auf keine antagonistischen Effekte hin, während die Applikationen von Idelalisib oder MK-2206 mit Venetoclax leicht negative Werte ergaben.

**Tabelle 12: Evaluation synergistischer Inhibition des Metabolismus**

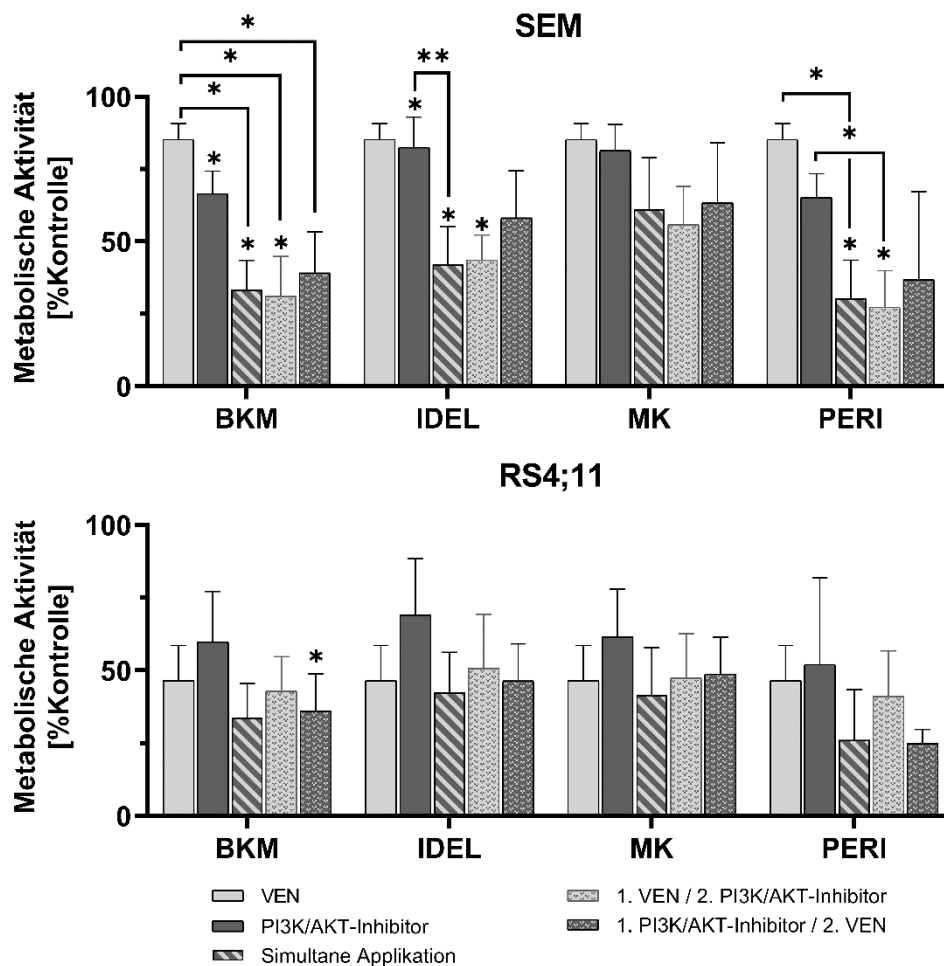
Kombinationen mit Venetoclax	SEM	RS4;11
BKM-120	0,233	-0,004
Idelalisib	0,281	-0,039
MK-2206	0,082	-0,072
Perifosin	0,252	0,029

Werte  $\Delta > 0$  implizieren eine synergistische Wirkung (grün) der Kombination, während  $\Delta < 0$  auf antagonistische Effekte (rot) hinweisen.

### 4.2.3 Evaluation sequenzieller Applikationsstrategien

Zur Evaluation der optimalen Applikationssequenz wurden Venetoclax und die PI3K/AKT-Inhibitoren zeitversetzt appliziert und der Einfluss auf die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay untersucht. Die unterschiedlichen Sequenzen sind vergleichend zur einzelnen und simultanen Applikation der Inhibitoren dargestellt (Abbildung 14).

Zwischen den einzelnen Applikationsregimen konnten nur diskrete Unterschiede beobachtet werden. Es zeigte sich dabei keine signifikant bessere Sequenz. In SEM-Zellen zeichnete sich die leichte Tendenz ab, dass primäre Gabe von Venetoclax oder die simultane Inkubation eine höhere Effektivität aufwies. In der Zelllinie RS4;11 bewirkte keine Variante der sequenziellen Applikation eine stärkere Inhibition der metabolischen Aktivität im Vergleich zur simultanen Inkubation.



**Abb. 14: Einfluss der Applikationssequenzen auf die metabolische Aktivität**

Untersuchung variierender Applikationssequenzen mittels WST-1-Assay nach 72 h Inkubation. MW + SD,  $n \geq 3$ , ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison* Test. Signifikanz zu der DMSO-Kontrolle, wenn nicht anders angegeben.

In SEM-Zellen konnte in allen Kombinationsansätzen synergistisches Potential nachgewiesen werden (Tabelle 13). Während die simultane Inkubation und die vorrausgehende Applikation

mit Venetoclax vergleichbare Resultate aufwiesen, zeigte die Sequenz 1.PI3K/AKT-Inhibitor/2.Venetoclax niedrigere Bliss-Werte. In allen Applikationsregimen erwies die Kombination von Venetoclax und MK-2206 eine geringere Synergie im Vergleich zu den weiteren Ansätzen. Berechnungen zur synergistischen Aktivität in RS4;11-Zellen ergaben neutrale bis leicht antagonistische Werte bei simultaner Applikation und implizierten verstärkte antagonistische Effekte bei sequenzieller Inkubation der Inhibitoren.

Schlussfolgernd ließ sich aus Sicht der metabolischen Inhibition keine eindeutig effektivere Applikationssequenz identifizieren. Es zeigten sich diskrete Veränderungen der Wirksamkeit mit unterschiedlichen Präferenzen zwischen den Zelllinien. Für alle folgenden Experimente wurde daher die simultane Applikation der Inhibitoren gewählt.

**Tabelle 13: Evaluation synergistischer Aktivität in Abhängigkeit von der Applikationssequenz**

<b>SEM Kombinationen</b>	<b>Simultan</b>	<b>1. Venetoclax 2. PI3K/AKT</b>	<b>1. PI3K/AKT 2. Venetoclax</b>
BKM-120	0,233	0,218	0,131
Idelalisib	0,281	0,237	0,145
MK-2206	0,082	0,095	0,071
Perifosin	0,252	0,267	0,179

<b>RS4;11 Kombinationen</b>	<b>Simultan</b>	<b>1. Venetoclax 2. PI3K/AKT</b>	<b>1. PI3K/AKT 2. Venetoclax</b>
BKM-120	-0,004	-0,107	-0,175
Idelalisib	-0,039	-0,144	-0,264
MK-2206	-0,072	-0,157	-0,243
Perifosin	0,029	-0,095	-0,101

Werte  $\Delta > 0$  implizieren eine synergistische Wirkung (grün) der Kombination, während  $\Delta < 0$  auf antagonistische Effekte (rot) hinweisen.

### 4.3 Apoptotische Prozesse durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition

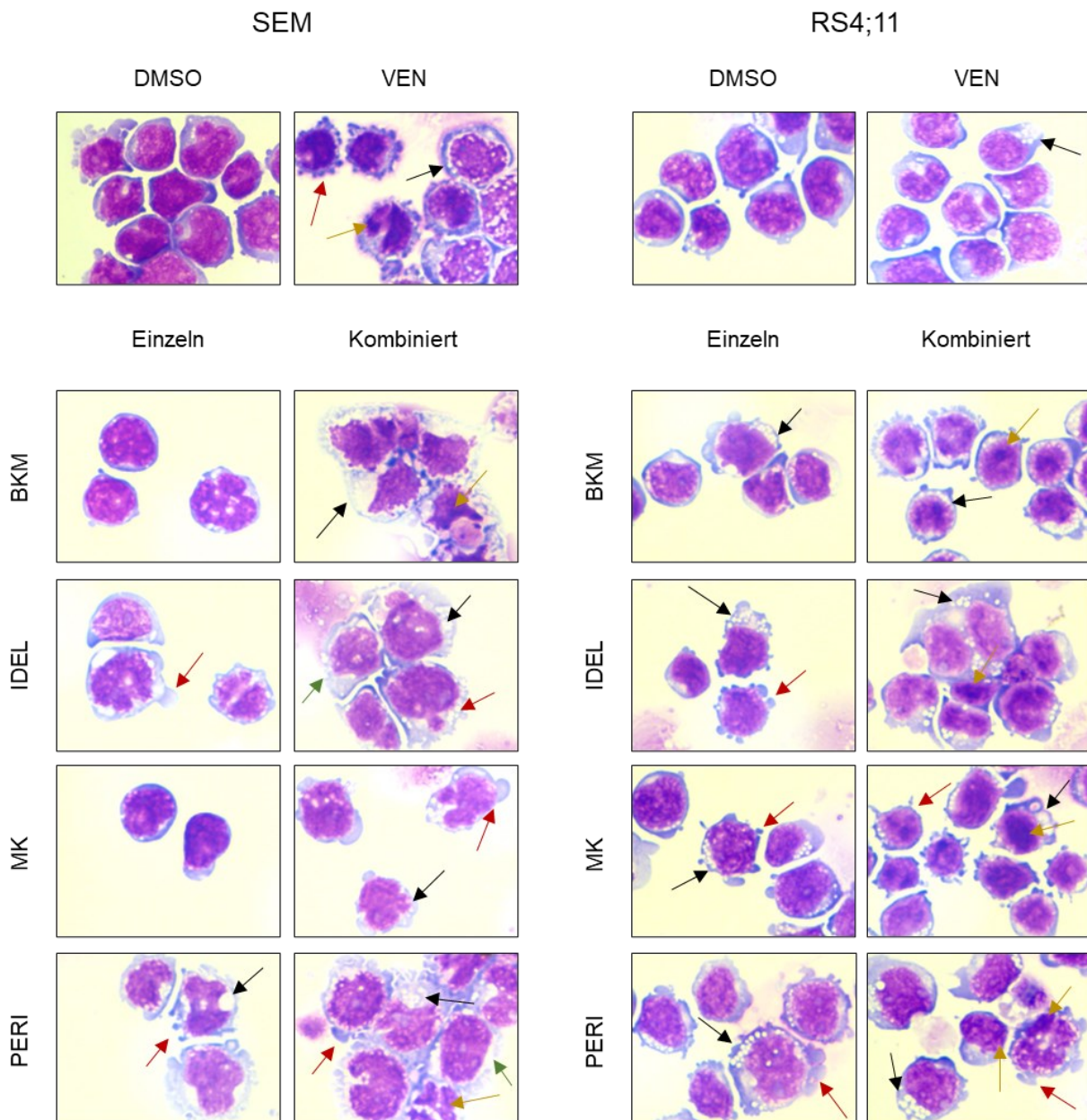
#### 4.3.1 Einfluss auf die Zellmorphologie

Die Charakterisierung zellmorphologischer Veränderungen erfolgte mittels Pappenheim-Färbung. Hierzu wurden die beiden Zelllinien SEM und RS4;11 mit Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit DMSO. Die beiden B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 präsentieren im nativen Zustand ein rundes, homogenes Erscheinungsbild mit großen eosinophilen Zellkernen. Das basophile und kaum vakuolisierte Zytoplasma nimmt als Randsaum deutlich weniger Platz ein als der Nukleus. Die Applikation von Venetoclax bewirkte in SEM-Zellen schwere morphologische Veränderungen mit beginnenden Abschnürungen von apoptotischen Körperchen (Abbildung 15, rote Pfeile) und in RS4;11-Zellen leicht schwächere Effekte. Den stärksten Einfluss in Monoapplikation bewirkte der AKT-Inhibitor Perifosin, welcher in beiden Zelllinien vergleichbare Resultate zur Inkubation mit Venetoclax aufwies. Die Applikation des AKT-Inhibitors MK-2206 führte in der Zelllinie RS4;11 zu moderaten morphologischen Veränderungen, zeigte jedoch einen schwächeren Einfluss auf SEM-Zellen. Der PI3K-Inhibitor Idelalisib resultierte in einer moderaten Vergrößerung der Zellen und Vakuolenbildung (schwarze Pfeile), es zeigten sich zudem vereinzelt Abschnürungen apoptotischer Körperchen (rote Pfeile). Die Inkubation mit BKM-120 bedingte in beiden Zelllinien nur leichte morphologische Veränderungen.

Bei Kombination von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren zeigte sich eine Akzeleration der Einzelwirkung, wobei diese weiter abgestuft werden konnte. Der stärkste Einfluss wurde nach Kombination von Venetoclax und dem AKT-Inhibitor Perifosin in beiden Zelllinien beobachtet. Die Zellen waren vergrößert, das Zytoplasma stark vakuolisiert und die Zellmembran verlor in SEM-Zellen abschnittsweise ihre Integrität (grüner Pfeil). In beiden Zelllinien zeigten sich verstärkt zytoplasmatische Ausläufer, Abschnürungen von Zellbestandteilen (schwarze Pfeile) und kondensiertes Chromatin (goldene Pfeile) im Vergleich zu der Kontrolle. Auch die Zellkerne veränderten sich in ihrer physiologischen Morphologie und verloren ihre Sphärizität. Die zeitgleiche Inkubation von Venetoclax und MK-2206 resultierte in SEM-Zellen als einzige Kombination in keiner gesteigerten Wirkung im Verhältnis zu der Venetoclax-Monoapplikation. In der Zelllinie RS4;11 wiesen die Zellen im Gegensatz verstärkt zytoplasmatische Ausläufer, kondensiertes Chromatin und eine Vakuolisierung des Zytoplasmas bei gleicher Kombination auf.

Die Gabe von Venetoclax und dem PI3K-Inhibitor BKM-120 bewirkte vergleichbare Resultate zu der Kombination mit Perifosin in SEM-Zellen. In der Zelllinie RS4;11 waren die Effekte schwächer ausgeprägt, nichtsdestotrotz wurden apoptotische Körperchen und Chromatinverdichtungen ersichtlich. Die simultane Inkubation von PI3K-Inhibitor Idelalisib und Venetoclax resultierte in schweren morphologischen Veränderungen der SEM-Zellen, jedoch in einem ge-

ringeren Ausmaß als nach Applikation von Perifosin oder BKM-120 mit Venetoclax. In der Zelllinie RS4;11 zeigte die Kombination stärkere Effekte als die Applikation von BKM-120 mit Venetoclax. Der Einfluss auf die Blasten war deutlich durch Abschnürungen von apoptotischen Körperchen, Vakuolisierung des Zytoplasmas und verstärkter Verdichtungen des Chromatins charakterisiert (goldene Pfeile).

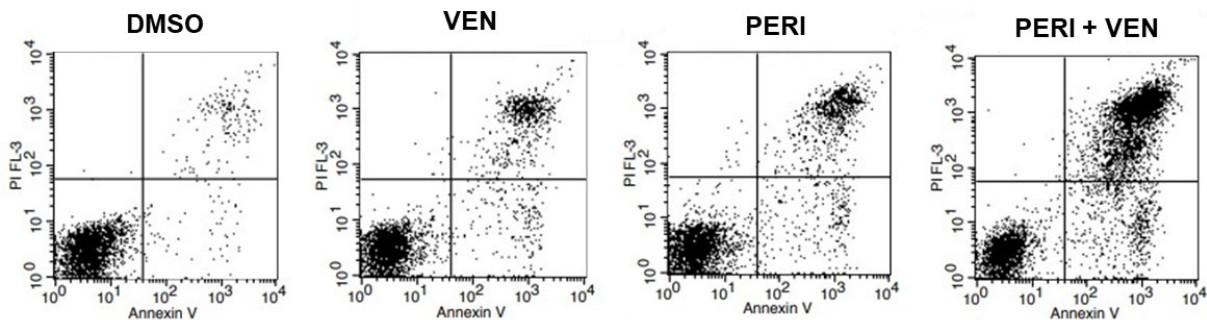


**Abb. 15: Mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie**

Charakterisierung morphologischer Veränderungen mittels Pappenheimfärbung. 100-fache Vergrößerung mit Immersi nsöl, 48 h Inkubation, n ≥ 3. Folgende morphologische Veränderungen sind durch farbliche Pfeile markiert: Vakuolisierung (schwarz), Apoptosekörperchen (rot), Verdichtungen des Chromatins (gold), Disintegrität der Zellmembran (grün).

### 4.3.2 Einfluss auf Apoptose-Marker in der Durchflusszytometrie

Die Rate apoptotischer Zellen wurde durch eine Doppelfärbung mit Annexin V und PI durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung und Gatingstrategie ist exemplarisch am Beispiel der einzelnen und simultanen Inkubation mit Venetoclax und Perifosin gegenüber einer DMSO-Kontrolle dargestellt (Abbildung 16). In Abbildung 17 sind die früh- und spät-apoptotischen Zellen als Apoptoserate zusammengefasst und anteilig an der Gesamtzellzahl abgebildet.



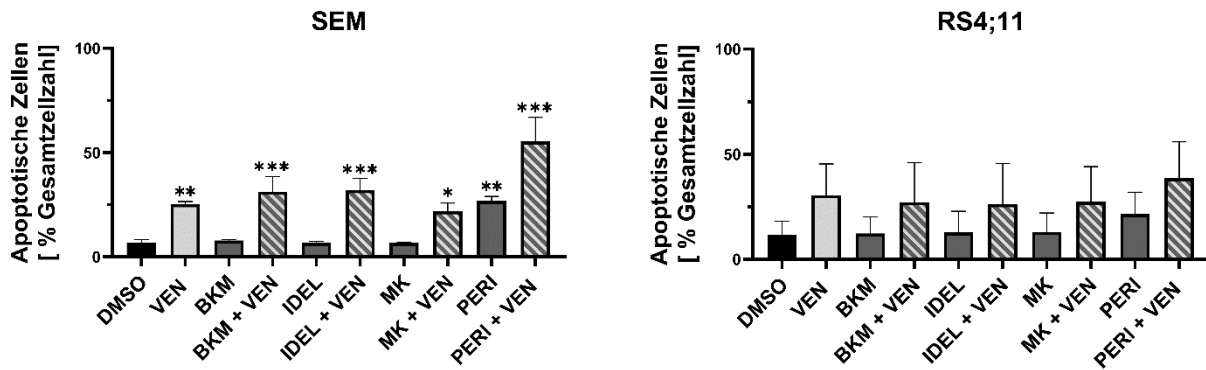
**Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Annexin V/PI-Färbung nach einzelner und kombinierter Applikation von Venetoclax und Perifosin in SEM-Zellen**

Durchflusszytometrische Analyse früh- und spät-apoptotischer Zellen mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung. Vitale Zellen (Annexin V-/PI-) unten links, früh-apoptotische Zellen (Annexin V+/PI-) unten rechts, spät-apoptotische/nekrotische Zellen (Annexin V+/PI+) oben rechts, Detritus oben links. Kontrollansatz mit DMSO, 48 h Inkubation.

In einzelner Applikation der PI3K/AKT-Inhibitoren löste im Bereich der gewählten IC<sub>20</sub>/30-Konzentrationen einzig der AKT-Inhibitor Perifosin in SEM- ( $27,0 \pm 1,7$  %) und RS4;11- ( $21,6 \pm 8,5$  %) Zellen eine zu Venetoclax (SEM:  $25,3 \pm 1,2$  %, RS4;11:  $30,4 \pm 12,2$  %) vergleichbare Induktion der Apoptose aus (Abbildung 17). Die weiteren Inhibitoren zeigten einen Anteil apoptotischer Zellen im Bereich der DMSO-Kontrolle.

In der Zelllinie SEM bewirkte die zeitgleiche Inkubation von Perifosin und Venetoclax einen stärkeren Anstieg der Apoptoserate ( $55,4 \pm 9,4$  %) gegenüber beiden Einzelapplikationen. Die simultane Applikation von Venetoclax und MK-2206 zeigte eine etwas geringere Induktion der Apoptose als die alleinige Venetoclax-Applikation. Die kombinierte BCL-2- und PI3K-Inhibition mit Venetoclax und BKM-120 oder Idelalisib resultierte in einer leicht erhöhten Apoptoserate gegenüber der Einzelapplikation von Venetoclax.

In der Zelllinie RS4;11 war einzig bei simultaner Gabe von Venetoclax und Perifosin ( $38,6 \pm 14,1$  %) eine geringfügige Steigerung der proapoptotischen Effekte der BCL-2-Inhibition ersichtlich. Die Kombinationen mit MK-2206, BKM-120 oder Idelalisib führten zu einer vergleichbaren Apoptoseinduktion wie die Venetoclax-Monoapplikation.



**Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate**

Durchflusszytometrische Analyse früh- und spät-apoptotischer Zellen über Annexin V/PI Doppelfärbung. Darstellung apoptotischer Zellen prozentual zu der Gesamtzellzahl. 72 h Inkubation. W + SD, n ≥ 3, ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*. Signifikanz zu der DMSO-Kontrolle, wenn nicht anders angegeben.

Weiter differenziert in früh- und spät-apoptotische Prozesse zeigte sich, dass die Kombination von Venetoclax und Perifosin vor allem in der Induktion früh-apoptotischer Zellen synergistische Aktivität aufwies, während sich spät-apoptotische Effekte neutral verhielten (Tabelle 14). Bei der Kombination von BKM-120 oder Idelalisib mit Venetoclax zeigten sich ausgewogene Bliss-Werte. Leicht antagonistische Effekte bei simultaner Gabe von Venetoclax und MK-2206 beruhen sowohl auf früh- als auch auf spät-apoptotischen Prozessen.

**Tabelle 14: Evaluation synergistischer Apoptoseinduktion**

SEM Kombinationen	Gesamt- Apoptoserate	Frühe Apoptose	Späte Apoptose
BK -120	0,000	-0,018	0,011
Idelalisib	0,017	-0,012	0,023
K -2206	-0,082	-0,031	-0,057
Perif sin	0,100	0,091	-0,016

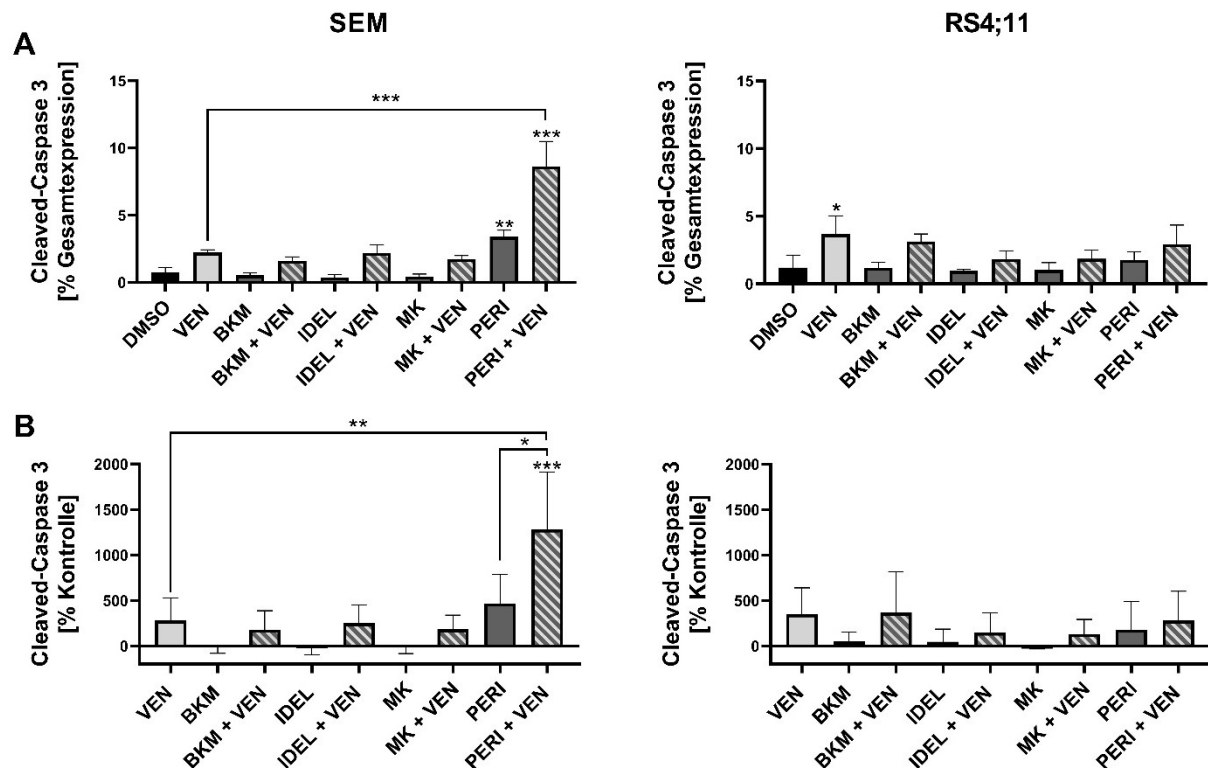
RS4;11 Kombinationen	Gesamt- Apoptoserate	Frühe Apoptose	Späte Apoptose
BKM-120	-0,119	-0,039	-0,970
Idelalisib	-0,131	-0,044	-0,104
MK-2206	-0,120	-0,048	-0,090
Perifosin	-0,069	-0,048	-0,049

Werte  $\Delta > 0$  implizieren eine synergistische Wirkung (grün) der Kombination, während  $\Delta < 0$  auf antagonistische Effekte (rot) hinweisen. Früh-apoptotische Zellen sind als Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> und spät-apoptotische Zellen Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> klassifiziert.

In der Zelllinie RS4;11 befanden sich alle Bliss-Werte im negativen Bereich. Die simultane Applikation von Perifosin und Venetoclax resultierte in schwach negativen Werten. Die Kombinationen mit BKM-120, Idelalisib und MK-2206 implizierten eine antagonistische Aktivität. In der Differenzierung der früh- und spät-apoptotischen Prozesse zeigten sich in allen Kombinationen stärkere antagonistische Effekte in der Induktion spät-apoptotischen Zellen.

### 4.3.3 Einfluss auf die Caspase 3-Aktivierung

Die Caspase 3 ist als Zymogen in der Zelle gespeichert und wird erst durch Spaltung aktiviert. Über den durchflusszytometrischen Nachweis von *cleaved*-Caspase 3 wird dieses aktivierte Schlüsselprotein der Endphase des programmierten Zelltods als Indikator der Apoptose verwendet. Für die Zelllinien SEM und RS4;11 ist die Gesamtexpression und die relative Änderung der *cleaved*-Caspase 3-positiven Zellen dargestellt (Abbildung 18). Relative Expressionsänderungen wurden innerhalb eines Ansatzes zu der entsprechenden DMSO-Kontrolle berechnet.



**Abb. 18: Nachweis der *cleaved*-Caspase 3-Expression**

Nachweis der *cleaved*-Caspase 3-Expression mittels Durchflusszytometrie nach 48 h Inkubation. A: Gesamtexpression, B: relative Veränderung zu der DMSO-Kontrolle. MW+ SD, n ≥ 3, ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

In SEM-Zellen induzierte Venetoclax eine 2,8-fach erhöhte Expression der *cleaved*-Caspase 3. Nach einzelner Applikation der PI3K/AKT-Inhibitoren resultierte einzig der AKT-Inhibitor Perifosin in einer zu Venetoclax vergleichbaren Wirkung. Alle weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren wiesen einzeln appliziert keine erhöhte Aktivität auf und zeigten in Kombination Effekte im Bereich der Venetoclax-Monoapplikation. Die zeitgleiche Inkubation mit Venetoclax und Perifosin induzierte einen 12-fachen Anstieg *cleaved*-Caspase 3-positiver Zellen.

In der Zelllinie RS4;11 induzierten bereits nanomolare Konzentrationen von Venetoclax eine 3,5-fach gesteigerte Expression der *Cleaved*-Caspase-3 im Vergleich zu der Kontrolle. Die einzelne Applikation der PI3K/AKT-Inhibitoren resultierte in keiner erhöhten Expression im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle. In Kombination zeigten sich gesteigerte Effekte maximal auf Niveau der Venetoclax-Monoapplikation.

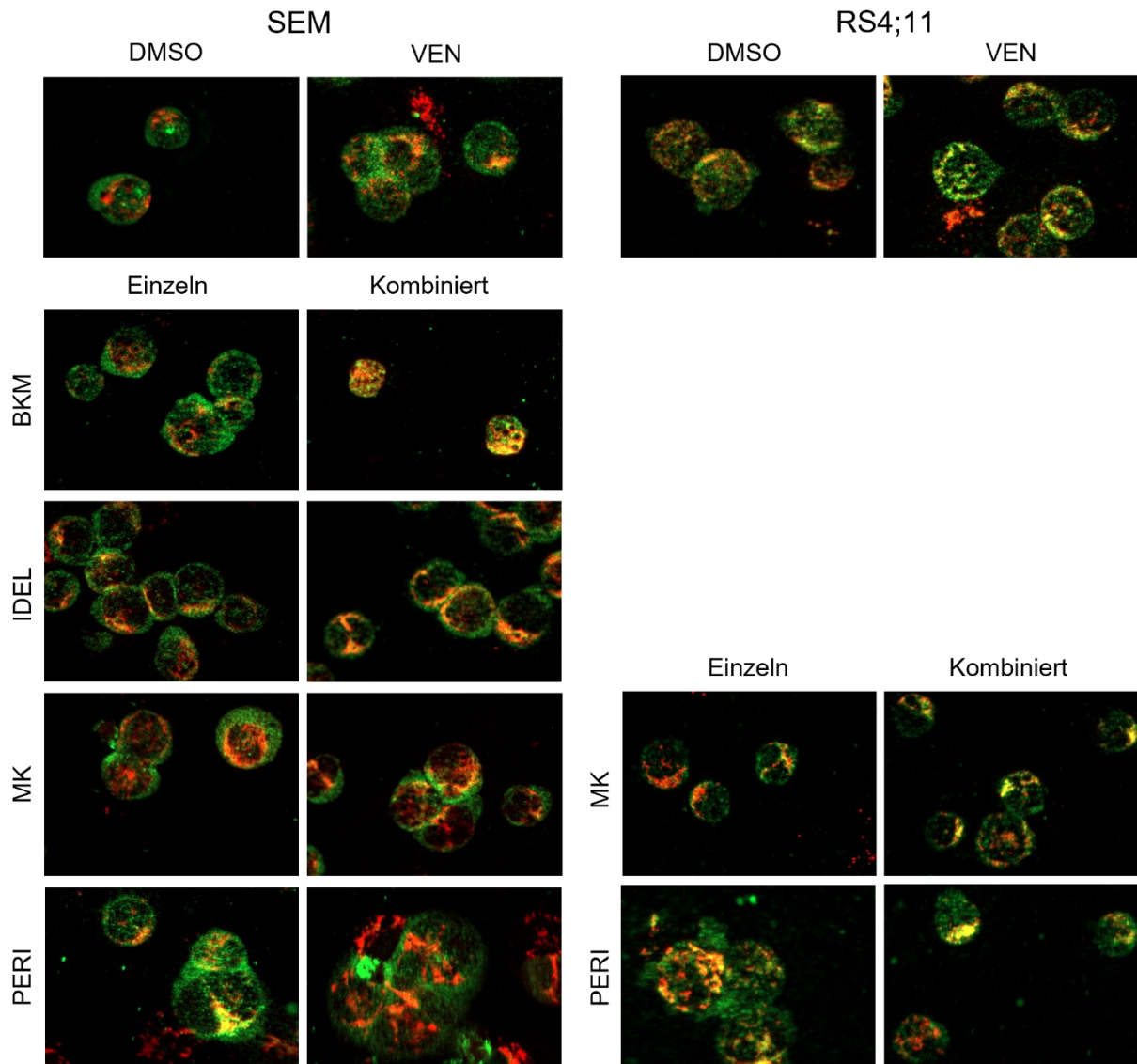
### 4.3.4 Einfluss auf die BAX-Translokation

Die Translokation des Effektorproteins BAX vom Zytosol an die äußere Mitochondrienmembran kann als Indikator für die Aktivität des intrinsischen Signalwegs der Apoptose verwendet werden. Diese Verlagerung wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Hierzu wurden spezifisch die Mitochondrien rot und das BAX-Protein grün markiert. Transloziert das BAX-Protein im Prozess der Apoptose, überlagern sich das rote und grüne Farbspektrum und führen zu einer gelben Fluoreszenz. In den Kontrollen stellten sich die emittierten Signale der Mitochondrien und von BAX separat dar (Abbildung 19). Da sich in den Untersuchungen der apoptotischen Prozesse vorwiegend eine durch Perifosin vermittelte Apoptoseinduktion in SEM-Zellen nachwies, ist die mechanistische Betrachtung mittels BAX-Translokations-Assay auf diese Zelllinie fokussiert. Um eine potenzielle Inhibitor der Apoptose *downstream* von BAX auszuschließen, haben wir in der Zelllinie RS4;11 die Effekte beider AKT-Inhibitoren einzeln und in Kombination mit Venetoclax gegenüber einer DMSO-Kontrolle evaluiert.

In beiden Zelllinien resultierte die Inkubation mit dem BCL-2-Inhibitor Venetoclax in einer gesteigerten BAX-Translokation. Einzeln appliziert bewirkten die PI3K/AKT-Inhibitoren keine verstärkte Signalüberlagerung. Eine Ausnahme bildete der AKT-Inhibitor Perifosin, welcher vergleichbare Effekte zu Venetoclax aufwies.

Die kombinierten Applikationen von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren zeigten in beiden Zelllinien eine vergleichbare oder diskret verstärkte Translokation im Vergleich zu der Einzelapplikation von Venetoclax. In der Zelllinie SEM bewirkte die Kombination von Venetoclax und BKM-120 eine vermehrte Signalüberlagerung, wohingegen sich die Kombination mit Idelalisib oder MK-2206 nur marginal zu der Monoapplikation unterschieden. Bei kombinierter Applikation von Perifosin und Venetoclax wurde die Beurteilung der Signalüberlagerung durch schwere morphologische Schäden erschwert, nichtsdestotrotz implizierten die Ergebnisse eine gesteigerte BAX-Translokation. Die Kombinationsansätze induzierten in der Zelllinie

RS4;11 vergleichbare Effekte. Sowohl die Kombination von Venetoclax und Perifosin als auch simultane Inkubation mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 wiesen eine diskret gesteigerte Signalüberlagerung im Vergleich zu den Einzelapplikationen auf.



**Abb. 19: Nachweis der BAX-Translokation**

Exemplarische Darstellungen des Nachweises der BAX-Translokation mittels Immunfluoreszenz. BAX-Protein (grün), Mitochondrien (rot), Korrelat der BAX-Translokation (gelb). 400-fache Vergrößerung, 48 h Inkubation,  $n \geq 3$ .

#### **4.4 Modulation der Proteinexpression durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibitor**

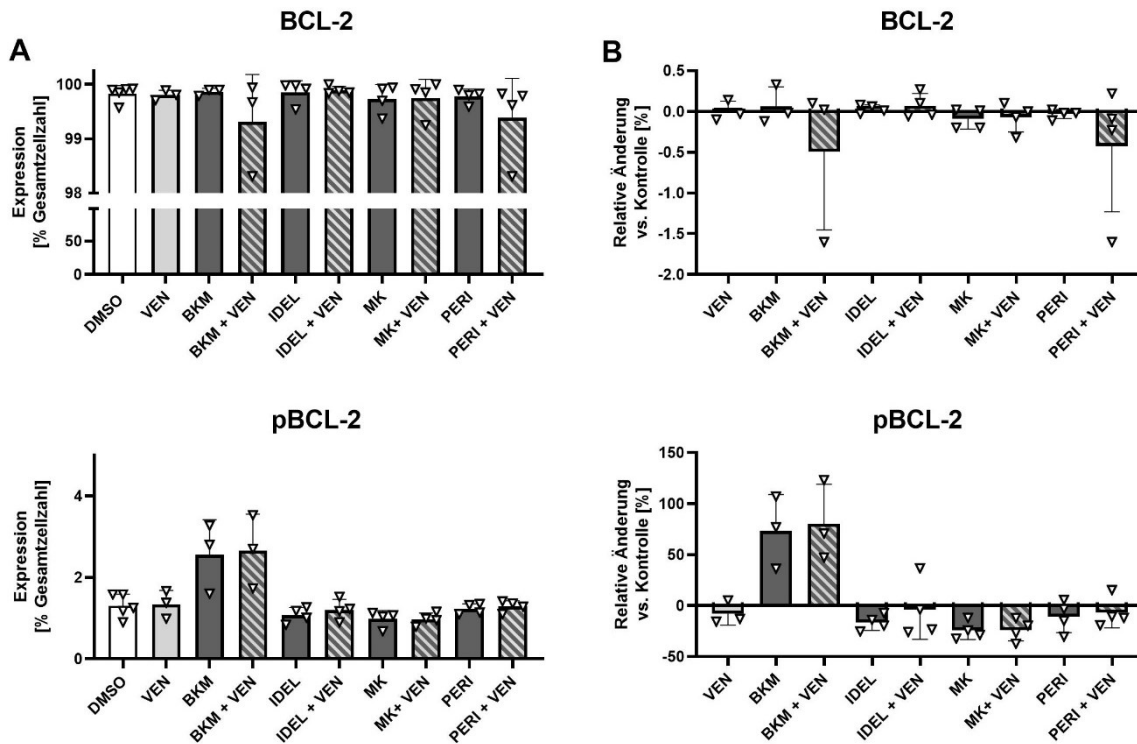
Zur Untersuchung der Proteinexpression von pAKT und BCL-2-Signalwegproteinen erfolgte eine intrazelluläre Färbung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern und anschließender durchflusszytometrischer Detektion. Die Ergebnisse sind sowohl als absolute Expression der Gesamtzellzahl als auch in prozentualer Veränderung zu der DMSO-Kontrolle dargestellt. Für die relative Darstellung wurden die Absolutwerte der Kontrolle als 100 % angesehen und die relative Expression in Prozent berechnet.

In der basalen Analyse von SEM und RS4;11 (Anhang, Abbildung S1) konnte in beiden Zelllinien eine fast 100-prozentige Expression von BCL-2, BCL-xL und BAX nachgewiesen werden. MCL-1 wurde in beiden Zelllinien leicht schwächer exprimiert. Es zeigte sich keine relevante Phosphorylierung von BCL-2. Im nativen Zustand exprimierten SEM und RS4;11 AKT und pAKT, mit einem stärkeren Nachweis von pAKT in SEM-Zellen (Anhang, Abbildung S2).

##### **4.4.1 Einfluss auf die BCL-2-Signalwegproteine**

In SEM-Zellen wurde keine relevante Beeinflussung der BCL-2-Expression nachgewiesen. Die Kombinationen von Venetoclax mit Perifosin oder BKM-120 wiesen im Mittel eine leichte Inhibition auf, was sich vermutlich auf ein fehlerhaftes Ausreißersignal zurückführen lässt (Abbildung 20). Änderungen im relativen Expressionsniveau zeigten aufgrund der fast 100-prozentigen Expression im basalen Zustand der Zelllinien nur geringe Auswirkungen.

Die phosphorylierte Form des Proteins BCL-2 (pBCL-2) steht im Zusammenhang mit einer verstärkten antiapoptotischen Wirkung [135]. In der Zelllinie SEM bewirkte BKM-120 die stärkste Modulation der pBCL-2-Expression. Der pan-PI3K-Inhibitor führte als einziger Ansatz zu einer (jedoch nicht signifikant) gesteigerten Expression (Steigerung um  $73,3 \pm 29,0$  %,  $p = 0,3076$ ) gegenüber der DMSO-Kontrolle. Nach Inkubation mit dem PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib oder den AKT-Inhibitoren (MK-2206, Perifosin) konnten leicht verminderte pBCL-2-Werte nachgewiesen werden. Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax induzierte einzeln appliziert keine relevanten Modulationen. Nachfolgend bewirkte die kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition nur geringfügige Veränderungen im Vergleich zu den Einzelapplikationen der PI3K/AKT-Inhibitoren.

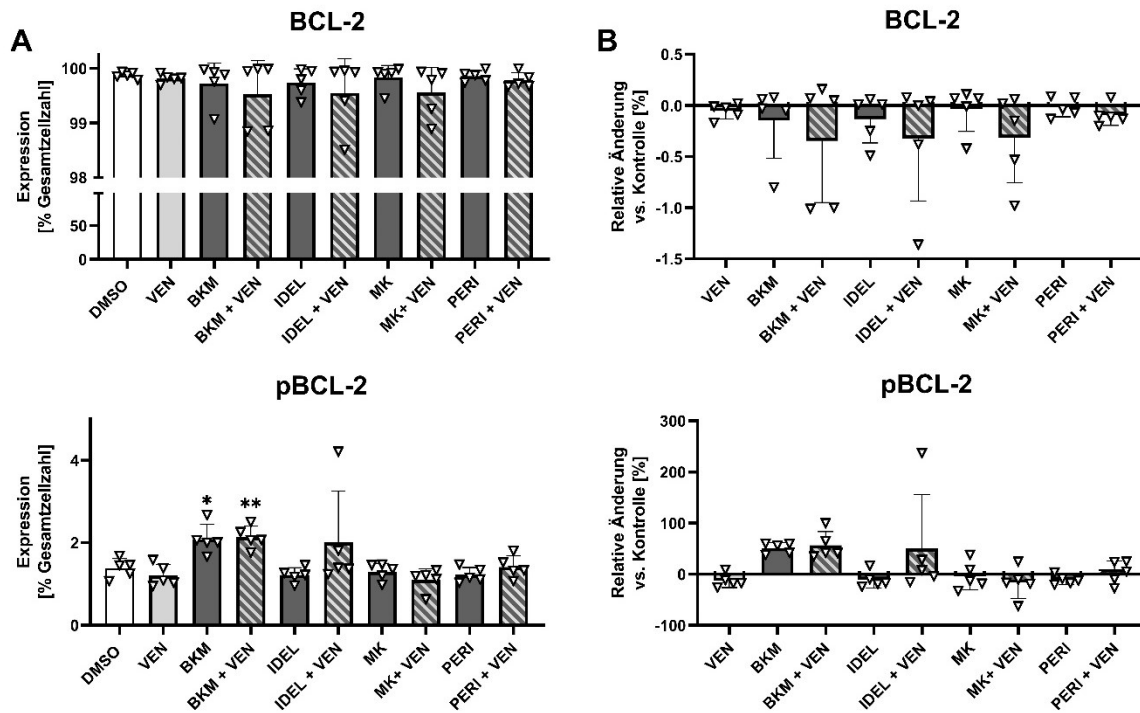


**Abb. 20: Nachweis der (p)BCL-2-Expression in SEM-Zellen**

Nachweis der intrazellulären BCL-2- und pBCL-2-Expression mittels Durchflusszytometrie. A: Gesamtexpression, B: Relative Veränderung zu der DMSO-Kontrolle. 48 h Inkubation. MW  $\pm$  SD, n  $\geq$  3, ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

Nachfolgend werden die Effekte auf die BCL-2-Signalwegproteine in der Zelllinie RS4;11 dargestellt. In RS4;11-Zellen konnte eine diskret, nicht-signifikant verminderte BCL-2-Expression nach kombinierter Applikation von Venetoclax mit Idelalisib, BKM-120 oder MK-2206 nachgewiesen werden (Abbildung 22). Perifosin bewirkte einzeln und in Kombination mit Venetoclax keine Regulation der BCL-2-Expression.

Die BCL-2-Phosphorylierung wurde einzig durch BKM-120 signifikant induziert (51  $\pm$  9,3 %). Die weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren zeigten dahingegen keine Modulation. In kombinierter Applikation wurde keine relevante Steigerung der Effekte nachgewiesen.

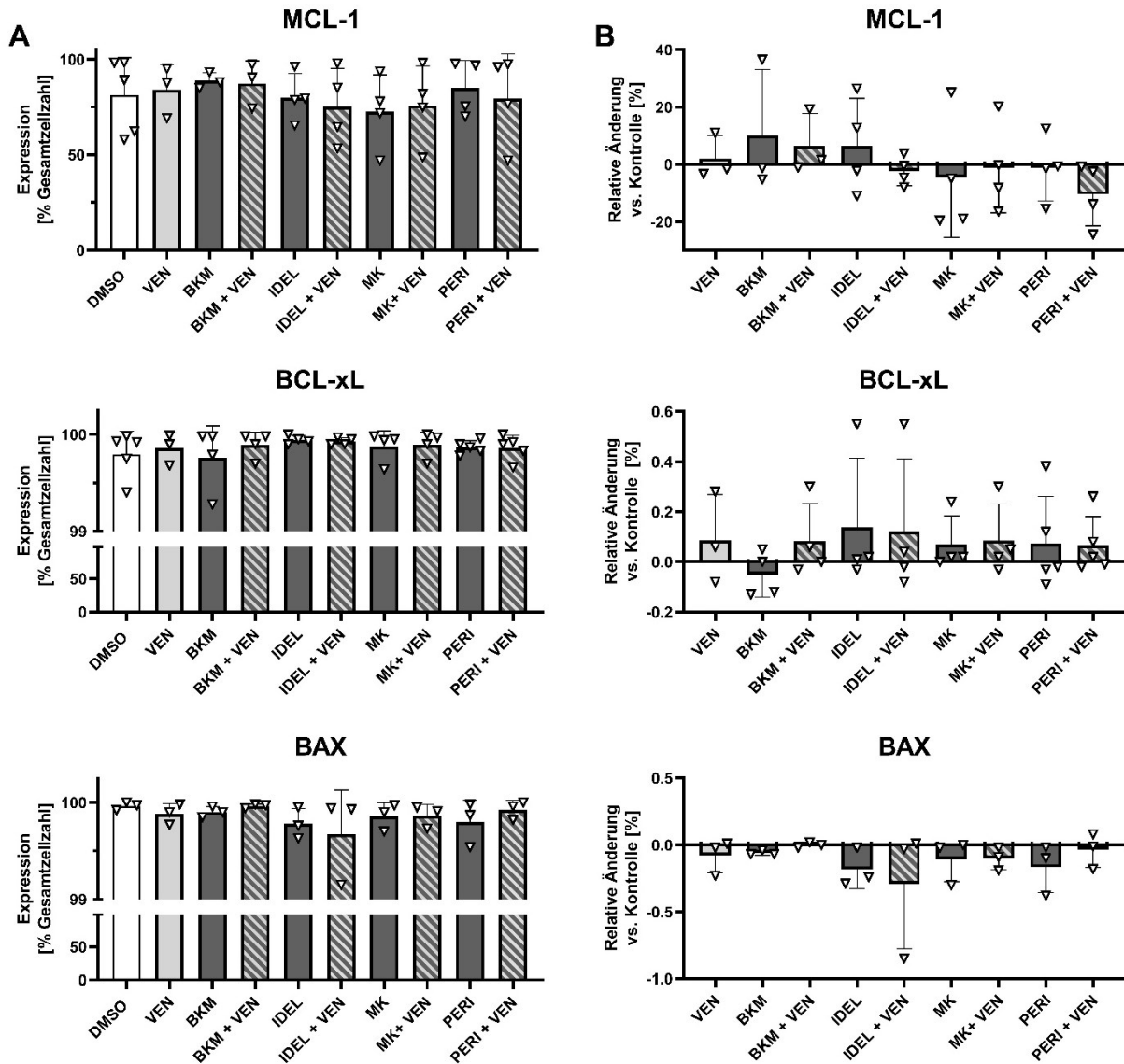


**Abb. 21: Nachweis der (p)BCL-2-Expression in RS4;11-Zellen**

Nachweis der intrazellulären BCL-2- und pBCL-2-Expression mittels Durchflusszytometrie. A: Gesamtexpression, B: Relative Veränderung zu der DMSO-K ntr lle. 48 h Inkubati n. W ± SD, n ≥ 4, ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

Das antiapoptotische Protein MCL-1 wurde in der Zelllinie SEM mit einer breiten Varianz reguliert (Abbildung 21). Die Einzelapplikationen von Venetoclax und den PI3K/AKT-Inhibitoren ließen dabei aufgrund hoher Standardabweichungen keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Die simultane Inkubation von Venetoclax und Perifosin zeigte die leichte Tendenz zur negativen Regulation der MCL-1-Expression gegenüber der Kontrolle. Generell wiesen jedoch die Kombinationen keine statistisch signifikante Veränderung der Expression zu der Monoapplikation auf.

Für das antiapoptotische Protein BCL-xL sowie das proapoptotische Protein BAX wurden nur geringfügige Veränderungen in der Expression beobachtet. Ähnlich zu BCL-2 wiesen beide Proteine basal eine fast 100-prozentige Expression auf (Anhang, Abbildung S1).

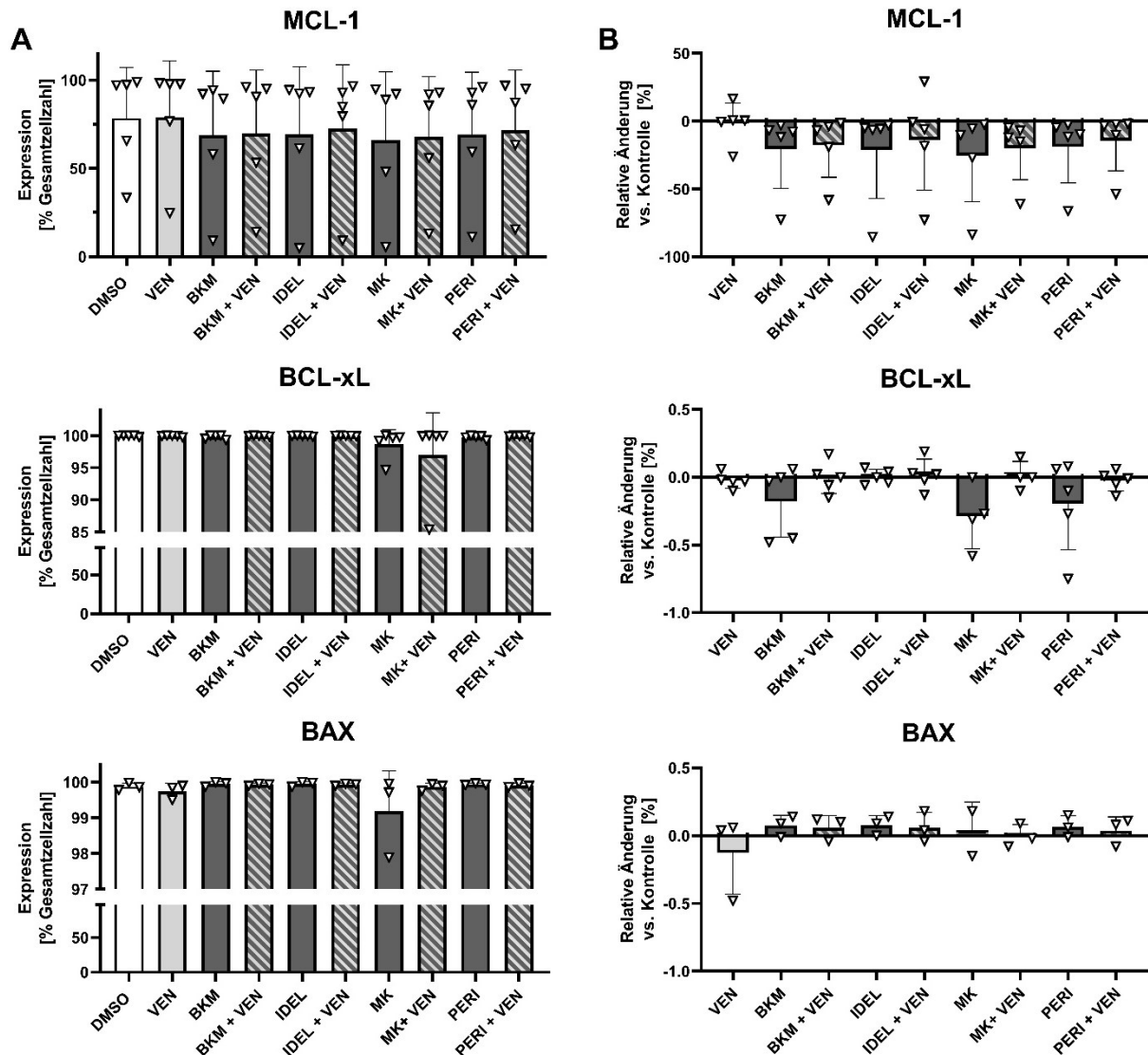


**Abb. 22: Nachweis der MCL-1-, BCL-xL- und BAX-Expression in SEM-Zellen**

Nachweis der intrazellulären MCL-1-, BCL-xL- und BAX-Expression mittels Durchflusszytometrie. A: Gesamt-expression, B: Relative Veränderung zu der DMSO-Kontrolle. 48 h Inkubation. MW  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

In RS4;11-Zellen wurde das antiapoptotische Protein MCL-1 in überwiegend vermindert exprimiert (Abbildung 23). Die beschriebenen Veränderungen im Expressionsniveau von MCL-1 stellen aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nur Tendenzen dar. Die Inkubation mit Venetoclax bewirkte keine eindeutige Regulation und die Kombinationsansätze wiesen kein verändertes Expressionsmuster zur Monoapplikation der PI3K/AKT-Inhibitoren auf.

Im Expressionsniveau von BCL-xL und BAX zeigten sich nach einzelner und kombinierter Inkubation mit Venetoclax und den PI3K/AKT-Inhibitoren marginale Veränderungen. Einzig die Applikationen des AKT-Inhibitors MK-2206 resultierten einzeln appliziert in einer geringfügigen Suppression von BCL-xL, was sich vorrangig auf ein Ausreißersignal zurückführen lässt.



**Abb. 23: Nachweis der MCL-1-, BCL-xL- und BAX-Expression in RS4;11-Zellen**

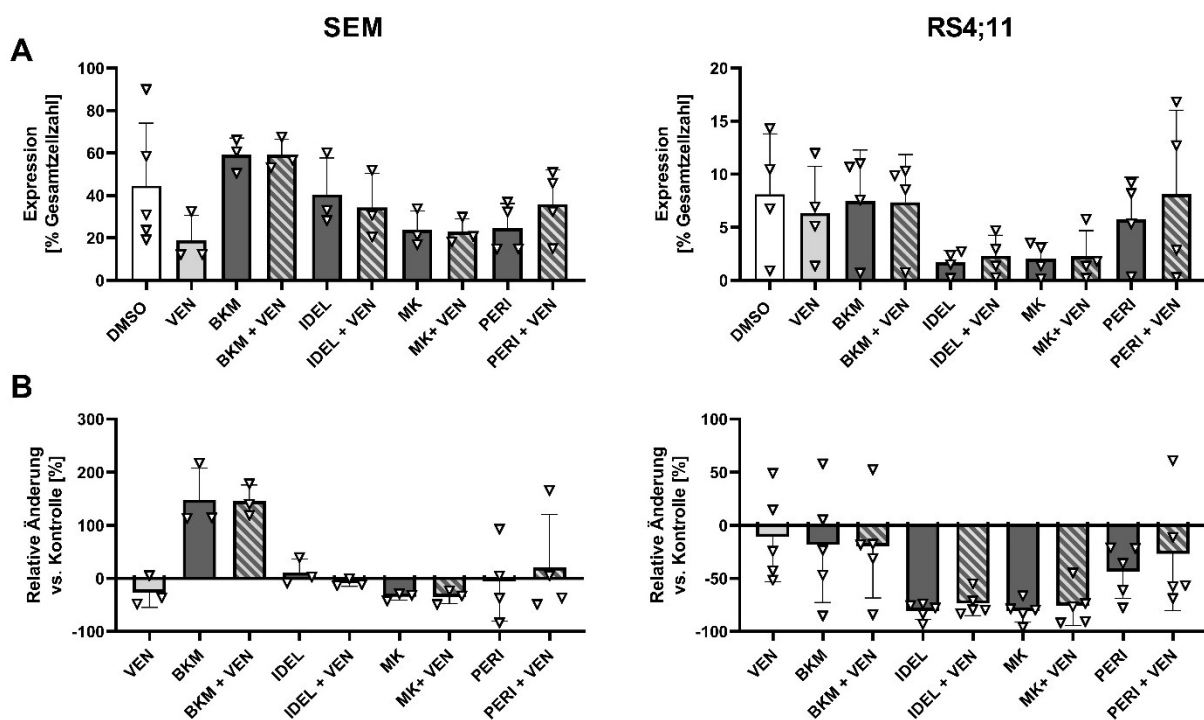
Nachweis der intrazellulären BCL-2- und pBCL-2-Expression mittels Durchflusszytometrie. A: Gesamtexpression, B: Relative Veränderung zu der DMSO-Kontrolle. 48 h Inkubation. W + SD, n ≥ 2, ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

#### 4.4.2 Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung

In der Zelllinie SEM wurde die größte Änderung in der AKT-Phosphorylierung nach Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor BKM-120 beobachtet (Abbildung 24). Nach einzelner Applikation stieg die pAKT-Expression um  $148,1 \pm 48,7$  % gegenüber der Kontrolle. Der PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib wies hingegen keine eindeutigen Effekte auf. Während MK-2206 leicht negativ regulierend auf die AKT-Phosphorylierung einwirkte, konnten nach Applikation von Perifosin keine eindeutigen Tendenzen beobachtet werden. Die einzelne Inkubation mit dem BCL-2-Inhibitor Venetoclax bewirkte ein leicht vermindertes pAKT-Phosphorylierungsmuster.

Die Kombination von Venetoclax mit BKM-120 oder Idelalisib bewirkte keine relevante Regulation von pAKT im Vergleich zu der Monoapplikation der PI3K-Inhibitoren. Analog konnte nach simultaner Inkubation von Venetoclax und einem AKT-Inhibitor (MK-2206, Perifosin) keine verstärkte Modulation des pAKT-Niveaus beobachtet werden.

In der Zelllinie RS4;11 zeigte sich nach Applikation der PI3K/AKT-Inhibitoren die Tendenz einer verminderten pAKT-Expression im Vergleich zu der Kontrolle. Die stärkste AKT-Inhibition wurde durch die Inkubation mit dem pan-AKT-Inhibitor MK-2206 ( $-80,8 \pm 9,5 \%$ ) und dem PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib ( $-80,8 \pm 7,0 \%$ ) induziert. Perifosin bewirkte geringere Effekte, resultierte jedoch tendenziell ebenfalls in einer verminderten pAKT-Expression. Während BKM-120 zur stärksten Hochregulation von pAKT in SEM-Zellen führte, wurde in der Zelllinie RS4;11 keine relevante Veränderung nachgewiesen. Venetoclax erzielte einzeln keinen Einfluss auf die pAKT-Expression in RS4;11-Zellen. Die kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition resultierte in vergleichbaren Ergebnissen zu den Monoapplikationen der PI3K/AKT-Inhibitoren.



**Abb. 24: Nachweis der AKT-Phosphorylierung**

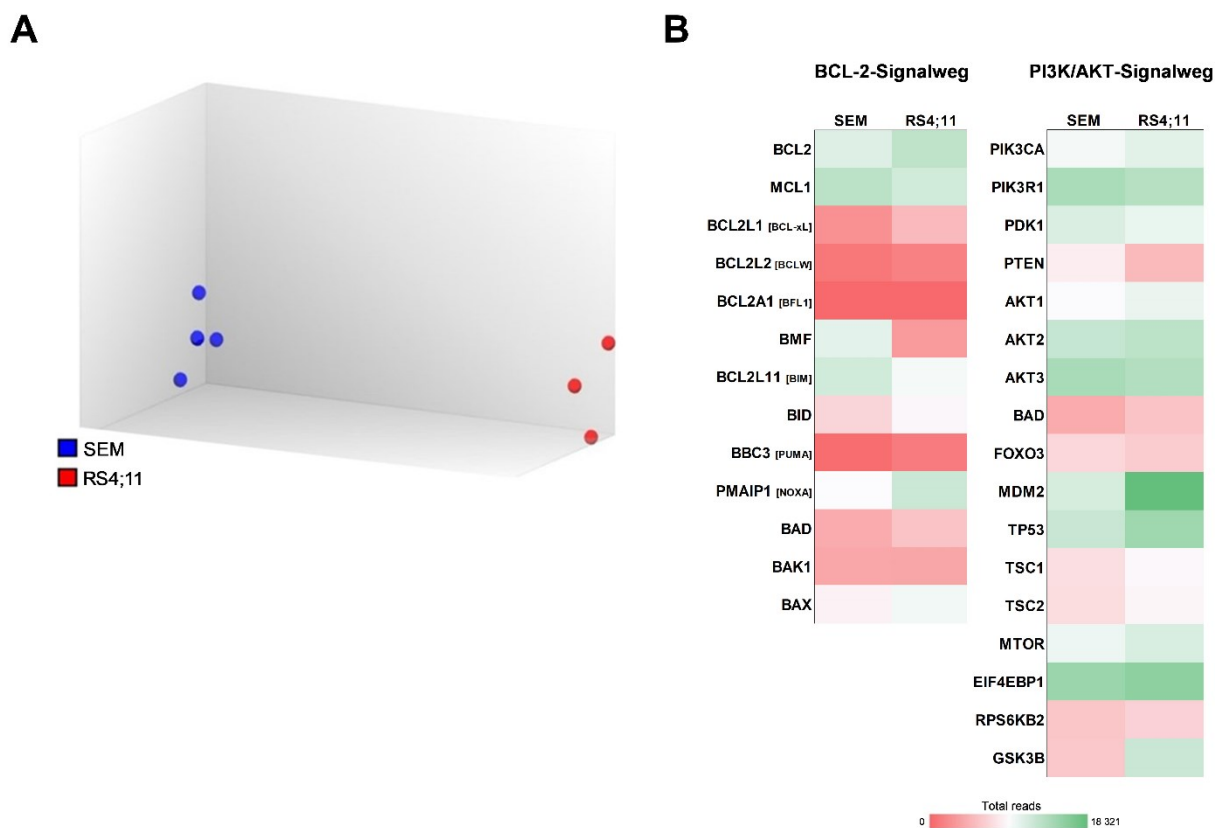
Intrazellulärer pAKT-Nachweis mittels Durchflusszytometrie. A: Gesamtexpression, B: Relative Veränderung zu der DMSO-Kontrolle. 48 h Inkubation. W + SD,  $n \geq 3$ . ANOVA und *post-hoc Tukey's multiple comparison Test*.

#### 4.5 Modulation der Genexpression durch kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition

Zur Identifikation mechanistischer Hintergründe der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition wurde der Einfluss auf Schlüsselgene der Apoptose, des PI3K/AKT-Signalwegs sowie weiterer relevanter Kaskaden leukämischer Zellen untersucht. Die Auswertung erfolgte anhand der Identifikation signifikant veränderter Gene, sowie der Gesamtbetrachtung apoptotischer Signalwege und des PI3K/AKT-Signalwegs. Im Anhang der Arbeit befindet sich eine Liste aller 214 untersuchten Gene und verwendeten Abkürzungen (Anhang, Tabelle S1).

##### 4.5.1 Basale Genexpression in SEM- und RS4;11-Zellen

Analysen der Genexpression mittels *Principal Component Analysis (PCA)-plots* erwiesen im nativen Zustand beider Zelllinien ein basal differenziertes Expressionsmuster. Zwischen den einzelnen Replikaten zeigte sich nur eine geringe Varianz (Abbildung 25A). Für die Beurteilung des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs wurden die Schlüsselgene anhand ihrer Gesamtexpression (*total reads*) in beiden Zelllinien gegenübergestellt (Abbildung 25B). Einzelne entgegengesetzt regulierte Gene deuten im Kontext der PCA-Analyse auf unterschiedliche Aktivitäten der Signalwege innerhalb beider Zelllinien hin.



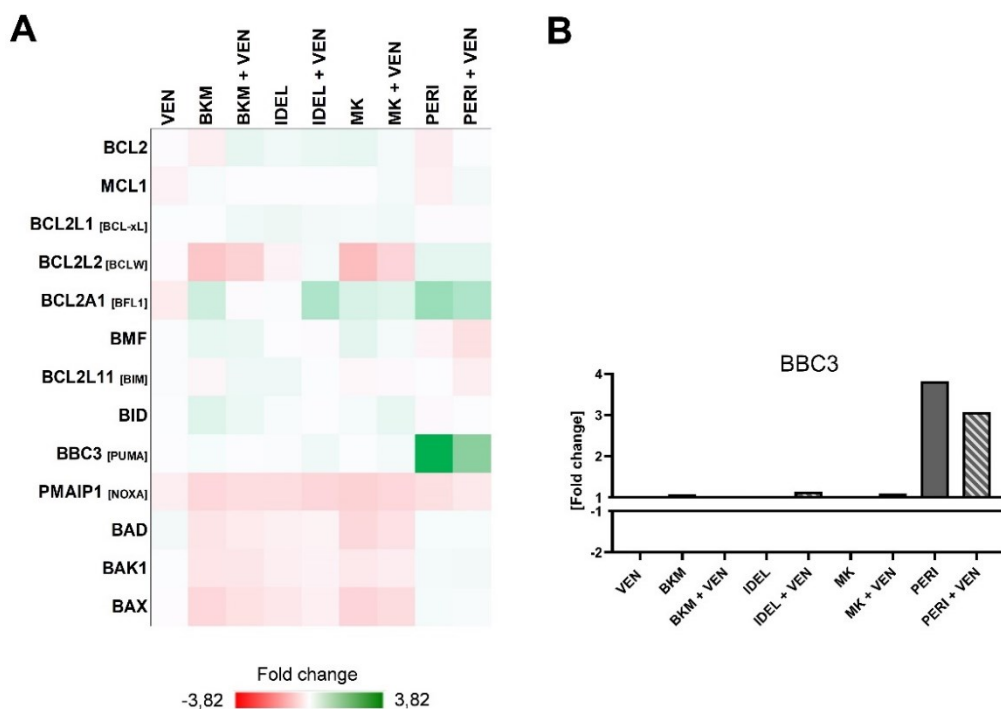
**Abb. 25: Basale Genexpression in den B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11**

Analyse der basalen Genexpression innerhalb des verwendeten Gen-Panels mittels *PCA-plot* (A) und farbkodierter Darstellung der mittleren *total reads* relevanter Gene des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs (B).  $n \geq 3$ .

#### 4.5.2 Einfluss auf die Genexpression des BCL-2-Signalwegs

In der Zelllinie SEM konnte durch Venetoclax eine geringe und nicht signifikante Regulation der untersuchten Genexpression nachgewiesen werden. Innerhalb des BCL-2-Signalwegs konnte die Tendenz beobachtet werden, dass Venetoclax proapoptotische Gene wie *BAD* und *BAK1* am stärksten hochregulierte, während Inhibitoren der Apoptose wie *MCL-1*, *BCL2* und *BCL2A1* (BFL-1) am stärksten supprimiert wurden (Abbildung 26A). Die Gesamtexpression von *BCL2A1* (BFL-1) wies in der Zelllinie SEM in allen Ansätzen *total reads* unterhalb der definierten Grenze der biologischen Signifikanz auf (Anhang, Tabelle S6). Das hierarchische *cluster* von 13 relevanten Genen des BCL-2-Signalwegs zeigte eine nahe Gruppierung der Kontrollen und der Venetoclax-Monoapplikationen. Die PI3K/AKT-Inhibitoren sind im *cluster* weiter differenziert, was eine stärkere Regulation durch die PI3K/AKT-Inhibitoren impliziert (Anhang, Abbildung S3).

Innerhalb der PI3K/AKT-Inhibitoren resultierte einzig Perifosin in einer relevanten ( $p < 0,05$ ;  $FC > 2$ ) proapoptotischen Modulation der Genexpression des BCL-2-Signalwegs. Dies äußerte sich durch eine signifikante Hochregulation des proapoptotischen Gens *BBC3*, das für das Protein PUMA codiert (Abbildung 26B, Tabelle 15). Hierbei ist hervorzuheben, dass es sich um die stärkste Modulation aller untersuchten Gene (*cut off: total reads* > 50) und Ansätze in der Zelllinie SEM in dieser Arbeit handelt (Anhang, Tabellen S2).



**Abb. 26: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des BCL-2-Signalwegs in SEM-Zellen**

A: *Heatmap* der BCL-2-Signalweg-Genexpression, *fold change* zur Kontrolle, 24 h Inkubation. Berechnungen erfolgten mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0). Grüne und rote Farbgebung markiert Hoch- bzw. Runterregulation.  $n \geq 2$ . B: Balkendiagramm des mittleren *BBC3 fold change*,  $n \geq 2$ .

Tabelle 15: Signifikant regulierte Gene des BCL-2-Signalwegs in SEM-Zellen

Inhibitor	Gen	Fold change	Funktion
PERI	<i>BBC3</i> (PUMA)	3,82	Induktion Apoptose
PERI + VEN	<i>BBC3</i> (PUMA)	3,07	Induktion Apoptose

Kriterien: *fold change* > 2 oder < -2, *total reads* >50, Signifikanz  $p < 0,05$ ; Replikate  $\geq 3$

Auf weitere Gene des BCL-2-Signalwegs bewirkte Perifosin nur diskrete Effekte. Neben leicht verminderten Transkripten von antiapoptotischen Genen wie *BCL2*, *MCL1* und *BCL2L1* (BCL-xL) führte Perifosin zur gesteigerten Expression von *BCL2L2* (BCL-W) und *BCL2A1* (BFL-1).

Die Kombination von Venetoclax und Perifosin induzierte vergleichbare Effekte zu der Monoapplikation. Es konnte keine weitere Steigerung, jedoch weiterhin eine signifikant erhöhte *BBC3*-Expression nachgewiesen werden (Tabelle 15). Gleichzeitig präsentierten sich erhöhte Expressionswerte der antiapoptotischen BCL-2 Gene: *BCL2L2* (BCL-W), *BCL2* und *MCL1*. Die graphische Darstellung der Genexpression mittels *PCA-plot* verdeutlicht, dass nachgewiesene Effekte der Kombination (grün) gegenüber der Kontrolle (blau) vorwiegend durch Perifosin (lila) bedingt waren (Abbildung 27). Dieser Zusammenhang wird auch in den weiteren Kombinationen von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in SEM-Zellen ersichtlich (Anhang, Abbildung S4). Insbesondere die durch MK-2206 und BKM-120 bewirkten Effekte werden in Kombination vorwiegend durch die PI3K/AKT-Inhibitoren bedingt. Idelalisib erwies im Vergleich eine geringer differenzierte Expression auf.

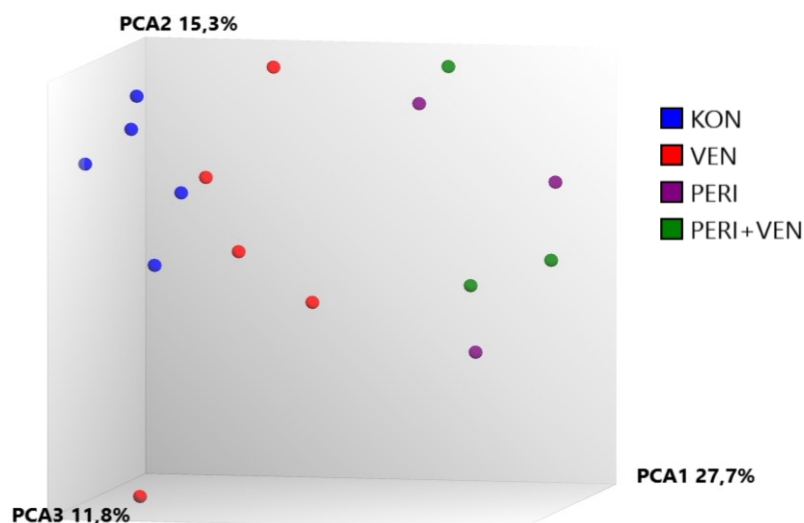


Abb. 27: *PCA-plot* nach einzelner und simultaner Applikation von Venetoclax und Perifosin in SEM-Zellen

Darstellung der differenzierten Regulation der Genexpression im *PCA-plot* nach Inkubation von Venetoclax, Perifosin und der Kombination beider Inhibitoren. Inkubation mit DMSO diente als Kontrolle (KON),  $n \geq 3$ .

Der Einfluss der weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren beschreibt aufgrund geringfügiger Regulationen nur Tendenzen im Expressionsmuster. Der pan-AKT-Inhibitor MK-2206 zeigte einzeln appliziert keine eindeutige proapoptotische Wirkung auf die Gene der BCL-2-Familie in der Zelllinie SEM (Abbildung 26). Während antiapoptotische Gene wie *BCL2*, *BCL2L1* (BCL-xL) und *BCL2A1* (BFL-1) leicht gesteigert exprimiert waren, wurden *BCL2L11* (BIM), *BID* und *BAX* geringfügig supprimiert. Nichtsdestotrotz führte die Inkubation mit MK-2206 zu einer leicht verminderten *BCL2L2* (BCL-W)-Expression und zu leicht gesteigerten *BAD*- und *BAK1*-Transkripten. Die Kombination mit Venetoclax resultierte in keiner relevanten Änderung des Expressionsmusters.

Die PI3K-Inhibitoren BKM-120 und Idelalisib induzierten ein vergleichbares Expressionsmuster zu MK-2206, ohne klare pro- oder antiapoptotische Tendenz. Es wurde eine geringfügig repressive Wirkung auf mehrere proapoptotische Gene wie *BMF*, *BCL2L11* (BIM), *BID* und *BAX*, als auch auf *BCL2L2* (BCL-W) beobachtet. Gleichzeitig wurden weitere pro- bzw. antiapoptotische Gene wie *BBC3* (PUMA), *PMAIP1* (NOXA), *BAD*, *BAK1* oder *BCL2*, *MCL1* und *BCL2L1* (BCL-xL) leicht gesteigert exprimiert. Die simultane Gabe mit Venetoclax resultierte in keiner weiteren relevanten Modulation der Expression.

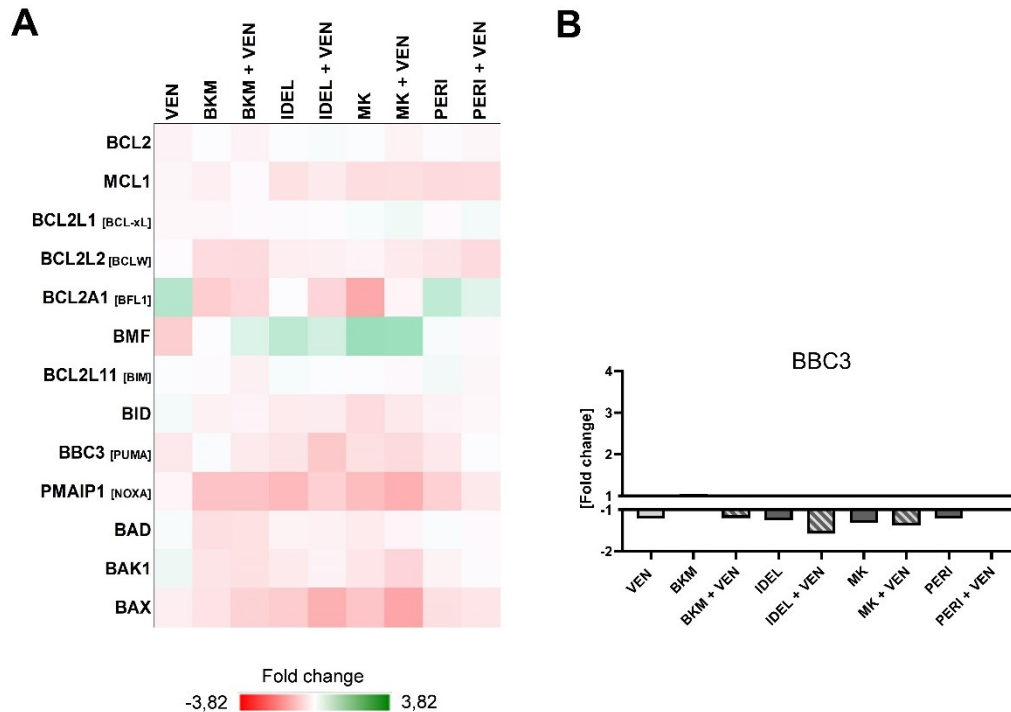
In der Zelllinie RS4;11 zeigte sich im hierarchischen *cluster* der Expression von 13 relevanten Genen des BCL-2-Signalwegs eine überwiegend homogene Expression zwischen den Ansätzen (Anhang, Abbildung S5). Die Darstellung der jeweiligen Kombinationen innerhalb eines PCA-plots stützen diesen Zusammenhang (Anhang, Abbildung S6).

Der Einfluss von Venetoclax führte zu vergleichbaren Effekten wie in SEM-Zellen (Abbildung 28A). Insgesamt wurden die Gene der BCL-2-Familie herunterreguliert. Differenziert zu SEM-Zellen wurde eine verstärkte Expression von *BCL2A1* (BFL-1) nachgewiesen. Die basale Expression von *BCL2A1* (BFL-1) lag in der Zelllinie RS4;11 in allen Ansätzen im Mittel jedoch unterhalb von 50 *total reads* (Anhang, Tabelle S7) und ist somit nur bedingt biologisch aussagekräftig.

Der Einfluss der PI3K/AKT-Inhibitoren auf Gene des BCL-2-Signalwegs ist diskret und überwiegend repressiv, unabhängig von der biologischen Funktion der Gene. Nach Inkubation mit Perifosin konnten leicht verminderte Expressionswerte sowohl im Bereich der antiapoptotischen Gene *BCL2*, *MCL1* und *BCL2L2*, als auch der proapoptotischen Gene *BAK1*, *BAD* und *BAX* beobachtet werden. Im Vergleich zur Zelllinie SEM bewirkte Perifosin keine gesteigerte Expression von *BBC3* (PUMA) (Abbildung 28B) oder proapoptotische Modulationen des BCL-2-Signalwegs. Auch die simultane Applikation von Venetoclax und Perifosin resultierte in keiner relevanten Veränderung des Expressionsmusters.

MK-2206 induzierte, abgesehen von einer leicht verminderten *MCL1*-Expression und diskret gesteigerten *BAK1*-Transkripten, keinen proapoptotischen Einfluss. Sowohl BKM-120 als auch

Idelalisib bewirkten vergleichbare Effekte und vermittelten eine überwiegend repressive Wirkung auf BCL-2-Signalweg-Gene. Es zeigten sich keine signifikanten Regulationen der Genexpression und aufgrund der gering ausgeprägten Modulation lässt sich keine abschließend induktive oder inhibitorische Wirkung auf die Gene des BCL-2-Signalwegs ableiten. Die Kombinationen mit Venetoclax führten zu keiner relevanten Modulation des Expressionsmusters.



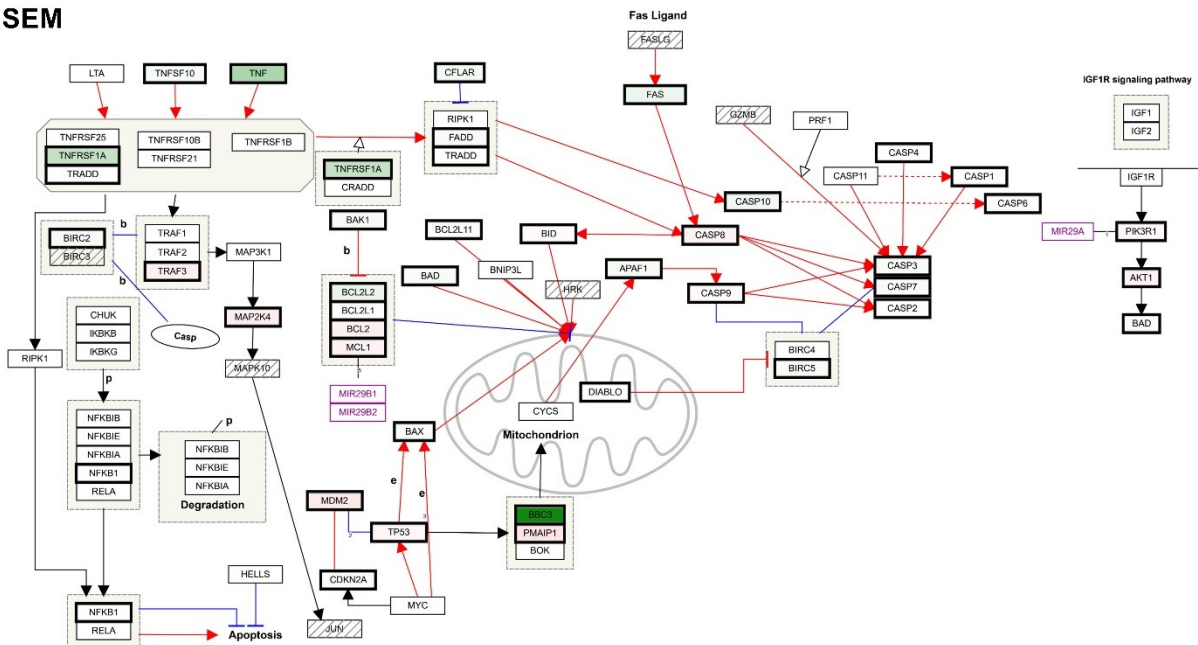
**Abb. 28: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des BCL-2-Signalwegs in RS4;11-Zellen**

A: Heatmap der BCL-2-Genexpression, *fold change* zu der Kontrolle, 24 h Inkubation. Berechnungen des *fold change* mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0). Grüne und rote Farbgebung kennzeichnet Hoch- bzw. Runterregulation,  $n \geq 2$ . B: Balkendiagramm des mittleren *BBC3 fold change*,  $n \geq 2$ .

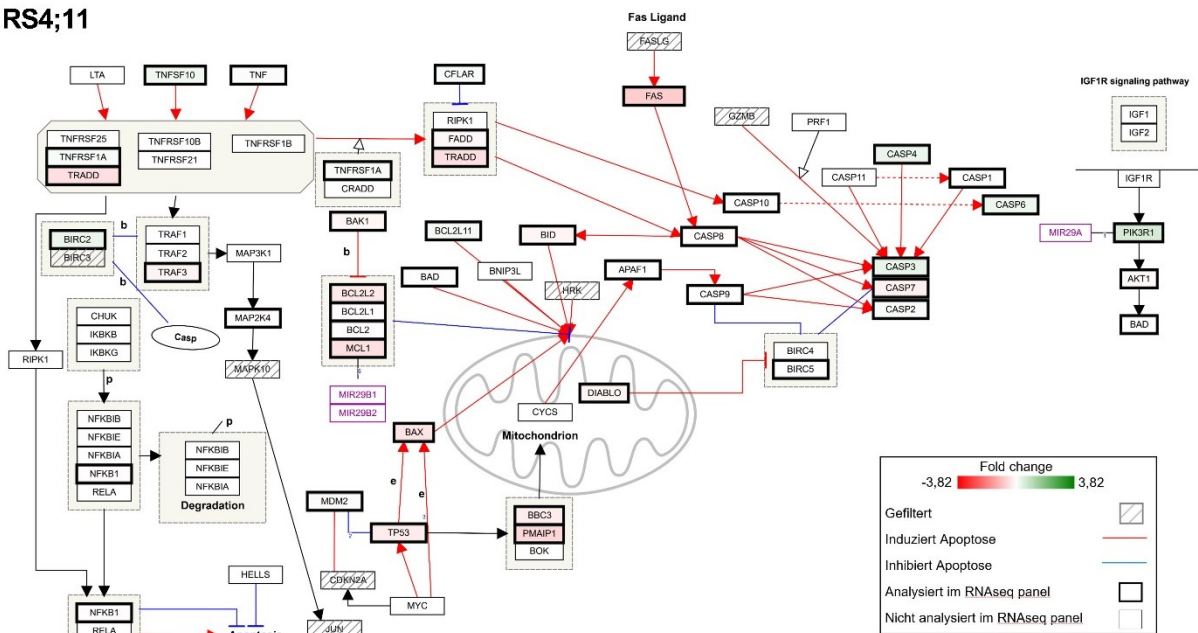
#### 4.5.3 Einfluss auf die Genexpression weiterer Apoptose-relevanter Gene

Insbesondere Perifosin induzierte eine proapoptotische Modulation des intrinsischen Signalwegs der Apoptose. Zur Identifikation potenziell umfassenderer Effekte wurde in Abbildung 29 der Einfluss von Perifosin auf die apoptotischen Signalwegkaskaden in SEM- und RS4;11-Zellen dargestellt. Hier zeigte sich, dass die induzierten Effekte nicht auf den mitochondrialen Signalweg beschränkt waren. Vor allem in SEM-Zellen wurde eine eindeutige Aktivierung des extrinsischen Signalwegs nachgewiesen. Perifosin induzierte Aktivatoren (*TNF*, *FAS*), Adaptern (*FADD*, *TRADD*) und den Effektor *CASP10* des extrinsischen apoptotischen Signalwegs. Die stärkste Induktion (Tabelle 16) zeigte sich in einer signifikant gesteigerten *GZMA*-Expression (Granzym A). Zudem wurden erhöhte Transkripte des *TNF*-Gens beobachtet, aber auch weitere Mitglieder der TNF-Superfamilie, z. B. *TNSF10* und *TNFRSF1A*, wiesen erhöhte Expressionswerte auf.

SEM



RS4;11



**Abb. 29: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach Applikation von Perifosin**

Einfluss von Perifosin auf die Genexpression innerhalb der apoptotischen Signalwegkaskade in SEM- und RS4;11-Zellen. Mittels TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) und dem WikiPathways-*plugin* wurden die berechneten Werte des *fold change* in die apoptotische Signalwegkaskade integriert dargestellt. Gene mit *total reads* kleiner als 50 wurden zur Rechtfertigung biologischer Signifikanz ausgeschlossen (gefiltert).  $n \geq 3$ .

Im Vergleich zu Perifosin führte Venetoclax zu einer diskreten Induktion des extrinsischen Signalwegs der Apoptose (Anhang, Abbildung S7). Die simultane Inkubation von Venetoclax und Perifosin wies bei vergleichbarem Expressionsmuster eine gesteigerte *GZMA*-Expression auf und erhöhte signifikant die *TNF*-Expression gegenüber der Kontrolle.

Die in SEM-Zellen beobachteten Ergebnisse waren nicht spezifisch für die Anwendung von Perifosin. Alle weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren führten zu einer vergleichbaren Induktion des

extrinsischen Signalwegs der Apoptose, einschließlich einer erhöhten Expression von Aktivatoren, Adaptoren und Effektoren des extrinsischen Signalwegs (Tabelle 16; Anhang, Abbildung S9, links).

MK-2206 induzierte eine signifikant erhöhte Expression von *TNF*, sowie eine erhöhte Aktivität der *TNF*-Superfamilie. Zudem konnte eine signifikante Suppression des Inhibitors der Apoptose *BIRC5* (Survivin) nachgewiesen werden. Die Kombination von Venetoclax und MK-2206 führte zu leicht gesteigerten Effekten der Monoapplikation, inklusive erhöhter *TNF*-Expression und diskret verstärkter Inhibition von *BIRC5*.

Der pan-PI3K-Inhibitor BKM-120 resultierte in vergleichbaren Effekten zu MK-2206. Es konnte eine signifikant gesteigerte Expression von *TNF* und Suppression von *BIRC5* nachgewiesen werden. Aktivatoren der *TNF*-Superfamilie und weitere Gene des extrinsischen Signalwegs wiesen eine erhöhte Expression auf. Entgegengesetzt zu MK-2206 zeigten sich keine gesteigerten Regulationen in Kombination mit Venetoclax.

Die Inkubation mit Idelalisib induzierte leicht schwächere und nicht signifikante Effekte. Trotzdem konnte in der Gesamtbetrachtung des extrinsischen Signalwegs eine gesteigerte proapoptotische Aktivität nachgewiesen werden. In Kombination mit Venetoclax wurde keine relevante Steigerung der Wirkung beobachtet.

**Tabelle 16: Signifikant regulierte Gene der Apoptose in SEM-Zellen**

Inhibitor	Gen	Fold Change	Funktion
BKM	<i>BIRC5</i> (Survivin)	-2,17	Inhibition Apoptose
	<i>TNF</i>	2,61	Induktion Apoptose
BKM + VEN	<i>TNF</i>	2,28	Induktion Apoptose
PERI	<i>BBC3</i> (PUMA)	3,82	Induktion Apoptose
	<i>GZMA</i>	2,60	Induktion Apoptose
PERI + VEN	<i>BBC3</i> (PUMA)	3,07	Induktion Apoptose
	<i>GZMA</i>	3,78	Induktion Apoptose
	<i>TNF</i>	2,94	Induktion Apoptose
MK	<i>BIRC5</i> (Survivin)	-2,18	Inhibition Apoptose
	<i>TNF</i>	2,25	Induktion Apoptose
MK + VEN	<i>BIRC5</i> (Survivin)	-2,26	Inhibition Apoptose
	<i>TNF</i>	2,94	Induktion Apoptose

Kriterien: *fold change* > 2 oder < -2, *total reads* >50, Signifikanz  $p < 0,05$ ; Replikate  $\geq 2$

In der Zelllinie RS4;11 konnte keine eindeutige proapoptotische Modulation der extrinsischen Signalwegkaskade nachgewiesen werden. Auf Basis geringer Regulation und fehlender Signifikanz stellen die Ergebnisse in der Zelllinie RS4;11 Tendenzen dar.

Eine Ausnahmestelle stellt der AKT-Inhibitor MK-2206 dar, welcher proapoptische Gene sowohl signifikant induzierte als auch inhibierte (Tabelle 17). In der Gesamtbetrachtung des extrinsischen Signalwegs zeigte sich jedoch keine einheitliche biologische Tendenz (Anhang, Abbildung S9). Die Kombination mit Venetoclax resultierte in einem vergleichbaren Expressionsmuster zur Monoapplikation.

Perifosin führte zu einer leicht gesteigerten Expression aktivierender Gene des extrinsischen Signalwegs der Apoptose. Während mehrere Gene der *TNF*-Superfamilie erhöht exprimiert waren, wurden der Aktivator *FAS*, Adaptern (*FADD*, *TRADD*) und die Genexpression von *CASP8* und *CASP10* vermindert. In Kombination mit Venetoclax zeigten sich tendenziell leicht erhöhte Expressionswerte von Aktivatoren des extrinsischen Signalwegs (*TNFSF10*, *TNFRSF13C*) im Vergleich zu den Monoapplikationen.

Sowohl Venetoclax als auch die weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren resultierten in einer überwiegend verminderten Expression der apoptotischen Signalwegkaskade. Außer gesteigerten *TNFSF10*-Transkripten wurden Gene der *TNF*-Superfamilie, wie *TNF* und *TNFSF13*, vermindert exprimiert. Die Kombinationsansätze mit Venetoclax wiesen keine relevanten Modulationen im Vergleich zu den einzelnen Applikationen auf.

**Tabelle 17: Signifikant regulierte Gene der Apoptose in RS4;11-Zellen**

Inhibitor	Gen	Fold Change	Funktion
MK	<i>BACH2</i>	4,04	Induktion Apoptose
	<i>TNFSF10</i>	2,35	Induktion Apoptose
MK + VEN	<i>BACH2</i>	3,92	Induktion Apoptose
	<i>TNFSF10</i>	2,46	Induktion Apoptose
	<i>FAS</i>	-2,41	Induktion Apoptose

Kriterien: *fold change* > 2 oder < -2, total reads >50, Signifikanz  $p < 0,05$ ; Replikate  $\geq 2$

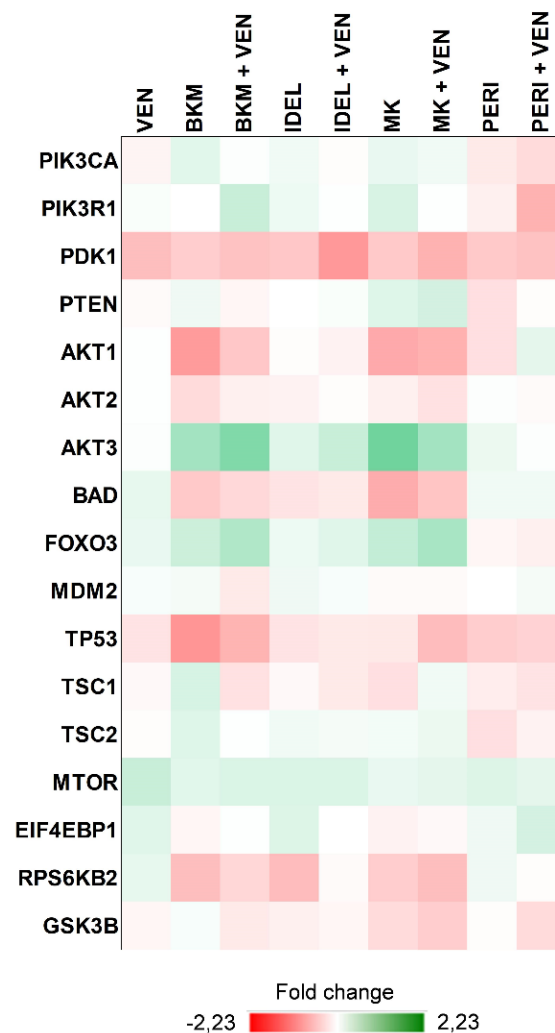
#### 4.5.4 Einfluss auf die Genexpression im PI3K/AKT-Signalweg

Der Einfluss von Venetoclax und der PI3K/AKT-Inhibitoren auf relevante Gene und Effektoren des PI3K/AKT-Signalwegs äußerte sich überwiegend diskret und wurde anhand der Gesamtbetrachtung des Signalwegs analysiert (Abbildung 30).

In dem hierarchischen *cluster* des PI3K/AKT-Signalwegs in SEM-Zellen gliedert die Applikation von Venetoclax zusammen mit den Kontrollen und impliziert somit einen höheren Einfluss der PI3K/AKT-Inhibitoren (Anhang, Abbildung S10). Der pan-AKT Inhibitor MK-2206 und der pan-PI3K Inhibitor BKM-120 führten tendenziell zu einem differenzierten Expressionsmuster relevanter Gene des PI3K/AKT-Signalwegs. Die Analyse des PI3K $\delta$ -Inhibitors Idelalisib lässt dahingegen keine eindeutigen Rückschlüsse zu. Insbesondere die Applikation von Perifosin einzeln oder in Kombination mit Venetoclax wies ein ähnliches Expressionsmuster zu den

Kontrollen auf. Dies lässt sich vermutlich auf geringere Effekte auf Gene des PI3K/AKT-Signalwegs zurückzuführen.

Die Inkubation mit Perifosin grenzte sich durch eine schwächere Regulation der Genexpression von den anderen PI3K/AKT-Inhibitoren in der Zelllinie SEM ab und zeigte als einziger Inhibitor eine tendenzielle Inhibition aktivierender Gene der Kinase AKT. Sowohl das Gen der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 $\alpha$  (*PIK3CA*), als auch *PDK1* und *AKT1* wurden leicht vermindert exprimiert. Entgegengesetzt zeigte sich eine geringere *PTEN*-Expression, einem Negativregulator des PI3K/AKT-Signalwegs und leicht erhöhte *AKT2*- und *AKT3*-Transkripte. *Downstream*-Substrate wurden nur gering und ohne einheitliche Tendenz moduliert. Die Kombination von Perifosin und Venetoclax führte, außer einer diskreten Steigerung von *AKT1*, zu keiner relevanten Veränderung gegenüber der Monoapplikation.



**Abb. 30: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs in SEM-Zellen**

Heatmap der PI3K/AKT-Signalweg-Genexpression, *fold change* zur Kontrolle, 24 h Inkubation. Berechnungen des *fold change* mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0). Grüne und rote Farbgebung kennzeichnet Hoch- bzw. Runterregulation. n. n.  $\geq 2$ .

Die weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren präsentierten ein vorwiegend homogenes Expressionsmuster mit nur diskreten Variationen zwischen den Ansätzen. Im Gegensatz zu Perifosin wurden die Gene der katalytischen (*PIK3CA*) als auch der regulatorischen (*PIK3R1*) PI3K-Untereinheiten induziert. Auf die Gene der Kinase AKT resultierten die weiteren PI3K/AKT-Inhibitoren in eine leicht stärkere Regulation im Vergleich zu Perifosin mit verminderter *AKT1*- und *AKT2*-Expression, sowie erhöhten *AKT3*-Transkripten. Effekte auf nachfolgende Substrate zeigten punktuell differenzierte Regulationen, wie z.B. die Suppression von *BAD*. Insgesamt ließen sich aus der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs in allen Ansätzen keine einheitlichen biologischen Effekte ableiten. Weiterhin resultierten die Kombinationen mit Venetoclax in keiner Modulation des Expressionsmusters im Vergleich zu den einzelnen Applikationen.

Das hierarchische *cluster* der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs in RS4;11 implizierte eine gering differenzierte Expression, da gleiche Inhibitoren oder Kombinationen häufig nicht in ein *cluster* eingeschlossen wurden (Anhang, Abbildung S11). Insbesondere die Applikationen von Venetoclax, Perifosin und die Kombination von Idelalisib und Venetoclax sind im *cluster* nahe zu den Kontrollen. Dahingegen schienen die Inhibitoren MK-2206 und BKM-120 eine stärker differenzierte Regulation zu bewirken. Insgesamt wurden in der Zelllinie RS4;11 diskrete Regulationen ohne einheitliche biologische Tendenz nachgewiesen (Abbildung 31).

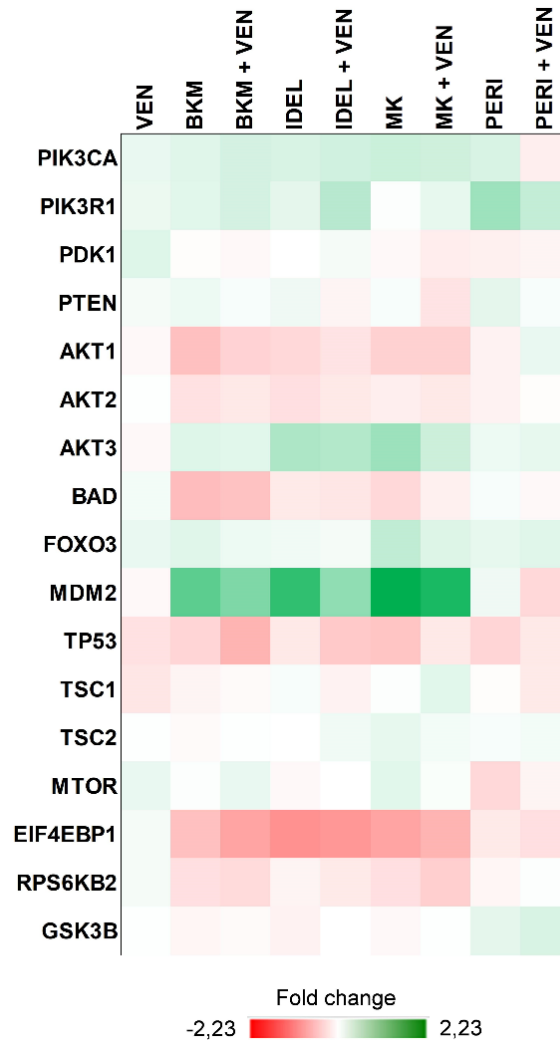
In RS4;11-Zellen resultierte MK-2206 als einziger Inhibitor in einer signifikanten Regulation im Bereich des PI3K/AKT-Signalwegs (Tabelle 17). Einzel appliziert führte MK-2206 zu einem signifikanten Anstieg der *MDM2*-Expression zu der Kontrolle. Nachfolgend konnte eine verminderte *TP53*-Expression nachgewiesen werden. Weiter Gene von AKT-Substraten, wie *FOXO3A*, *TSC2* oder *MTOR* wurden diskret gesteigert exprimiert, während die *downstream*-Substrate von MTOR (*EIF4EBP1*, *RPS6KB2*) leicht verminderte Expressionswerte aufwiesen. In Kombination mit Venetoclax konnte ein vergleichbares Expressionsmuster beobachtet werden. Die Expression von *MDM2* wurde auf vergleichbarem Niveau signifikant gesteigert. Zudem zeigte sich eine signifikante Suppression von *PHLDA3*, einem *TP53*-induzierten Repressor von *AKT1* und Induktor der Apoptose. Weitere Gene wurden ohne relevante Veränderung exprimiert.

**Tabelle 18: Signifikant regulierte Gene des PI3K/AKT-Signalwegs in RS4;11-Zellen**

Inhibitor	Gen	Fold Change	Funktion
MK	<i>MDM2</i>	2,23	Inhibition Apoptose
MK + VEN	<i>MDM2</i>	2,11	Inhibition Apoptose
	<i>PHLDA3</i>	-3,61	Induktion Apoptose

Kriterien: *fold change* > 2 oder < -2, *t* tal reads >50, Signifikanz *p* <0,05; Replikate ≥ 2

Die Regulation von *MDM2* erwies sich in den weiteren Ansätzen der PI3K/AKT-Inhibitoren zwar nicht als signifikant, jedoch als stärkste Regulation innerhalb des Signalwegs. Die Effekte auf weitere Gene zeigten eine vergleichbare Expression zu MK-2206, mit nur geringer Ausprägung der Modulationen und ohne einheitliche biologische Tendenz. Die Kombinationen mit Venetoclax induzierten keine weiteren signifikanten Regulationen. Perifosin grenzte sich von den anderen PI3K/AKT-Inhibitoren durch eine fehlende Induktion von *MDM2* ab.



**Abb. 31: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs in RS4;11-Zellen**

Heatmap der PI3K/AKT-Signalweg-Genexpression, *fold change* zur Kontrolle, 24 h Inkubation. Berechnungen des *fold change* mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0). Grüne und rote Farbgebung kennzeichnet Hoch- bzw. Runterregulation. n. n ≥ 2.

#### 4.5.5 Einfluss auf die Genexpression weiterer Leukämie-relevanter Gene

Der Einfluss auf weitere Leukämie-relevante Moleküle wurde einerseits anhand signifikant regulierter Gene, als auch über die stärksten und schwächsten Modulationen aus insgesamt 176 biologisch relevant exprimierten Genen (*total reads* > 50) evaluiert (Anhang, Tabellen S1, S2). Eine Liste der stärksten Regulationen in den Zelllinien SEM- (Anhang, Tabelle S4) und RS4;11 (Anhang, Tabelle S5) befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Venetoclax führte in SEM-Zellen zu diskreten Modulationen der Genexpression, Einflüsse beschreiben daher Tendenzen in der Regulation. Neben der leichten Induktion apoptotischer Gene konnte die Modulation von Regulatoren des Zellzyklus und der Proliferation nachgewiesen werden. Zu den am stärksten regulierten Genen gehörte in der Zelllinien SEM das Protoonkogen *FOS*. Zudem steigerte Venetoclax leicht den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 2A (*CDKN2A*).

In der Zelllinie SEM führte MK-2206 zu signifikanten Regulierungen außerhalb des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs (Tabelle 18). Es konnte eine signifikant verminderte *PRKCD*-Expression (Protein Kinase C Delta) nachgewiesen werden, sowie gesteigerte Expression sowohl epigenetischer (*EP300*), als auch transkriptioneller (*FOS*, *AFF3*) Regulatoren der Proliferation und Zelldifferenzierung. Über signifikant gesteigerte *ATM*-Transkripte, einem Inhibitor der Zellteilung und Induktor der Apoptose, zeigte sich ebenfalls eine Interaktion mit der Zellzykluskontrolle. In Kombination mit Venetoclax resultierte keine relevante Änderung im Expressionsmuster.

Die Inkubation mit Perifosin bewirkte keinen signifikanten Einfluss auf weitere Leukämie-relevante Gene. In der Darstellung der am stärksten regulierten Gene wurde ersichtlich, dass Perifosin überwiegend Gene der Apoptose induzierte und die Kombination mit Venetoclax eine vergleichbare Regulation aufwies.

Die Applikation von BKM-120 führte vergleichbar mit MK-2206 zu einer signifikant gesteigerten *FOS*- und *AFF3*-Expression. Weiterhin gehörten auch *STAT5* und *JAK1* zu den stark exprimierten Genen. Zudem implizieren erhöhte *FLT3*-Transkripte, einer RTK und Induktor von PI3Ks und Ras, die Aktivierungen intrazellulärer Signalwege. Vergleichbare Beobachtungen fanden sich in Kombination mit Venetoclax.

Idelalisib führte zur gesteigerten Expression von *AFF3*, *EP300* und Leukämie-assoziierten Genen wie *CELSR3*. Es zeigte sich eine repressive Wirkung auf Gene des MAPK-Signalwegs. *MAPKAPK2* (*MAPK2*) war das am stärksten supprimierte Gen. Ein vergleichbarer Einfluss wurde in Kombination mit Venetoclax beobachtet.

**Tabelle 18: Weitere signifikant regulierte Gene in SEM-Zellen**

Inhibitor	Gen	Fold Change	Funktion
BKM-120	<i>AFF3</i>	2,92	Differenzierung
	<i>FOS</i>	2,70	Differenzierung
MK-2206	<i>PRKCD</i>	-2,18	Regulation Proliferation
	<i>EP300</i>	2,00	Proliferation, Differenzierung
	<i>ATM</i>	2,07	Zellzykluskontrolle, Apoptose
	<i>FOS</i>	2,59	Differenzierung
	<i>AFF3</i>	2,72	Differenzierung
MK-2206 + VEN	<i>FOS</i>	3,34	Differenzierung
	<i>ATM</i>	2,24	Zellzykluskontrolle
	<i>AFF3</i>	2,41	Differenzierung

Kriterien: *fold change* > 2 oder < -2, *total reads* >50, Signifikanz  $p < 0,05$ ,  $n \geq 2$ .

In der Zelllinie RS4;11 konnte keine signifikante Regulation weiterer Gene nachgewiesen werden. Insgesamt resultierten PI3K/AKT-Inhibitoren in leicht geringeren Effekten auf Regulatoren der Proliferation, des Zellzyklus und der Differenzierung als in SEM-Zellen. Wie bereits in der hierarchischen Gliederung ersichtlich, zeigte sich zwischen den Inhibitoren ein gering differenziertes Expressionsmuster. Interessanterweise zählten in fast allen Ansätzen zu den am stärksten modulierten Genen Akteure des extrinsischen Apoptose-Signalwegs (Anhang, Tabelle S5).

Venetoclax zeigte in der Zelllinie RS4;11 tendenziell Modulationen von Regulatoren des Zellzyklus und der Proliferation. Neben dem Protoonkogen *FOS* wurde diskret das proliferativ wirkende Gen *EP300* erhöht exprimiert. Die Kombinationsansätze der PI3K/AKT-Inhibitoren mit Venetoclax zeigten keine weiteren relevanten Regulationen zu den Monoapplikationen.

MK-2206 schien weiterhin Einfluss auf Regulatoren der Proliferation und Differenzierung über gesteigerte Expression von *AFF3* und *ATM* zu nehmen. Es zeigte sich jedoch eine schwächere Regulation als in SEM-Zellen. Der AKT-Inhibitor Perifosin resultierte neben Induktion von Regulatoren des Zellzyklus und der Proliferation (*BACH2*, *RB1*), in der Induktion proapoptotischer Gene wie *BIK* und *GZMA*. Nach Inkubation mit BKM-120 konnte in RS4;11 ebenfalls ein Einfluss auf *FLT3* und *AFF3* nachgewiesen werden, jedoch eine geringere Regulation von *JAK1* und *STAT5* als in der Zelllinie SEM. Der PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib zeigte eine vergleichbare Modulation der Genexpression mit gesteigerten Transkripten von *AFF3* und *ATM*.

## 5. Diskussion

Die zielgerichtete Inhibition des BCL-2-Signalwegs weist das Potenzial auf, fundamentale Charakteristika hämatologischer Neoplasien, wie die Apoptoseresistenz, zu revidieren [35,64]. Der selektive BCL-2-Inhibitor Venetoclax demonstrierte sowohl präklinisch als auch klinisch Wirksamkeit in einem breiten Feld hämatologischer Neoplasien und wird derzeit zur Therapie der ALL evaluiert [3,16,26,35,41]. Trotz hoher Effektivität verdeutlichen Dosislimitierung sowie primäre und sekundäre Resistenzen, dass es rationaler Kombinationsansätze bedarf, um apoptotische Prozesse in malignen Zellen konsistent zu modulieren [7,16]. Aufgrund der physiologischen Interaktion des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs, sowie deren pathomechanistischer Bedeutung in der Genese akuter Leukämien, stellen diese Signalwege attraktive Zielstrukturen zur kombinierten Inhibition dar [54,62,71]. Präklinische Arbeiten am Richter-Syndrom und DLBCL verdeutlichen das synergistische Potential simultaner BCL-2- und PI3K-Inhibition [110,124]. Auf Grundlage dessen wurde in dieser Arbeit der Einfluss der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg-Inhibition in der B-ALL untersucht.

### 5.1 Relevanz zytotoxischer Effekte der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition

Mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Venetoclax sind, neben dem Tumorlysesyndrom, Einflüsse auf das Blutbild. Unter anderem können unter Therapie Neutropenie oder Anämie auftreten [82]. Die verwendeten Kombinationen in dieser Arbeit wurden bisher erstmalig untersucht oder es besteht bisher keine Datenlage zu potenziell additiven UAW. Zunächst durchgeführte Analysen zur Zytotoxizität sollten daher evaluieren, ob die kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition bereits *in vitro* ein erhöhtes Risiko zytotoxischer Effekte auf gesunde Zellen des Blutes aufweist. Die Ergebnisse erwiesen keinen Einfluss auf die Viabilität von isolierten PBMCs oder Erythrozyten gesunder Spender. Es zeigte sich keine gesteigerte Wirkung unter Kombination der Inhibitoren. Resultierende Effekte der gewählten Konzentrationen des Venetoclax und der PI3K/AKT-Inhibitoren können daher als spezifisch gegenüber leukämischen Blasten angesehen werden.

### 5.2 Bedeutung der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition in der B-ALL

Folgend werden die Effekte der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition in Bezug auf ihre inhibitorische Potenz, synergistische Aktivität, sowie mechanistische Hintergründe diskutiert.

### 5.2.1 Antiproliferative Effekte

In dieser Arbeit konnten erstmalig synergistische Effekte einer kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition auf humane B-ALL-Zelllinien nachgewiesen werden. Insgesamt waren die beobachteten Effekte stärker in der Zelllinie SEM ausgeprägt und einzig hier signifikant. Ein möglicher Erklärungsansatz für das differenzierte Ansprechen der Zelllinien ist die langsamere Teilungsrate von RS4;11- (50 h, [136]) gegenüber SEM-Zellen (30 h, [137]). Demzufolge treten bei gleicher Inkubationszeit weniger Proliferationszyklen in RS4;11-Zellen auf. Schlussfolgernd können die Inhibitoren an weniger Teilungspunkten wirken und es resultiert ein geringerer Einfluss auf die Viabilität.

Untersuchungen zur kombinierten BCL-2- und PI3K-Inhibition in weiteren hämatologischen Neoplasien stützen die in dieser Arbeit generierten Resultate. In einer Arbeit von Rahmani *et al.* konnte eine signifikante Inhibition der Viabilität unter simultaner BCL-2- und PI3K-Inhibition in AML-Zelllinien nachgewiesen werden. Rahmani *et al.* kombinierten mit vergleichbaren Konzentrationen den BCL-2-Inhibitor Venetoclax mit dem pan-PI3K-Inhibitor GDC-0980 oder PI3K $\alpha/\delta$ -Inhibitor GDC-0941. [126]. In Untersuchungen an weiteren hämatologischen Neoplasien wurde die synergistische Aktivität von Venetoclax und selektiven PI3K-Inhibitoren bestätigt. Hierzu wurde Venetoclax in Kombination mit dem PI3K- $\delta/\gamma$  Inhibitor Duvelisib am Richter-Syndrom [110] oder dem PI3K $\alpha/\delta$ -Inhibitor Copanlisib bzw. PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib bei DLBCL untersucht [110,124,125].

Die p110 $\delta$ -Isoform der PI3K nimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung, Funktion und Apoptose von B-Zellen ein [138]. In beiden hier verwendeten Zelllinien konnte in der Inhibition der Viabilität keine eindeutige Überlegenheit einer pan-PI3K-Inhibition gegenüber einer selektiven PI3K $\delta$ -Inhibition nachgewiesen werden. Trotzdem benötigte der pan-PI3K-Inhibitor BKM-120 geringere Konzentrationen für die IC<sub>20/30</sub>-Inhibition als der p110 $\delta$ -Isoform-selektive Inhibitor Idelalisib. Untersuchungen an PI3K-resistenten Brustkrebszellen zeigten, dass BKM-120 im Konzentrationsbereich über 2  $\mu\text{mol/l}$  PI3K-unabhängige Zytotoxizität aufwies [139]. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen deutlich unterhalb von 1  $\mu\text{mol/l}$  verwendet, um eine möglichst spezifische Inhibition zu erzielen. Unspezifische Effekte durch BKM-120 konnten jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden und sind Bestandteil der Diskussion zum Einfluss auf die Proteinexpression. Abschließende Aussagen über die Effektivität einer selektiven gegenüber einer pan-PI3K-Inhibition lassen sich aufgrund der Limitierung auf zwei Inhibitoren und zwei *KMT2Ar*-B-ALL-Zelllinien in dieser Arbeit nicht treffen. Die vergleichbare Effektivität der PI3K-Inhibitoren zeigte auf, dass bereits eine p110 $\delta$ -Isoform-selektive Inhibition die Viabilität der B-ALL-Zelllinien reduziert, und synergistisches Potenzial bei einer Kombination mit Venetoclax besitzt.

Trotz Schwierigkeiten in der Entwicklung selektiver AKT-Inhibitoren wird MK-2206 in der Literatur als spezifisch beschrieben [53,97]. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe implizieren, dass MK-2206 ebenfalls mit alternativen Strukturen interagiert, da antileukämische Effekte unabhängig vom pAKT-Status induziert wurden [99].

Die in dieser Arbeit gezeigte synergistische Aktivität von Venetoclax und MK-2206 konnte ebenfalls durch Arbeiten an primären CLL-Zellen und zwei DLBCL-Zelllinien nachgewiesen werden [140,141]. Mögliche Signalweg-unabhängige Interaktionen der Inhibitoren werden in der Diskussion zur Protein- und Genexpression näher betrachtet.

Die simultane Applikation von Venetoclax und Perifosin bewirkte die stärkste Reduktion der Viabilität und metabolischen Aktivität. Daten über die kombinierten Applikation von Venetoclax und Perifosin sind nach aktueller Recherche nicht bekannt und werden in dieser Arbeit erstmalig beschrieben (Stand: 26.07.2023). Perifosin und MK-2206 unterscheiden sich grundlegend in ihrer Struktur und ihrem Mechanismus der AKT-Inhibition. MK-2206 inhibiert als allosterischer Inhibitor die katalytische und die PH-Domäne der Kinase AKT [71,97]. Perifosin hingegen interagiert als Alkylphospholipid mit membrangebundenen Signalwegen und dem natürlichen Stoffwechsel der Phospholipide. Über die Interaktion mit der PH-Domäne wird die Translokation und Aktivierung von AKT inhibiert [104].

Präklinische Untersuchungen an verschiedensten hämatologischen Entitäten wie dem Multiplen Myelom, der AML und der T-ALL wiesen eine potente Inhibition der Viabilität durch Perifosin nach [104–106]. Zudem zeigte sich eine hohe Effektivität gegenüber *TP53*-mutierten AML-Zelllinien [142]. In Anbetracht der Wirkungsweise beider AKT-Inhibitoren ist bei MK-2206 eine höhere Selektivität gegenüber der Kinase AKT zu vermuten. Folgend ist die stärker ausgeprägte Aktivität von Venetoclax und Perifosin möglicherweise auf die Inhibition alternativer Strukturen zurückzuführen. Bekannt sind Interaktionen mit *lipid-rafts*, Mikrodomänen der Zellmembran mit spezieller Lipidzusammensetzung und Assoziation zur Signaltransduktion [143], verminderte Phosphorylierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MEK) und *extracellular-signal regulated kinases* (ERK), sowie eine geringere Expression von P-Glykoprotein und Survivin [95,104]

Für viele Therapieformen ist es entscheidend, in welcher Reihenfolge die Kombinationspartner appliziert werden [144,145]. Mit höchster Konsistenz resultierte die zeitgleiche Applikation von Venetoclax und dem PI3K/AKT-Inhibitor in stärkeren Effekten in beiden Zelllinien und wurde schlussfolgernd für anschließende Untersuchungen verwendet. Zwischen dem BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg bestehen eine Vielzahl antiapoptotischer Verbindungen (Einleitung, Abbildung 6). Durch simultane Inhibition antiapoptotischer Faktoren kann der PI3K/AKT-Signalweg sensibilisierend auf die Applikation eines BCL-2-Inhibitors einwirken. In Folge einer se-

quenziellen Applikation könnten diese Effekte beeinträchtigt werden. Durch die initiale Inkubation des PI3K/AKT-Inhibitors könnten die konvergierenden Effekte bereits durch kompensatorisch aktivierte Signalwege gemindert sein. Bei einer vorausgehenden Applikation von Venetoclax wäre dagegen eine Induktion der Apoptose wahrscheinlich und könnte aufgrund gehemmter Proliferation die Empfänglichkeit für eine PI3K/AKT-Inhibition reduzieren.

### 5.2.2 Induktion apoptotischer Prozesse

Die Einzelapplikation von Venetoclax führte vor allem in SEM-Zellen zu typischen morphologischen Korrelaten der Apoptose, während sich die beobachteten Effekte in der Zelllinie RS4;11 dezenter präsentierten. Die Effekte der PI3K-Inhibitoren waren in beiden Zelllinien moderat und wiesen nur vereinzelt Merkmale apoptotischer Zellen auf.

Die Resultate der Kombinationsansätze sprechen aufgrund der vergrößerten Zellen und der Dysintegrität der Zellmembranen für spätapoptotische oder nekrotische Prozesse. Darüber hinaus ist morphologisch ersichtlich, dass die antileukämische Wirkung in Kombination gesteigert wurde. Diese Feststellungen betonen das Potential kombinierter BCL-2- und PI3K-Inhibition und decken sich sowohl mit den Ergebnissen der antiproliferativen Wirkung als auch den Bliss-Berechnungen zur synergistischen Aktivität.

Weiterführende durchflusszytometrische Untersuchungen der Apoptoserate (Annexin V/PI) und Expression der aktivierten Effektorcaspase 3 erwiesen in Übereinstimmung mit bereits bestehender Literatur eine Induktion der Apoptose mit niedermolaren Konzentrationen von Venetoclax [4,5,146–148].

Weder BKM-120 noch Idelalisib bewirkten einzeln appliziert eine Induktion apoptotischer Marker. Die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren wurden im Bereich der IC<sub>20/30</sub>-Werte gewählt, um spezifisch synergistische Effekte der Kombinationen nachzuweisen zu können. Andere Arbeiten zeigten, dass BKM-120 und Idelalisib in höheren Konzentrationsbereichen Apoptose in ALL-Zelllinien induzieren [90,101]. Eine niedrig dosierte PI3K-Inhibition scheint nicht in der Lage zu sein, apoptotische Prozesse in den B-ALL-Zelllinien hervorzurufen, besitzt jedoch das Potential, eine gezielte Apoptose-Induktion durch BCL-2-Inhibition zu verstärken. Dies wurde durch eine gesteigerte Rate Annexin V/PI-positiver Zellen und leicht gesteigerter Translokation des Effektorproteins BAX an die mitochondriale Membran ersichtlich. Untersuchungen von Rahmani *et al.* an AML-Zelllinien zeigten, dass kombinierte BCL-2- (Venetoclax) und pan-PI3K-Inhibition (GDC-098) die Apoptose-Induktion und Translokation des Effektorproteins BAX um ein Vielfaches steigerte [126]. Es ist dabei jedoch hervorzuheben, dass sich sowohl Zelllinien als auch Inhibitoren unterschieden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist folglich nur begrenzt möglich.

Berechnungen zur synergistischen Aktivität der kombinierten BCL-2- und PI3K-Inhibition basierend auf durchflusszytometrischen Annexin V/PI-Färbungen weisen eine additive Wirkung

in SEM-Zellen nach. Interessanterweise finden sich in diesem Zusammenhang keine Steigerungen der intrazellulären *cleaved*-Caspase 3-Expression. Die Annexin V/PI-Färbung differenziert nicht zwischen spätapoptotischen und nekrotischen Zellen. Der Farbstoff PI passiert erst im Zustand reduzierter Membranintegrität die Zellmembran und lagert sich in die DNA ein. Dies kann sowohl durch spätapoptotische und nekrotische Prozesse oder andere Formen des Zelltods hervorgerufen sein [12,13]. Die Ergebnisse der BAX-Translokation sprechen für keine stark gesteigerte Aktivität des mitochondrialen Signalwegs und auch die Caspase 3, ein charakteristischer Indikator der Apoptose, zeigte keine erhöhte Aktivität. Zusammengenommen sind die gesteigerte Annexin V/PI-positiven Zellen und die morphologischen Veränderungen in Folge der kombinierter BCL-2- und PI3K-Inhibition vermutlich nicht auf eine gesteigerte Induktion der BCL-2-abhängigen Apoptose zurückzuführen. Wahrscheinlicher sind alternative Formen des Zelltods oder Seneszenz, welche keine Aktivität der Caspase 3 bedürfen und auch verstärkte antiproliferative Effekte erklären würden. Zum Nachweis der Seneszenz könnte in vertiefenden Analysen histochemisch die  $\beta$ -Galactosidase nachgewiesen werden. Auf alternative Formen des Zelltodes, sowie auf Aktivitäten des extrinsischen Signalwegs der Apoptose, wird in der Diskussion über die Modulation der Genexpression vertiefend eingegangen.

In der Zelllinie RS4;11 erwiesen Berechnungen nach Bliss zur Apoptose-Induktion sogar leicht antagonistische Effekte der Kombinationen mit PI3K-Inhibitoren. Das unterschiedliche Ansprechverhalten der Zellen lässt sich eventuell über die molekulargenetischen Charakteristika der Zelllinien erklären. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass die basale Proteinexpression des Tumorsuppressors p53 in beiden Zelllinien stark voneinander abweicht (Anhang, Abbildung S2). Während p53 in SEM stark exprimiert war, konnte fast keine Expression des Proteins in der Zelllinie RS4;11 nachgewiesen werden. Der Tumorsuppressor p53 induziert infolge von DNA-Schäden oder zellulärem Stress Apoptose. Diese erfolgt unter anderem über die Regulierung der proapoptotischen BH3-*only* Proteine PUMA und NOXA [149]. Die Kinase AKT reguliert p53 über MDM2 negativ und fördert somit das Überleben der Zelle [54]. Eine PI3K-Inhibition könnte somit durch eine gesteigerte p53-Expression in SEM-Zellen proapoptotisch wirken. Dieser Mechanismus wurde in einer Arbeit von Naderali *et al.* beschrieben. Die Applikation von BKM-120 resultierte hier in einer gesteigerten Expression von p53 und Apoptose-Induktion in den beiden B-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 [101]. Die verminderte Proteinexpression von p53 in der Zelllinie RS4;11 könnte daher ein Grund für das geringere Ansprechen dieser Zellen sein. In einer Studie von Bashash *et al.* konnte in einer AML-Zelllinie mit mutiertem *TP53* gezeigt werden, dass BKM-120 sowohl über p53 Apoptose induziert als auch p53-unabhängig über den PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B-Signalweg [150].

Analog zu den zuvor beschriebenen PI3K-Inhibitoren induzierte auch der pan-AKT-Inhibitor MK-2206 allein keine Apoptose. Die Kombination von Venetoclax und MK-2206 bewirkte ebenso charakteristische morphologische Veränderungen wie nach kombinierter BCL-2- und PI3K-Inhibition. Gegenteilig erwies die Applikation von Venetoclax und MK-2206 als einzige Kombination leicht antagonistische Effekte in der Induktion apoptotischer Prozesse. Die Ergebnisse der BAX-Translokation, *cleaved*-Caspase 3-Expression und Annexin V/PI-Färbung zeichneten dabei ein identisches Bild. Im Kontext der weiteren Ergebnisse sind die morphologischen Veränderungen somit mehr als Ausdruck einer generellen antileukämischen Wirkung zu werten. In einer Studie an humanen AML-Zelllinien bewirkte die Inkubation mit MK-2206 vergleichbare Ergebnisse. In geringen Konzentrationsbereichen (0,1 - 0,2  $\mu\text{M}$ ) konnten anti-proliferative Effekte, jedoch keine Apoptose beobachtet werden. Erst Konzentrationen im Bereich von 5 - 10  $\mu\text{M}$ , die nicht dem physiologisch erreichbaren Wirkungsbereichen entsprechen [151], resultierten in einer gesteigerten Rate apoptotischer Zellen [102].

Der AKT-Inhibitor Perifosin nahm eine Sonderstellung in der Induktion apoptotischer Prozesse ein. Bereits die Einzelapplikation führte zu schweren morphologischen Veränderungen und schien den mitochondrialen Signalweg der Apoptose zu aktivieren, impliziert durch eine gesteigerte Translokation des Effektorproteins BAX aus dem Zytoplasma an die mitochondriale Membran. Gleichmaßen induzierte Perifosin Apoptose in präklinischen Arbeiten am MM, der AML, sowie der T-ALL [105,106,152]. Die Kombination von Venetoclax und Perifosin potenzierte die morphologischen Veränderungen und ließ die Frage nach apoptotischen oder nekrotischen Prozessen offen. In der Kombination wurde eine signifikante, bis zu 12-fach gesteigerte Expression der *cleaved*-Caspase 3 und eine synergistische Induktion früh-apoptotischer Zellen nachgewiesen – zwei eindeutige Merkmale von apoptotischen Prozessen. Leicht geringer ausgeprägte Effekte in der Zelllinie RS4;11 können auf Grundlage der basalen Proteinexpression diskutiert werden. Hier zeigten sich sowohl in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Anhang, Abbildung S2), als auch in selbst durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen (Anhang, Abbildung S1) eine geringere pAKT-Expression in der Zelllinie RS4;11 gegenüber SEM-Zellen. Dies kann ursächlich für ein vermindertes Ansprechen der Zelllinie sein. Die Relevanz der pAKT-Expression wird in der Diskussion zur Proteinexpression detaillierter betrachtet. Im Kontext aller Ergebnisse führte die Kombination von Venetoclax und Perifosin zu einer gesteigerten Apoptose-Induktion und erwies als einziger Ansatz synergistisches Potential in der Induktion apoptotischer Prozesse.

Zusammengenommen nimmt Perifosin eine gesonderte Stellung als AKT-Inhibitor ein. Synergistisches Potential der Kombination von Venetoclax und Perifosin kann an mehreren Punkten der Apoptose konvergieren: sowohl über Effekte im mitochondrialen Signalweg der Apoptose als auch über eine Induktion des extrinsischen Signalwegs bestehen mögliche Interaktionen mit Venetoclax. In einer Arbeit von Hideshima *et al.* konnte gezeigt werden, dass Perifosin

*cleaved*-Caspase 8, 9 und die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in Zelllinien des MM induzierte. Die Aktivierung der Caspase 8 schien über einer Phosphorylierung der JNK bedingt zu sein [106]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Perifosin potenziell den extrinsischen Signalweg der Apoptose beeinflusst und stützen unsere Analysen zur Genexpression. Die Inkubation mit Perifosin in T-ALL-Zelllinien bestätigte diese Resultate und wies zudem eine gesteigerte Aktivität des mitochondrialen Signalwegs über Freisetzung von Cytochrom c nach [105].

### 5.2.3 Modulation der Proteinexpression

Um Wechselwirkungen der BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition differenziert beurteilen zu können, wurde die Expression von Schlüsselproteinen des BCL-2-Signalwegs und von pAKT analysiert.

Venetoclax kann modulierend auf Gene und Proteine der Apoptose und des PI3K/AKT-Signalwegs wirken. In einer präklinischen Studie am DLBCL zeigte sich nach Inkubation mit Venetoclax eine verminderte PTEN-Expression und gesteigerte AKT-Phosphorylierung. Nachfolgend konnte synergistische Aktivität in Kombination mit AKT-Inhibitoren nachgewiesen werden [141]. In der vorliegenden Arbeit führte die Einzelapplikation von Venetoclax zu einer leichten pAKT-Suppression in SEM-Zellen. Mögliche Mechanismen stellen die gesteigerte Expression regulierender Gene des PI3K/AKT-Signalwegs wie *PIK3R1* und *PTEN* oder Suppression aktivierender Gene (*JAK2*, *FLT3*, *IL7R*) dar.

Ein Haupteffektor der PI3K ist die Kinase AKT. Inhibitionen der katalytischen Domänen der PI3Ks sollten folglich auch in einer Reduktion von pAKT resultieren [62,63,90]. Dieser biologische Zusammenhang deckt sich mit der Applikation von Idelalisib in RS4;11-, nicht jedoch in SEM-Zellen. Nach Applikation von Idelalisib konnte in präklinischen Studien an CLL- und ALL-Zellen mit variierender Zytogenetik eine Suppression von pAKT nachgewiesen werden [90,153]. In einer Studie von Ava Safaroghli-Azar *et al.* an NALM-6 B-ALL-Zellen wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion von pAKT mittels Western Blot nachgewiesen, wobei die geringste angewandte Konzentration 5 µM betrug und bis 30 µM gesteigert wurde [90]. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die verwendeten Methodiken, alternative Zelllinien, sowie Konzentrationsunterschiede und die unterschiedliche basale AKT-Expression zurückzuführen sein.

Bei vergleichbarem Einfluss auf die Viabilität, resultiert die Anwendung von BKM-120 in einer variableren Reduktion von pAKT als Idelalisib. In SEM-Zellen führte BKM-120 entgegen der Erwartung zu einer stark gesteigerten Expression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Inkubation mit BKM-120, über Aktivierung alternativer Signalwege, zur kompensatorischen Aktivierung von AKT führte. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch in einer klinischen Phase I-Studie an fortgeschrittenen Formen akuter Leukämien. Hier resultierte die Therapie

mit BKM-120 in einer Suppression von *AKT-downstream*-Substraten wie FOXO3A und S6K, jedoch in einer Erhöhung der pAKT-Expression [88].

Während Perifosin in der Zelllinie RS4;11 AKT leicht inhibierte, konnte in SEM-Zellen nur eine Tendenz hierzu beobachtet werden. In Arbeiten an Zelllinien des MM, der AML und der T-ALL konnte hingegen eine Dephosphorylierung von AKT gezeigt werden [105,106,152]. Die AKT-Inhibition durch MK-2206 bestätigte sich hingegen in den Ergebnissen der Proteinexpression. Als einziger Inhibitor konnte sowohl einzeln als auch in Kombination mit Venetoclax eine konsistente Reduktion von pAKT in beiden Zelllinien beobachtet werden. Dies unterstreicht die in der Literatur beschriebene Potenz des Inhibitors [102,154].

Die Kombinationsansätze der AKT-Inhibitoren mit Venetoclax resultierten in keinen verstärkten Effekten auf die AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu den Einzelapplikationen. Schlussfolgernd erscheint eine synergistische Aktivität der kombinierten BCL-2 und PI3K/AKT-Inhibition basierend auf der Regulation von pAKT eher unwahrscheinlich.

In den Ergebnissen der Proteinexpression wurde ersichtlich, dass Ansätze mit reduziertem pAKT tendenziell auch eine verminderte BCL-2-Phosphorylierung aufwiesen. Mutmaßlich phosphorylieren eine Vielzahl von Kinasen BCL-2. Unter anderem scheinen die Proteinkinase C (PKC) und MAP-Kinasen in die BCL-2-Phosphorylierung involviert zu sein [155,156]. Über PIP3 aktiviert die PI3K im physiologischen Zustand neben AKT auch weitere Effektoren [63]. Effekte auf pBCL-2 durch PI3K/AKT-Inhibitoren wären sowohl durch einen direkten Einfluss als auch über Interaktionen mit alternativen Signalwegen denkbar.

Interessanterweise konnte gleichzeitig die Tendenz beobachtet werden, dass Ansätze mit gesteigerter AKT-Phosphorylierung eine erhöhte pBCL-2-Expression aufwiesen. Vermutlich ist die Phosphorylierung von BCL-2 Ausdruck kompensatorisch aktivierter Signalwege. Die phosphorylierte Form des Proteins BCL-2 steht in Zusammenhang mit einer verstärkten antiapoptotischen Wirkung und scheint einen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen zu haben [156]. Untersuchungen an Ovarialkarzinom-Zellen wiesen über eine ERK-Aktivierung die Phosphorylierung von BCL-2 und eine nachfolgende Inhibition der Apoptose nach [135]. Eine Interaktion mit ERK wäre eine mögliche Ursache variierender pBCL-2-Expression. Physiologisch sind eine Vielzahl an Verbindungen zwischen dem MAPK- und dem PI3K/AKT-Signalweg bekannt. Unter anderem konvergieren beide Signalwege in der Regulation der Apoptose über die *BH3-only*-Proteine [157]. Eine direkte Interaktion beider Signalwege konnte zudem in einer Arbeit an MM-Zelllinien nachgewiesen werden. Eine AKT-Inhibition mittels MK-2206 resultierte hier in einer gesteigerten pERK-Expression. Bei gleicher Inkubationszeit lag die verwendete Konzentration von MK-2206 in der Studie an MM-Zellen jedoch um ein 10-faches höher als in der vorliegenden Arbeit, was unspezifische Effekte erklären könnte [158]. Die pBCL-2-Expression spiegelte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht in einer

gesteigerten Protektion gegenüber antileukämischen Effekten wider. Dies wurde durch vergleichbare Effektivität von BKM-120 und Idelalisib in SEM-Zellen ersichtlich, wobei BKM-120 stark die pBCL-2-Expression induzierte, während Idelalisib diese leicht inhibierte.

Es konnte weiterhin die Tendenz beobachtet werden, dass die AKT-Phosphorylierung und die MCL-1-Expression gleichsinnig reguliert wurden. Über die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  greift AKT unter anderem positiv in die transkriptionelle Regulation von MCL-1 ein [110,122]. Eine AKT-Inhibition kann daher den MCL-1-Spiegel verringern und potenziell synergistisch mit einer selektiven BCL-2-Inhibition wirken [110,126,159]. Eine Studie an Venetoclax-resistenten DLBCL-Zelllinien beobachtete, dass sowohl die PI3K-Inhibition mittels Idelalisib, als auch duale PI3K/mTOR-Inhibition (NVP-BEZ235), über eine Degradation von MCL-1 die resistenten Zellen für Venetoclax sensibilisierten [54]. Untersuchungen zur Effektivität von Venetoclax und MK-2206 in primären CLL-Zellen wiesen vergleichend eine signifikante Reduktion der antiapoptischen Proteine MCL-1 und BFL-1 nach [140]. Ebenfalls eine Arbeit zur kombinierten Applikation von Perifosin und einem dualen BCL-2- und BCL-xL-Inhibitor (ABT-737) an humanen Lungenkrebszelllinien führte die synergistische Aktivität der Kombination auf die Perifosin-vermittelte Suppression von MCL-1 zurück [107].

Vergleichend zu bestehender Literatur zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine tendenziell verminderte MCL-1-Expression nach Inkubation von Venetoclax und Perifosin in SEM-Zellen. Die in dieser Studie nachgewiesene synergistische Aktivität von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren könnten anteilig auf diesem Mechanismus beruhen. Zur Bestätigung des biologischen Zusammenhangs zwischen der AKT-Phosphorylierung und der MCL-1-Expression in den untersuchten humanen B-ALL-Zelllinien sind die Resultate dieser Arbeit jedoch nicht hinreichend. Die variable Regulierung von pAKT und nur leichte Suppression von MCL-1 in SEM-Zellen argumentieren für zusätzliche Wirkmechanismen.

Eine relevante Beeinflussung der Expression von BCL-2, BCL-xL und BAX konnte nach Inkubation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse gleichen sich mit Untersuchungen von Rahmani *et al.* an AML-Zelllinien. Die kombinierte BCL-2- und PI3K-Inhibition modulierte die pAKT- und MCL-1-Expression, erwies jedoch nur diskrete Effekte auf BCL-2, BCL-xL und BAX [126]. In einer weiteren Arbeit an Venetoclax-resistenten DLBCL-Zellen resultierte die kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT/mTOR-Inhibition in einer Degradation von MCL-1 und gleichzeitig keiner Beeinflussung von BCL-xL. Trotz der hohen BCL-xL-Expression genügte die Imbalance im mitochondrialen Signalweg, durch Suppression von BCL-2 und MCL-1, zur Induktion der Apoptose [159].

Schlussfolgernd kann aus der Analyse der Proteinexpression die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Modulation der Expression von pAKT und der BCL-2-Signalweg-Proteine nicht alleinig für die synergistischen Effekte der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition verantwortlich ist. Eine erhöhte Phosphorylierung von AKT und BCL-2 impliziert zudem kompensatorische Effekte außerhalb der untersuchten Signalwege. In Anbetracht dessen, dass keine Kombination AKT potenter inhibierte als MK-2206, ist eine höhere synergistische Aktivität weiterer Kombinationen und die Induktion der Apoptose durch Perifosin vermutlich auf AKT-unabhängige Mechanismen zurückzuführen. Insbesondere der breite Wirkmechanismus von Perifosin prädisponiert die Substanz zur Wechselwirkung mit alternativen Strukturen [160].

### 5.2.4 Modulation der Genexpression

Um die mechanistischen Hintergründe der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition vertiefend zu untersuchen, wurde der Einfluss auf die Genexpression mittels *targeted RNA sequencing* untersucht. Hierzu wurde ein individuell konzipiertes Panel von 214 Genen, einschließlich des PI3K/AKT- und BCL-2-Signalwegs, sowie weiterer relevanter Gene der apoptotischen und leukämischen Signalkaskaden verwendet.

Einzel appliziert führte Venetoclax zu geringeren Regulationen der Genexpression im Vergleich zu den PI3K/AKT-Inhibitoren. Das Gesamtbild des Expressionsmusters spiegelt die proapoptotische Wirkung und Modulation des mitochondrialen Signalwegs wider und steht im Einklang mit den Ergebnissen zur Apoptoseinduktion und weiteren Arbeiten über die Venetoclax-Applikation in ALL-Zelllinien [5,38,161]. Weiterhin konnte in dieser Arbeit nach Inkubation mit Venetoclax in beiden Zelllinien die Tendenz zur Modulation von Regulatoren des Zellzyklus, der Proliferation und der Differenzierung beobachtet werden. Exemplarisch für diese Funktionen ist die Hochregulation von *FOS*. An humanen Brustkrebs-Zelllinien konnten nach Inkubation mit Venetoclax vergleichbare Effekte nachgewiesen werden. Durch Inhibition von Cyclin D1 und des Transkriptionsfaktors E2F1 führte Venetoclax zu verminderter Proliferation und Zellzyklusarrest [162]. Die beschriebenen Effekte stellen aufgrund der nicht-signifikanten Regulation zwar nur Tendenzen dar, können jedoch einen weiteren Erklärungsansatz zur synergistischen Aktivität von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren darstellen.

Der Einfluss von BKM-120 auf die Genexpression stützt die These kompensatorisch aktivierter Signalwege. Analog zu den Ergebnissen der Proteinexpressionsstudien konnte eine starke Induktion von Aktivatoren des PI3K/AKT-Signalwegs nachgewiesen werden. Es zeigten sich gesteigerte Transkripte von *JAK1*, *STAT5* und *FLT3*. Die membrangebundene Tyrosinkinase FLT3 induziert in nicht-neoplastischen Zellen den PI3K/AKT-Signalweg und scheint in mutierter Form auch direkt AKT zu aktivieren [163–165]. Insbesondere in maligne transformierten Zellen finden sich vielfältige Interaktionen relevanter Signalwege. In myeloproliferativen Erkrankungen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass JAK neben dem PI3K/AKT-

auch den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg induziert [166,167]. In der Diskussion zur Proteinexpression wurde bereits die Verbindung von ERK zu pBCL-2 aufgegriffen. Die These der kompensatorischen BCL-2-Phosphorylierung könnte daher auch auf diesen Quervernetzungen beruhen.

In der Diskussion zur Induktion apoptotischer Prozesse der PI3K-Inhibitoren BKM-120 und Idelalisib konnte gezeigt werden, dass ursächlich für die gesteigerte Gesamtrate Annexin V/PI-positiver Zellen wahrscheinlich nicht der mitochondriale, sondern alternative Signalwege des Zelltodes aktiviert wurden. Diese These wird durch den Einfluss auf die Genexpression gestützt. Es konnte keine relevante Regulation des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose beobachtet werden. Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit induzierte BKM-120 (1-4  $\mu\text{M}$ ) in einer Untersuchung von Bashash *et al.* Apoptose in der B-ALL-Zelllinie NALM-6 und steigerte die Expression der proapoptischen Gene *BAX* und *BAD*. Mechanistisch wurde eine p53-abhängige Induktion der Gene vermutet [150]. Unterschiedliche Ergebnisse lassen sich sowohl auf Grundlage höhere Konzentrationen des PI3K-Inhibitors als auch aufgrund alternativer Zelllinien diskutieren.

Obwohl keine gesteigerte Apoptose nachgewiesen wurde, führte BKM-120 in der Zelllinie SEM zu einer gesteigerten Genexpression von Akteuren des extrinsischen Signalwegs. Zudem konnte in der Kombination von Venetoclax und BKM-120 eine signifikant gesteigerte Expression von *TNF* und erhöhte Expression weiterer Gene der *TNF*-Familie, sowie von *CASP8* und *CASP10* nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit Idelalisib führte zu keinen signifikanten Modulationen, induzierte jedoch vergleichbare Effekte. Insbesondere die Aktivität von TNF und assoziierten Proteinen sind charakteristisch für den Prozess der programmierten Nekrose (Nekroptose) [13,168,169]. Im Kontext der Genexpression und keiner nachgewiesenen Charakteristika der Apoptose scheint die Induktion eines lytischen Zelltodes wie der Nekroptose als Ursache gesteigerter Annexin V/PI-positiver Zellen als möglich [169]. Dies steht neben den durchflusszytometrischen Analysen auch in einer Linie mit den morphologischen Veränderungen durch die PI3K-Inhibitoren. Die synergistische Inhibition der Vitalität könnte zudem auf den Ebenen der Zellzykluskontrolle oder Regulation der Proliferation konvergieren. BKM-120 induzierte signifikant *AFF3* und *FOS*, während zu den am stärksten hochregulierten Genen von Idelalisib *AFF3* und *EP300* zählen. Die Transkripte von *FOS* und *JUN* bilden den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose nimmt [170].

Der AKT-Inhibitor MK-2206 resultierte einzeln und in Kombination mit Venetoclax in der höchsten Anzahl signifikant regulierter Gene. Auffallend war, dass alle Inhibitoren, einschließlich MK-2206, Gene im Bereich des extrinsischen Signalwegs der Apoptose hochregulierten.

MK-2006 zeigte, außer einer leichten Suppression von MCL-1, jedoch keine relevante Regulation des BCL-2-Signalwegs. Eine hohe Persistenz antiapoptotischer BCL-2-Proteine könnte protektiv gegenüber der Aktivität des extrinsischen Signalwegs gewirkt und so die Initiation der Apoptose geblockt haben.

In SEM-Zellen bewirkte der pan-AKT-Inhibitor eine signifikante Beeinflussung relevanter leukämischer Gene wie *AFF3*, *EP300*, *FOS* und *ATM*. Die in dieser Arbeit gezeigten synergistischen antiproliferativen Effekte der Kombination von Venetoclax und MK-2206 könnten daher analog zur Hypothese der kombinierten BCL-2- und PI3K-Inhibition auf der Induktion von Regulatoren der Proliferation, Differenzierung und des Zellzyklus basieren. Interessanterweise resultierte die Kombination von Venetoclax und MK-2006 in RS4;11 in der höchsten synergistischen Aktivität im Bereich antiproliferativer Effekte. Gleichzeitig wurde in RS4;11-Zellen eine geringe Beeinflussung der Genexpression nachgewiesen. Das individualisierte Panel zur Analyse der Genexpression fokussiert sich auf relevante Akteure des PI3K/AKT-Signalwegs und Apoptose-relevanter Kaskaden und ist somit nicht hinreichend, um Effekte außerhalb dieser Signalwege abzubilden. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten eine pAKT-unabhängige Wirkung von MK-2206 [99]. Die Untersuchungen der Genexpression stützen die These, dass MK-2206 zusätzliche Effekte außerhalb des PI3K/AKT-Signalwegs induziert.

In einer Linie mit präklinischen Untersuchungen von Perifosin an Zelllinien der AML oder T-ALL repräsentieren die Ergebnisse der Genexpression eine Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der Apoptose [105,152]. Die Kombination von Venetoclax und Perifosin war der einzige Ansatz, welcher synergistisch Apoptose in SEM-Zellen induzierte. Eine signifikante Steigerung von *TNF*, sowie die Modulation des extrinsischen Signalwegs konnte ebenfalls nach Inkubation mit alternativen PI3K/AKT-Inhibitoren beobachtet werden. Die gesteigerte Expression von Genen des extrinsischen Signalwegs scheint daher nicht hinreichend, um Apoptose in SEM-Zellen zu induzieren.

Auffallend war, dass in SEM-Zellen ausschließlich Perifosin signifikant das Gen *BBC3* induzierte, wobei dies über alle Gene und Versuchsansätze die stärkste detektierte Genexpressionsänderung darstellte. *BBC3* kodiert für das BH3-*only* Protein PUMA, welches eine geringe Selektivität aufweist und alle antiapoptotischen BCL-2-Proteine inhibiert [16,171]. SEM und RS4;11 zeigten basal eine hohe Expression von MCL-1 und BCL-xL (Anhang, Abbildung S1). Beide Proteine stehen im Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber der BCL-2-Inhibition [172]. PUMA könnte die antiapoptotische Funktion von MCL-1 und BCL-xL inhibieren, ohne die Gesamtexpression zu beeinflussen und so synergistisch mit einer selektiven BCL-2-Inhibition wirken.

Das für PUMA kodierende Gen *BBC3* wird durch den Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 reguliert. Außer *BBC3* wurden in der Zelllinie SEM weitere Zielgene von p53, wie *BAX*, *BAK* und *BAD*, leicht gesteigert exprimiert [120,173]. Eine mögliche Erklärung für die fehlende

Induktion von *BBC3* in RS4;11-Zellen könnte folglich in der Abwesenheit des Proteins p53 begründet sein (Anhang, Abbildung S2). Interessanterweise wurde *BBC3* in SEM-Zellen zwar signifikant hochreguliert, aber es konnte keine relevante Modulation von *TP53* auf der Ebene der Genexpression nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise durch eine p53-unabhängige Regulierung von *BBC3* erklärt werden: aktuelle Studien berichteten, dass Mitglieder des JAK/STAT- (STAT3) [174] und PI3K/AKT-Signalwegs (AKT, FOXO1, FOXO3A, und GSK3 $\beta$ ) [175–178], sowie Hippo (YAP1) [179] und Mitglieder der MAPK-Kaskade (ERK, p38 und c-JUN) [180–182] zur Modulation der *BBC3*-Expression beitragen. In den Resultaten dieser Arbeit konnte jedoch keine relevante Regulation im Bereich dieser Signalwege auf Ebene der Genexpression nachgewiesen werden. Es gibt jedoch mögliche p53-unabhängige Regulatoren von *BBC3*, wie zum Beispiel der TGF- $\beta$ -Signalweg, die nicht in dem verwendeten Genexpressionspanel enthalten waren [183,184]. Auch eine direkte Modulierung von *BBC3* über Perifosin, Regulationen auf epigenetischer oder posttranslationaler Ebene, sowie kompensatorisch aktivierte Signalwege wären denkbare Mechanismen.

Die synergistische Aktivität von Venetoclax und Perifosin kann auf Grundlage dieser Arbeit nicht abschließend auf den hier dargestellten Wirkmechanismus zurückgeführt werden. Obwohl die Hochregulierung von *BBC3* die stärkste Modulation war, die im gesamten RNA-Panel der Zelllinie SEM beobachtet wurde und somit eine hohe biologische Relevanz nahelegt, sind die aktuellen Daten auf die Genexpression beschränkt und müssen in zukünftigen Studien validiert werden. Trotzdem konnte mit dieser Arbeit erstmalig eine mechanistische Rationale zur kombinierten Applikation von Venetoclax und Perifosin in der B-ALL beschrieben werden und legt die nähere Untersuchung in weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Studien nahe.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Bestehende Literatur und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass eine selektive BCL-2-Inhibition in B-ALL-Zellen mit *KMT2A*-Translokation eine vielversprechende Interventionsmöglichkeit darstellt. Problematiken in der Venetoclax-Monotherapie in anderen hämatologischen Neoplasien, beispielsweise Dosislimitierung oder primäre und sekundäre Resistenzen, argumentieren dafür, frühzeitig rationale Kombinationsansätze zu untersuchen. Der PI3K/AKT-Signalweg stellt sich aufgrund vielfältiger Interaktionen mit dem Apoptose-Signalweg und relevanter Dysregulation in der pro-B-ALL als vielversprechende Zielstruktur für eine kombinierte Inhibition dar.

Mit dieser Arbeit wird erstmalig nachgewiesen, dass eine kombinierte BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition synergistisch antiproliferativ in ALL-Zelllinien wirkt und zudem in verstärkten morphologischen Veränderungen resultiert. Hierzu wurden jeweils zwei etablierte PI3K- (BKM-120, Idelalisib) und AKT-Inhibitoren (MK-2206, Perifosin) sowie der selektive BCL-2-Inhibitor Venetoclax verwendet, um den Einfluss variierender Selektivität, Wirkmechanismen und Lokalisation der Signalweg-Inhibition zu untersuchen.

Alle Kombinationen resultieren, unabhängig von ihrer Applikationssequenz, in einer verstärkten antileukämischen Wirkung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. In vertiefenden Analysen apoptotischer Prozesse führte unter den PI3K/AKT-Inhibitoren einzig Perifosin zu einer gesteigerten Apoptoserate. Durch die Kombination von Venetoclax und Perifosin wurde eine synergistische Induktion des intrinsischen Signalwegs durch erhöhte Translokation des Effektorproteins BAX, gesteigerte *cleaved*-Caspase 3-Expression und eine signifikant erhöhte Gesamtrate apoptotischer Zellen nachgewiesen. In mechanistischen Analysen der Gen- und Proteinexpression konnte eine Induktion des proapoptotischen Gens *BBC3*, das für das Protein PUMA codiert und die antiapoptotischen Proteine um BCL-2 hemmt, als ein möglicher zentraler Wirkmechanismus identifiziert werden. Die Protein- und Genexpressionsstudien implizierten weiterhin, dass die antiproliferativen Effekte aller PI3K/AKT-Inhibitoren nicht ausschließlich auf die Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges zurückgeführt werden können. Zusätzlich zeigte die Genexpressionsanalyse jeweils eine Induktion des extrinsischen Signalwegs der Apoptose.

In Anbetracht der beobachteten Aktivität der kombinierten Applikation von Venetoclax und Perifosin empfehlen sich fortführende Untersuchungen zur Effektivität *in vivo*. Zudem sollte die synergistische Aktivität von Venetoclax und Perifosin durch die Konvergenz im mitochondrialen Signalweg über *BBC3* (PUMA) in weiteren mechanistischen Studien validiert werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
Abb	Abbildung
AF4	<i>ALL1-fused gene from chromosome</i>
AFF1	<i>AF4/FMR2 Family Member 1</i>
AFF3	<i>AF4/FMR2 Family Member 3</i>
AKT	Proteinkinase AKT/ Proteinkinase B, PKB
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APL	Alkyphospholipid
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated serine/threonine kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	Akute lymphatische Leukämie des B-Zell-Typs
BACH2	<i>BTB domain and CNC homolog 2</i>
BAD	<i>BCL-2-associated death promotor, BH3-interacting domain</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist killer</i>
BAX	<i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i>
BCL-2	<i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i>
BCL-xL	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-W	<i>B-cell lymphoma-w</i>
BFL-1	<i>BCL-2-related gene expressed in fetal liver-1</i>
BH	<i>BCL-2-homolog</i>
BID	<i>BCL-2-interacting mediator of cell death</i>
BIM	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>
BKM	BKM-120, Buparlisib
BOK	<i>BCL-2 related ovarian killer</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CASP	Caspase
CD95L	Fas-Ligand
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK2	Casein Kinase 2
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom

## Abkürzungsverzeichnis

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOT1L	DOT1-ähnliche Histon-H3K79-Methyltransferase
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Erwartungswert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF-4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMA	Europäischen Arzneimittelkommission
EP300	Histone acetyltransferase p300
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
FOS	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
FOXO(3A)	<i>Forkhead-box-protein O (3A)</i>
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 Beta
GZMA	Granzyme A
H3K79	Histon H3 Lysin 79
IC	Inhibitory concentration
IDEL	Idelalisib, CAL-101, GS1101
KMT2A	Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A
KMT2Ar	<i>KMT2A rearranged</i>
KON	Kontrolle
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase, MAPK</i>
MK	MK-2206
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MM	Multiplles Myelom
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MW	Mittelwert
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOXA	Phorbol-12myristate-13-acetate–induced protein 1; PMAIP1
p	Phosphoryliert
p70 S6K	p70 S6-Kinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

pAKT	Phospho-AKT
pBCL-2	Phospho-BCL-2
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	<i>Phosphate-buffered saline with Tween®</i>
PCA	<i>Principal components analysis</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PE	Phycoerythrin
PERI	Perifosin, KRX-0401
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase katalytische Untereinheit Alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PRKCD	Protein Kinase C Delta
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
R/R	Rezidiert / refraktär
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SD	Standardabweichung
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie des T-Zell-Typs
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR1	TNF-Rezeptor-Typ 1
TNFSF10	<i>TNF superfamily member 10</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSC	Tuberöse Sklerose Protein-Komplex
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
VEN	Venetoclax, ABT-199
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium</i>

**8. Literaturverzeichnis**

1. Malard, F.; Mohty, M. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *The Lancet* **2020**, *395*, 1146–1162, doi:10.1016/S0140-6736(19)33018-1.
2. König, I.R.; Fuchs, O.; Hansen, G.; von Mutius, E.; Kopp, M. V What Is Precision Medicine? *Eur Respir J* **2017**, *50*, doi:10.1183/13993003.00391-2017.
3. Khaw, S.L.; Suryani, S.; Evans, K.; Richmond, J.; Robbins, A.; Kurmasheva, R.T.; Billups, C.A.; Erickson, S.W.; Guo, Y.; Houghton, P.J.; et al. Venetoclax Responses of Pediatric ALL Xenografts Reveal Sensitivity of MLL-Rearranged Leukemia. *Blood* **2016**, *128*, 1382–1395, doi:10.1182/blood-2016-03-707414.
4. Richter, A.; Lange, S.; Holz, C.; Brock, L.; Freitag, T.; Sekora, A.; Knuebel, G.; Krohn, S.; Schwarz, R.; Hinz, B.; et al. Effective Tumor Cell Abrogation via Venetoclax-Mediated BCL-2 Inhibition in KMT2A-Rearranged Acute B-Lymphoblastic Leukemia. *Cell Death Discov* **2022**, *8*, 302, doi:10.1038/s41420-022-01093-3.
5. Benito, J.M.; Godfrey, L.; Kojima, K.; Hogdal, L.; Wunderlich, M.; Geng, H.; Marzo, I.; Harutyunyan, K.G.; Golfman, L.; North, P.; et al. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Rep* **2015**, *13*, 2715–2727, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.003.
6. Blombery, P. Mechanisms of Intrinsic and Acquired Resistance to Venetoclax in B-Cell Lymphoproliferative Disease. *Leuk Lymphoma* **2019**, *0*, 1–6, doi:10.1080/10428194.2019.1660974.
7. Kapoor, I.; Bodo, J.; Hill, B.T.; Hsi, E.D.; Almasan, A. Targeting BCL-2 in B-Cell Malignancies and Overcoming Therapeutic Resistance. *Cell Death Dis* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41419-020-03144-y.
8. Gomes, A.M.; Soares, M.V.D.; Ribeiro, P.; Caldas, J.; Póvoa, V.; Martins, L.R.; Melão, A.; Serra-caetano, A.; Sousa, A.B. de; Lacerda, J.F.; et al. Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Display Decreased PTEN Activity and Constitutive Hyperactivation of PI3K/Akt Pathway despite High PTEN Protein Levels. *Haematologica* **2014**, doi:10.3324/haematol.2013.096438.
9. Morishita, N.; Tsukahara, H.; Chayama, K.; Ishida, T.; Washio, K.; Miyamura, T.; Yamashita, N.; Oda, M.; Morishima, T. Activation of Akt Is Associated with Poor Prognosis and Chemotherapeutic Resistance in Pediatric B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **2012**, *59*, 83–89, doi:10.1002/pbc.24034.
10. Wang, J.; Xu-Monette, Z.Y.; Jabbar, K.J.; Shen, Q.; Manyam, G.C.; Tzankov, A.; Visco, C.; Wang, J.; Montes-Moreno, S.; Dybkær, K.; et al. AKT Hyperactivation and the Potential of AKT-Targeted Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* **2017**, *187*, 1700–1716, doi:10.1016/j.ajpath.2017.04.009.

11. Fulda, S.; Debatin, K.M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25*, 4798–4811, doi:10.1038/sj.onc.1209608.
12. Fadeel, B.; Orrenius, S. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Human Disease. *J Intern Med* **2005**, *258*, 479–517, doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
13. Mou, Y.; Wang, J.; Wu, J.; He, D.; Zhang, C.; Duan, C.; Li, B. Ferroptosis, a New Form of Cell Death: Opportunities and Challenges in Cancer. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 1–16, doi:10.1186/s13045-019-0720-y.
14. Kang, M.H.; Reynolds, C.P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* **2009**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0144.
15. Douglas R Green The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell* **2019**, *176*, 100–106, doi:10.1016/j.cell.2019.04.024.
16. Valentin, R.; Grabow, S.; Davids, M.S. The Rise of Apoptosis: Targeting Apoptosis in Hematologic Malignancies. *Blood* **2018**, *132*, 1248–1264, doi:10.1182/blood-2018-02-791350.
17. Diepstraten, S.T.; Anderson, M.A.; Czabotar, P.E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Kelly, G.L. The Manipulation of Apoptosis for Cancer Therapy Using BH3-Mimetic Drugs. *Nat Rev Cancer* **2021**, *0123456789*, doi:10.1038/s41568-021-00407-4.
18. Ashkenazi, A.; Fairbrother, W.J.; Levenson, J.D.; Souers, A.J. From Basic Apoptosis Discoveries to Advanced Selective BCL-2 Family Inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 273–284, doi:10.1038/nrd.2016.253.
19. Schlenk, R.F.; Kayser, S. *Small Molecules in Hematology*; Springer International Publishing, 2018; Vol. 212; ISBN 978-3-319-91438-1.
20. Neill, K.L.O.; Huang, K.; Zhang, J.; Chen, Y.; Luo, X. Inactivation of Prosurvival Bcl-2 Proteins Activates Bax / Bak through the Outer Mitochondrial Membrane. *Genes Dev.* **2016**, *973–988*, doi:10.1101/gad.276725.115.
21. Willis, S.N. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science (1979)* **2007**, doi:10.1126/science.1133289.
22. Hapko, L.; Strasser, A. BH3-Only Proteins in Apoptosis at a Glance. **2012**, doi:10.1242/jcs.090514.
23. Wei, M.C.; Zong, W.; Cheng, E.H.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.J.; Roth, K.A.; Macgregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* **2001**, *292*, 727–731, doi:10.1126/science.1059108.

24. Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for DATP and Cytochrome c. *Cell* **1996**, doi:10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
25. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1 / Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **1997**, doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
26. Robinson, B.W.; Behling, K.C.; Gupta, M.; Zhang, A.Y.; Moore, J.S.; Bantly, A.D.; Willman, C.L.; Carroll, A.J.; Adamson, P.C.; Barrett, J.S.; et al. Abundant Anti-Apoptotic BCL-2 Is a Molecular Target in Leukaemias with t(4;11) Translocation. *Br J Haematol* **2008**, *141*, 827–839, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07100.x.
27. Bodet, L.; Gomez-Bougie, P.; Touzeau, C.; Dousset, C.; Descamps, G.; Maïga, S.; Avet-Loiseau, H.; Bataille, R.; Moreau, P.; Le Gouill, S.; et al. ABT-737 Is Highly Effective against Molecular Subgroups of Multiple Myeloma. *Blood* **2011**, *118*, 3901–3910, doi:10.1182/blood-2010-11-317438.
28. Monni, O.; Joensuu, H.; Franssila, K.; Klefstrom, J.; Alitalo, K.; Knuutila, S. BCL2 Overexpression Associated with Chromosomal Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* **1997**.
29. Mirjole, J.F.; Barberi-Heyob, M.; Didelot, C.; Peyrat, J.P.; Abecassis, J.; Millon, R.; Merlin, J.L. Bcl-2/Bax Protein Ratio Predicts 5-Fluorouracil Sensitivity Independently of P53 Status. *Br J Cancer* **2000**, *83*, 1380–1386, doi:10.1054/bjoc.2000.1455.
30. Chen, L.; Willis, S.N.; Wei, A.; Smith, B.J.; Fletcher, J.I.; Hinds, M.G.; Colman, P.M.; Day, C.L.; Adams, J.M.; Huang, D.C.S.; et al. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol Cell* **2005**, *17*, 393–403, doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030.
31. Certo, M.; Del, V.; Moore, G.; Nishino, M.; Wei, G.; Korsmeyer, S.; Armstrong, S.A.; Letai, A. Mitochondria Primed by Death Signals Determine Cellular Addiction to Antia-poptotic BCL-2 Family Members. *Cancer Cell* **2006**, doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027.
32. Oltersdorf, T.; Elmore, S.W.; Shoemaker, A.R.; Armstrong, R.C.; Augeri, D.J.; Belli, B.A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T.L.; Dinges, J.; Hajduk, P.J.; et al. An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Induces Regression of Solid Tumours. *Nature* **2005**, *435*, 677–681, doi:10.1038/nature03579.
33. Schoenwaelder, S.M.; Jarman, K.E.; Gardiner, E.E.; Hua, M.; Qiao, J.; White, M.J.; Josefsson, E.C.; Alwis, I.; Ono, A.; Willcox, A.; et al. Bcl-XL-Inhibitory BH3 Mimetics Can Induce a Transient Thrombocytopeny That Undermines the Hemostatic Function of Platelets. *Blood* **2011**, *118*, 1663–1674, doi:10.1182/blood-2011-04-347849.
34. Roberts, A.W.; Seymour, J.F.; Brown, J.R.; Wierda, W.G.; Kipps, T.J.; Khaw, S.L.; Carney, D.A.; He, S.Z.; Huang, D.C.S.; Xiong, H.; et al. Substantial Susceptibility of

- Chronic Lymphocytic Leukemia to BCL2 Inhibition: Results of a Phase I Study of Navitoclax in Patients with Relapsed or Refractory Disease. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 488–496, doi:10.1200/JCO.2011.34.7898.
35. Mihalyova, J.; Jelinek, T.; Growkova, K.; Hrdinka, M.; Simicek, M.; Hajek, R. Venetoclax: A New Wave in Hematooncology. *Exp Hematol* **2018**, *61*, 10–25, doi:10.1016/j.exphem.2018.02.002.
36. Javidi-Sharifi, N.; Hobbs, G. Future Directions in Chronic Phase CML Treatment. *Curr Hematol Malig Rep* **2021**, *16*, 500–508, doi:10.1007/s11899-021-00658-w.
37. Seyfried, F.; Demir, S.; Hörl, R.L.; Stirnweiß, F.U.; Ryan, J.; Scheffold, A.; Villalobos-Ortiz, M.; Boldrin, E.; Zinngrebe, J.; Enzenmüller, S.; et al. Prediction of Venetoclax Activity in Precursor B-ALL by Functional Assessment of Apoptosis Signaling. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41419-019-1801-0.
38. Gauert, A.; Olk, N.; Pimentel-Gutiérrez, H.; Astrahantseff, K.; Jensen, L.D.; Cao, Y.; Eggert, A.; Eckert, C.; Hagemann, A.I.H. Fast, In Vivo Model for Drug-Response Prediction in Patients with B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 1–13, doi:10.3390/cancers12071883.
39. Wirth, A.K.; Wange, L.; Vosberg, S.; Henrich, K.O.; Rausch, C.; Özdemir, E.; Zeller, C.M.; Richter, D.; Feuchtinger, T.; Kaller, M.; et al. In Vivo PDX CRISPR/Cas9 Screens Reveal Mutual Therapeutic Targets to Overcome Heterogeneous Acquired Chemo-Resistance. *Leukemia* **2022**, *36*, 2863–2874, doi:10.1038/s41375-022-01726-7.
40. Pullarkat, V.A.; Lacayo, N.J.; Jabbour, E.; Rubnitz, J.E.; Bajel, A.; Laetsch, T.W.; Leonard, J.; Colace, S.I.; Khaw, S.L.; Fleming, S.A.; et al. Venetoclax and Navitoclax in Combination with Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancer Discov* **2021**, *11*, 1440–1453, doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1465.
41. ClinicalTrials.gov NIH:U.S. National Library of Medicine, ClinicalTrials.Gov, Venetoclax in ALL, 26th.July.2023: <https://Clinicaltrials.Gov/Search?Term=Venetoclax&cond=Acute%20Lymphoblastic%20Leukemia>.
42. Scott, D.E.; Bayly, A.R.; Abell, C.; Skidmore, J. Small Molecules, Big Targets: Drug Discovery Faces the Protein-Protein Interaction Challenge. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15*, 533–550, doi:10.1038/nrd.2016.29.
43. Venclyxto (Venetoclax) An Overview of Venclyxto and Why It Is Authorised in the EU Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/venclyxto>.
44. Wendtner, C.M.; Dreger, P.; Eichhorst, B.; Gregor, M.; Greil, R.; Hallek, M.; Knauf, W.U.; Pritzkuleit, R.; Schetelig, J.; Staber, P.B.; et al. Onkopedia: Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), 04.09.2022 Available online: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html>.
-

45. Eichhorst, B.; Niemann, C.U.; Kater, A.P.; Fürstenau, M.; von Tresckow, J.; Zhang, C.; Robrecht, S.; Gregor, M.; Juliusson, G.; Thornton, P.; et al. First-Line Venetoclax Combinations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2023**, *388*, 1739–1754, doi:10.1056/NEJMoa2213093.
46. Engelman, J.A.; Luo, J.; Cantley, L.C. The Evolution of Phosphatidylinositol 3-Kinases as Regulators of Growth and Metabolism. *Nat Rev Genet.* **2006**, *7*, 606–619, doi:10.1038/nrg1879.
47. Liu, P.; Cheng, H.; Roberts, T.M.; Zhao, J.J. Targeting the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 627–644, doi:10.1038/nrd2926.
48. Vanhaesebroeck, B.; Guibert, J.G.; Graupera, M. The Emerging Mechanisms of Isoform-Specific PI3K Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2010**, doi:10.1038/nrm2882.
49. Fruman, D.A.; Meyers, R.E.; Cantley, L.C. Phosphoinositide Kinases. *Annu. Rev. Biochem* **1998**, 481–507.
50. Vanhaesebroeck, B.; Leevers, S.J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P.C.; Woscholski, R.; Parker, P.J.; Waterfield, M.D. Synthesis and Function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids. *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 535–602, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.535.
51. Katso, R.; Okkenhaug, K.; Ahmadi, K.; White, S.; Timms, J.; Waterfield, M.D. Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2001**, *17*, 615–675, doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.
52. Kok, K.; Geering, B.; Vanhaesebroeck, B. Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase Expression in Health and Disease. *Trends Biochem Sci* **2009**, *34*, 115–127, doi:10.1016/j.tibs.2009.01.003.
53. Simioni, C.; Martelli, A.M.; Zauli, G.; Vitale, M.; McCubrey, J.A.; Capitani, S.; Neri, L.M. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mechanistic Target of Rapamycin Signaling Pathway in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: An Update. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 6440–6454, doi:10.1002/jcp.26539.
54. Manning, B.D.; Cantley, L.C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274, doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
55. Bellacosa, A.; Kumar, C.C.; Cristofano, A. Di; Testa, J.R. Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting. *Adv Cancer Res* **2005**, *94*, 29–86, doi:10.1016/S0065-230X(05)94002-5.
56. Georgescu, M. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* **2011**, doi:10.1177/1947601911407325.
57. Sarbassov, D.D. Phosphorylation and Regulation of Akt / PKB by the Rictor-MTOR Complex. *Science (1979)* **2012**, *1098*, doi:10.1126/science.1106148.

58. Thomas, G. V. MTOR and Cancer: Reason for Dancing at the Crossroads? *Curr Opin Genet Dev* **2006**, *16*, 78–84, doi:10.1016/j.gde.2005.12.003.
59. Wu, D.; Pan, W. GSK3: A Multifaceted Kinase in Wnt Signaling. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*, 161–168, doi:10.1016/j.tibs.2009.10.002.
60. Xie, Y.; Naizabekov, S.; Chen, Z.; Tokay, T. Power of PTEN/AKT: Molecular Switch between Tumor Suppressors and Oncogenes. *Oncol Lett* **2016**, *12*, 375–378, doi:10.3892/ol.2016.4636.
61. Richter, A.; Sender, S.; Lenz, A.; Schwarz, R.; Hinz, B.; Knuebel, G.; Sekora, A.; Murua Escobar, H.; Junghanss, C.; Roolf, C. Influence of Casein Kinase II Inhibitor CX-4945 on BCL6-Mediated Apoptotic Signaling in B-ALL in Vitro and in Vivo. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1–10, doi:10.1186/s12885-020-6650-9.
62. Fruman, D.A.; Rommel, C. PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13*, 140–156, doi:10.1038/nrd4204.
63. Thorpe, L.M.; Yuzugullu, H.; Zhao, J.J. PI3K in Cancer: Divergent Roles of Isoforms, Modes of Activation and Therapeutic Targeting. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 7–24, doi:10.1038/nrc3860.
64. Hanahan, D.; Weinberg, R. . Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
65. Zhao, J.J.; Roberts, T.M. PI3 Kinases in Cancer: From Oncogene Artifact to Leading Cancer Target. *Sci STKE* **2006**, *2006*, 1–5, doi:10.1126/stke.3652006pe52.
66. Samuels, Y.; Ericson, K. Oncogenic PI3K and Its Role in Cancer. *Curr Opin Oncol* **2006**, *18*, 77–82, doi:10.1097/01.cco.0000198021.99347.b9.
67. Samuels, Y.; Wang, Z.; Bardelli, A.; Silliman, N.; Ptak, J.; Szabo, S.; Yan, H.; Gazdar, A.; Powell, S.M.; Riggins, G.J.; et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science (1979)* **2004**, *304*, 554, doi:10.1126/science.1096502.
68. Richter, A.; Roolf, C.; Hamed, M.; Gladbach, Y.S.; Sender, S.; Konkolefski, C.; Knübel, G.; Sekora, A.; Fuellen, G.; Vollmar, B.; et al. Combined Casein Kinase II Inhibition and Epigenetic Modulation in Acute B-Lymphoblastic Leukemia. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1–11, doi:10.1186/s12885-019-5411-0.
69. Lonetti, A.; Antunes, I.L.; Chiarini, F.; Orsini, E.; Buontempo, F.; Ricci, F.; Tazzari, P.L.; Pagliaro, P.; Melchionda, F.; Pession, A.; et al. Activity of the Pan-Class I Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor NVP-BKM120 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* **2014**, *28*, 1196–1206, doi:10.1038/leu.2013.369.
70. Steelman, L.S.; Abrams, S.L.; Whelan, J.; Bertrand, F.E.; Ludwig, D.E.; Bäsecke, J.; Libra, M.; Stivala, F.; Milella, M.; Tafuri, A.; et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/MTOR and Jak/STAT Pathways to Leukemia. *Leukemia* **2008**, *22*, 686–707, doi:10.1038/leu.2008.26.

71. Neri, L.M.; Cani, A.; Martelli, A.M.; Simioni, C.; Junghanss, C.; Tabellini, G.; Ricci, F.; Tazzari, P.L.; Pagliaro, P.; Mccubrey, J.A. Targeting the PI3K / Akt / MTOR Signaling Pathway in B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Potential. *Leukemia* **2014**, 739–748, doi:10.1038/leu.2013.226.
72. Mullighan, C.G.; Miller, C.B.; Radtke, I.; Phillips, L.A.; Dalton, J.; Ma, J.; White, D.; Hughes, T.P.; Le Beau, M.M.; Pui, C.-H.; et al. BCR-ABL1 Lymphoblastic Leukaemia Is Characterized by the Deletion of Ikaros. *Nature* **2008**, 453, 110–114, doi:10.1038/nature06866.
73. Fransecky, L.; Mochmann, L.H.; Baldus, C.D. Outlook on PI3K/AKT/MTOR Inhibition in Acute Leukemia. *Mol Cell Ther* **2015**, 3, 1–17, doi:10.1186/s40591-015-0040-8.
74. Harrison-Findik, D.; Susa, M.; Varticovski, L. Association of Phosphatidylinositol 3-Kinase with SHC in Chronic Myelogeneous Leukemia Cells. *Oncogene* **1995**, 10, 1385–1391.
75. Osaki, M.; Oshimura, M.; Ito, H. PI3K-Akt Pathway: Its Functions and Alterations in Human Cancer. *Apoptosis* **2004**, 9, 667–676, doi:10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd.
76. Carpten, J.D.; Faber, A.L.; Horn, C.; Donoho, G.P.; Briggs, S.L.; Robbins, C.M.; Hostetter, G.; Boguslawski, S.; Moses, T.Y.; Savage, S.; et al. A Transforming Mutation in the Pleckstrin Homology Domain of AKT1 in Cancer. *Nature* **2007**, 448, 439–444, doi:10.1038/nature05933.
77. Chen, Y.; Huang, L.; Dong, Y.; Tao, C.; Zhang, R.; Shao, H.; Shen, H. Effect of AKT1 (p. E17K) Hotspot Mutation on Malignant Tumorigenesis and Prognosis. *Front Cell Dev Biol* **2020**, 8, 1–12, doi:10.3389/fcell.2020.573599.
78. Mahmoud, I.S.; Sughayer, M.A.; Mohammad, H.A.; Eshtayeh, A.A.; Awidi, A.S.; El-Khateeb, M.S.; Ismail, S.I. The Transforming Mutation E17K/AKT1 Is Not a Major Event in B-Cell-Derived Lymphoid Leukaemias. *Br J Cancer* **2008**, 99, 488–490, doi:10.1038/sj.bjc.6604512.
79. Uko, N.E.; Güner, O.F.; Phillip Bowen, J.; Matesic, D.F. Akt Pathway Inhibition of the Solenopsin Analog, 2-Dodecylsulfanyl-1,-4,-5,-6-Tetrahydropyrimidine. *Anticancer Res* **2019**, 39, 5329–5338, doi:10.21873/anticancer.13725.
80. Fruman, D.A. Towards an Understanding of Isoform Specificity in Phosphoinositide 3-Kinase Signalling in Lymphocytes. *Biochem Soc Trans* **2004**, 32, 315–319, doi:10.1042/bst0320315.
81. Zenaki, N.; Papak nstanti, E. . P110 $\delta$  PI3 Kinase Pathway: Emerging Roles in Cancer. *Front Oncol* **2013**, 3 MAR, 1–16, doi:10.3389/fonc.2013.00040.
82. Robak, P.; Robak, T. Novel Synthetic Drugs Currently in Clinical Development for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* **2017**, 26, 1249–1265, doi:10.1080/13543784.2017.1384814.

83. Fruman, D.A.; Cantley, L.C. Idelalisib — PI3K $\delta$  Inhibitor for B-Cell Cancers. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 1061–1062, doi:10.1056/nejme1400055.
84. Foukas, L.C.; Berenjano, I.M.; Gray, A.; Khwaja, A.; Vanhaesebroeck, B. Activity of Any Class IA PI3K Isoform Can Sustain Cell Proliferation and Survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 11381–11386, doi:10.1073/pnas.0906461107.
85. Maira, S.-M.; Pecchi, S.; Huang, A.; Burger, M.; Knapp, M.; Sterker, D.; Schnell, C.; Guthy, D.; Nagel, T.; Wiesmann, M.; et al. Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 317–328, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0474.
86. Badura, S.; Tesanovic, T.; Pfeifer, H.; Wystub, S.; Nijmeijer, B.A.; Falkenburg, J.H.F.; Ruthardt, M.; Ottmann, O.G. Differential Effects of Selective Inhibitors Targeting the PI3K / AKT / MTOR Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* **2013**, doi:10.1371/journal.pone.0080070.
87. Zheng, Y.; Yang, J.; Qian, J.; Zhang, L.; Lu, Y.; Li, H.; Lin, H.; Lan, Y.; Liu, Z.; He, J.; et al. Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor NVP-BKM120 Induces Apoptosis in Myeloma Cells and Shows Synergistic Anti-Myeloma Activity with Dexamethasone. *J Mol Med (Berl)* **2012**, *90*, 695–706, doi:10.1007/s00109-011-0849-9.
88. Ragon, B.; Kantarjian, H.; Jabbour, E.; Ravandi, F.; Cortes, J.; Borthakur, G.; DeBose, L.; Zeng, Z.; Schneider, H.; Pemmaraju, N.; et al. Buparlisib, a PI3K Inhibitor, Demonstrates Acceptable Tolerability and Preliminary Activity in a Phase I Trial of Patients with Advanced Leukemia. *Am J Hematol* **2017**, doi:10.1002/ajh.24568.
89. Vanhaesebroeck, B.; Khwaja, A. PI3K $\delta$  Inhibitor Hits a Sensitive Spot in B Cell Malignancies. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 269–271, doi:10.1016/j.ccr.2014.02.012.
90. Safaroghli-azar, A.; Bashash, D.; Sadreazami, P.; Momeny, M.; Ghaffari, S.H. PI3K- $\delta$  Inhibition Using CAL-101 Exerts Apoptotic Effects and Increases Doxorubicin-Induced Cell Death in Pre-B-Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Anticancer Drugs* **2017**, 436–445, doi:10.1097/CAD.0000000000000477.
91. Adam, E.; Kim, H.N.; Gang, E.J.; Schnair, C.; Lee, S.; Lee, S.; Khazal, S.; Kosoyan, O.; Knapkova, M.; Parekh, C.; et al. The PI3K $\delta$  Inhibitor Idelalisib Inhibits Homing in an In Vitro and in Vivo Model of B ALL. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, 1–11, doi:10.3390/cancers9090121.
92. European Medicines Agency (EMA) Zydelig (Idelalisib)\_24.08.2022 Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zydelig>.
93. Gilead Sciences GmbH Rote-Hand-Brief Zu Zydelig® (Idelalisib): Aktualisierte Empfehlungen Nach Abschluss Der Überprüfung Der Sicherheitsdaten. **2016**.
94. Pearce, L.R.; Komander, D.; Alessi, D.R. The Nuts and Bolts of AGC Protein Kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 9–22, doi:10.1038/nrm2822.

95. Gills, J.J.; Dennis, P. . Perif sine : Update n a N vel kt Inhibit r. *Curr Oncol Rep* **2009**, doi:10.1007/s11912-009-0016-4.
96. Yap, T.A.; Yan, L.; Patnaik, A.; Tunariu, N.; Biondo, A.; Fearen, I.; Papadopoulos, K.P.; Olmos, D.; Baird, R.; Delgado, L.; et al. Interrogating Two Schedules of the AKT Inhibitor MK-2206 in Patients with Advanced Solid Tumors Incorporating Novel Pharmacodynamic and Functional Imaging Biomarkers. *Clinical Cancer Research* **2014**, *20*, 5672–5685, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0868.
97. Hirai, H.; Sootome, H.; Nakatsuru, Y.; Miyama, K.; Taguchi, S.; Tsujioka, K.; Ueno, Y.; Hatch, H.; Majumder, P.K.; Pan, B.S.; et al. MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs in Vitro and in Vivo. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 1956–1967, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1012.
98. Simioni, C.; Cani, A.; Martelli, A.M.; Zauli, G.; Tabellini, G.; McCubrey, J.; Capitani, S.; Neri, L.M. Activity of the Novel MTOR Inhibitor Torin-2 in B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Potential to Prevent Akt Reactivation. *Oncotarget* **2014**, *5*, 10034–10047, doi:10.18632/oncotarget.2490.
99. Richter, A.; Fischer, E.; Holz, C.; Schulze, J.; Lange, S.; Sekora, A.; Knuebel, G.; Henze, L.; Roof, C.; Escobar, H.M.; et al. Combined Application of Pan-Akt Inhibitor Mk-2206 and Bcl-2 Antagonist Venetoclax in b-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–17, doi:10.3390/ijms22052771.
100. Han, J.; Jin, R.; Zhang, M.; Guo, Q.; Zhou, F. Ikaros 6 Protects Acute Lymphoblastic Leukemia Cells against Daunorubicin-Induced Apoptosis by Activating the Akt-FoxO1 Pathway. *J Leukoc Biol* **2017**, *101*, 675–681, doi:10.1189/jlb.2A0116-040RR.
101. Naderali, E.; Valipour, B.; Khaki, A.A.; Soleymani Rad, J.; Alihemmati, A.; Rahmati, M.; Nozad Charoudeh, H. Positive Effects of PI3K/Akt Signaling Inhibition on PTEN and P53 in Prevention of Acute Lymphoblastic Leukemia Tumor Cells. *Adv Pharm Bull* **2019**, *9*, 470–480, doi:10.15171/apb.2019.056.
102. Konopleva, M.Y.; Walter, R.B.; Faderl, S.H.; Jabbour, E.J.; Zeng, Z.; Borthakur, G.; Huang, X.; Kadia, T.M.; Ruvolo, P.P.; Feliu, J.B.; et al. Preclinical and Early Clinical Evaluation of the Oral AKT Inhibitor , MK-2206 , for the Treatment of Acute Myelogenous Leukemia. *Clin Cancer Res.* **2014**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1978.
103. Sandhöfer, N.; Metzeler, K.H.; Rothenberg, M.; Herold, T.; Tiedt, S.; Groiß, V.; Carlet, M.; Walter, G.; Hinrichsen, T.; Wachter, O.; et al. Dual PI3K/MTOR Inhibition Shows Antileukemic Activity in MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* **2015**, *29*, 828–838, doi:10.1038/leu.2014.305.

104. Krawczyk, J.; Keane, N.; Sw rds, R.; O'Dwyer, .; Freeman, C.L.; Giles, F.J. Perif - sine-a New Option in Treatment of Acute Myeloid Leukemia? *Expert Opin Investig Drugs* **2013**, *22*, 1315–1327, doi:10.1517/13543784.2013.826648.
105. Chiarini, F.; Sole, M. del; Mongiorgi, S.; Gaboardi, G.C.; Cappellini, A.; Mantovani, I.; Follo, M.Y.; Mccubrey, J.A.; Martelli, A.M. The Novel Akt Inhibitor, Perifosine, Induces Caspase-Dependent Apoptosis and Downregulates P-Glycoprotein Expression in Multidrug-Resistant Human T-Acute Leukemia Cells by a JNK-Dependent Mechanism. *Leukemia* **2008**, 1106–1116, doi:10.1038/leu.2008.79.
106. Hideshima, T.; Catley, L.; Yasui, H.; Ishitsuka, K.; Raje, N.; Mitsiades, C.; Podar, K.; Munshi, N.C.; Chauhan, D.; Richardson, P.G.; et al. Perifosine , an Oral Bioactive Novel Alkylphospholipid , Inhibits Akt and Induces in Vitro and in Vivo Cytotoxicity in Human Multiple Myeloma Cells. *Blood* **2006**, doi:10.1182/blood-2005-08-3434.Supported.
107. Shen, J.; Xu, L.; Zhao, Q. Perifosine and ABT-737 Synergistically Inhibit Lung Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *473*, 1170–1176, doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.035.
108. Taylor, P.; Friedman, D.R.; Lanasa, M.C.; Davis, P.H.; Allgood, S.D.; Karen, M.; Brander, D.M.; Chen, Y.; Davis, E.D.; Volkheimer, A.D.; et al. Perifosine Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of a Phase II Clinical Trial and in Vitro Studies. *Leuk Lymphoma* **2015**, doi:10.3109/10428194.2013.824080.
109. Revathidevi, S.; Munirajan, A.K. Akt in Cancer: Mediator and More. *Semin Cancer Biol* **2019**, doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.002.
110. Iannello, A.; Vitale, N.; Coma, S.; Arruga, F.; Chadburn, A.; di Napoli, A.; Laudanna, C.; Allan, J.N.; Furman, R.R.; Pachter, J.A.; et al. Synergistic Efficacy of the Dual PI3K- $\delta/\gamma$  Inhibitor Duvelisib with the Bcl-2 Inhibitor Venetoclax in Richter Syndrome PDX Models. *Blood* **2021**, *137*, 3378–3389, doi:10.1182/blood.2020010187.
111. Sklarz, L.M.; Gladbach, Y.S.; Ernst, M.; Hamed, M.; Roof, C.; Sender, S.; Beck, J.; Schütz, E.; Fischer, S. Combination of the PI3K Inhibitor Idelalisib with the Conventional Cytostatics Cytarabine and Dexamethasone Leads to Changes in Pathway Activation That Induce Anti - Proliferative Effects in B Lymphoblastic Leukaemia Cell Lines. *Cancer Cell Int* **2020**, 1–14, doi:10.1186/s12935-020-01431-4.
112. Wendel, H.G.; De Stanchina, E.; Fridman, J.S.; Malina, A.; Ray, S.; Kogan, S.; Cordon-Cardo, C.; Pelletier, J.; Lowe, S.W. Survival Signalling by Akt and EIF4E in Oncogenesis and Cancer Therapy. *Nature* **2004**, *428*, 332–337, doi:10.1038/nature02369.
113. Yang, X.; Zhong, W.; Cao, R. Phosphorylation of the mRNA Cap-Binding Protein EIF4E and Cancer. *Cell Signal* **2020**, *73*, 109689, doi:10.1016/j.cellsig.2020.109689.

114. Datta, S.R.; Dudek, H.; Xu, T.; Masters, S.; Haian, F.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell- Intrinsic Death Machinery. *Cell* **1997**, *91*, 231–241, doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5.
115. Del Peso, L.; González-García, M.; Page, C.; Herrera, R.; Nuñez, G. Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD through the Protein Kinase Akt. *Science (1979)* **1997**, *278*, 687–689, doi:10.1126/science.278.5338.687.
116. Zhang, X.; Tang, N.; Hadden, T.J.; Rishi, A.K. Akt, FoxO and Regulation of Apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2011**, *1813*, 1978–1986, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.03.010.
117. Tzivion, G.; Dobson, M.; Ramakrishnan, G. FoxO Transcription Factors; Regulation by AKT and 14-3-3 Proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2011**, *1813*, 1938–1945, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.002.
118. Farhan, M.; Wang, H.; Gaur, U.; Little, P.J.; Xu, J.; Zheng, W. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer. *Int J Biol Sci* **2017**, *13*, 815–827, doi:10.7150/ijbs.20052.
119. Stahl, M.; Dijkers, P.F.; Kops, G.J.P.L.; Lens, S.M.A.; Coffey, P.J.; Burgering, B.M.T.; Medema, R.H. The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of P27Kip1 and Bim in Response to IL-2. *J Immunol* **2002**, *168*, 5024–5031, doi:10.4049/jimmunol.168.10.5024.
120. Villunger, A.; Michalak, E.M.; Coultas, L.; Ausserlechner, M.J.; Adams, J.M.; Strasser, A. P53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science (1979)* **2003**, doi:10.1126/science.1090072.
121. Mayo, L.D.; Donner, D.B. A Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Promotes Translocation of Mdm2 from the Cytoplasm to the Nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 11598–11603, doi:10.1073/pnas.181181198.
122. Maurer, U.; Charvet, C.; Wagman, A.S.; Dejardin, E.; Green, D.R. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Mol Cell* **2006**, *21*, 749–760, doi:10.1016/j.molcel.2006.02.009.
123. Bouligny, I.M.; Maher, K.R.; Grant, S. Augmenting Venetoclax Activity Through Signal Transduction in AML. *J Cell Signal* **2023**, *4*, 1–12, doi:10.33696/Signaling.4.085.
124. Bojarczuk, K.; Wienand, K.; Ryan, J.A.; Chen, L.; Villalobos-Ortiz, M.; Mandato, E.; Stachura, J.; Letai, A.; Lawton, L.N.; Chapuy, B.; et al. Targeted Inhibition of PI3Ka/d Is Synergistic with BCL-2 Blockade in Genetically Defined Subtypes of DLBCL. *Blood* **2019**, *133*, 70–80, doi:10.1182/blood-2018-08-872465.
125. Choudhary, G.S.; Al-Harbi, S.; Mazumder, S.; Hill, B.T.; Smith, M.R.; Bodo, J.; Hsi, E.D.; Almasan, A. MCL-1 and BCL-XL-Dependent Resistance to the BCL-2 Inhibitor ABT-199

- Can Be Overcome by Preventing PI3K/AKT/MTOR Activation in Lymphoid Malignancies. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, 1–12, doi:10.1038/cddis.2014.525.
126. Rahmani, M.; Nkwocha, J.; Hawkins, E.; Pei, X.; Parker, R.E.; Kmiecik, M.; Levenson, J.D.; Sampath, D.; Ferreira-Gonzalez, A.; Grant, S. Cotargeting BCL-2 and PI3K Induces BAX-Dependent Mitochondrial Apoptosis in AML Cells. *Cancer Res* **2018**, *78*, 3075–3086, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3024.
127. Yao, M.-Y.; Wang, Y.-F.; Zhao, Y.; Ling, L.-J.; He, Y.; Wen, J.; Zheng, M.-Y.; Jiang, H.-L.; Xie, C.-Y. BCL-2 Inhibitor Synergizes with PI3K $\delta$  Inhibitor and Overcomes FL 3 Inhibitor Resistance in Acute Myeloid Leukaemia. *Am J Cancer Res* **2022**, *12*, 3829–3842.
128. Greil, J.; Gramatzki, M.; Burger, R.; Marschalek, R.; Peltner, M.; Trautmann, U.; Hansen-Hagge, T.E.; Bartram, C.R.; Fey, G.H.; Stehr, K. The Acute Lymphoblastic Leukaemia Cell Line SEM with t(4;11) Chromosomal Rearrangement Is Biphenotypic and Responsive to Interleukin-7. *Br J Haematol* **1994**, *86*, 275–283, doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04726.x.
129. Stong, R.C.; Korsmeyer, S.J.; Parkin, J.L.; Arthur, D.C.; Kersey, J.H. Human Acute Leukemia Cell Line with the t(4;11) Chromosomal Rearrangement Exhibits B Lineage and Monocytic Characteristics. *Blood* **1985**, *65*, 21–31.
130. Crowley, L.C.; Waterhouse, N.J. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, *2016*, 958–962, doi:10.1101/pdb.prot087312.
131. Pę̄ba, .; Strózyk, .; Salvesen, G.S.; Drąg, M. Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, 1–20, doi:10.1101/cshperspect.a008680.
132. Golan, D.; Medvedev, P. Using State Machines to Model the Ion Torrent Sequencing Process and to Improve Read Error Rates. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 344–351, doi:10.1093/bioinformatics/btt212.
133. Rothberg, J.M.; Hinz, W.; Rearick, T.M.; Schultz, J.; Mileski, W.; Davey, M.; Leamon, J.H.; Johnson, K.; Milgrew, M.J.; Edwards, M.; et al. An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-Optical Genome Sequencing. *Nature* **2011**, *475*, 348–352, doi:10.1038/nature10242.
134. BLISS, C.I. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Annals of Applied Biology* **1939**, *26*, 585–615, doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x.
135. Chen, H.; Liu, J.; Wang, H.; Cheng, Q.; Zhou, C.; Chen, X.; Ye, F. Inhibition of RNA-Binding Protein Musashi-1 Suppresses Malignant Properties and Reverses Paclitaxel Resistance in Ovarian Carcinoma. *J Cancer* **2019**, *10*, 1580–1592, doi:10.7150/jca.27352.
136. DSMZ Cell Culture Data: RS4;11, 2022\_08\_23. Retrieved from <https://www.dsmz.de/Collection/Catalogue/Details/Culture/ACC-508>,.
-

137. DSMZ Cell Culture Data: SEM, 2022\_08\_23 . Retrieved from <https://www.dsmz.de/Collection/Catalogue/Details/Culture/ACC-546>.
138. Bilancio, A.; Okkenhaug, K.; Camps, M.; Emery, J.L.; Ruckle, T.; Rommel, C.; Vanhaesebroeck, B. Key Role of the PI3K in B-Cell Antigen and IL-4 Receptor Signaling: Comparative Analysis of Genetic and Pharmacologic Interference with PI3K Function in B Cells. *Blood* **2006**, *107*, 642–650, doi:10.1182/blood-2005-07-3041.
139. Brachmann, S.M.; Kleylein-Sohn, J.; Gaulis, S.; Kauffmann, A.; Blommers, M.J.J.; Kazic-Legueux, M.; Laborde, L.; Hattenberger, M.; Stauffer, F.; Vaxelaire, J.; et al. Characterization of the Mechanism of Action of the Pan Class I PI3K Inhibitor NVP-BKM120 across a Broad Range of Concentrations. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 1747–1757, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-1021.
140. Shen, Y.; Crassini, K.R.; Fatima, N.; Christopherson, R.; Mulligan, S.P.; Best, O.G. Venetoclax Is Synergistic with Idelalisib or MK2206 Against Primary CLL Cells in an in Vitro Model of the Microenvironment. *Blood* **2019**, *134*, 5443, doi:10.1182/blood-2019-130082.
141. Pham, L. V.; Huang, S.; Zhang, H.; Zhang, J.; Bell, T.; Zhou, S.; Pogue, E.; Ding, Z.; Lam, L.; Westin, J.; et al. Strategic Therapeutic Targeting to Overcome Venetoclax Resistance in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research* **2018**, *24*, 3967–3980, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3004.
142. Celeghini, C.; Voltan, R.; Rimondi, E.; Gattei, V.; Zauli, G. Perifosine Selectively Induces Cell Cycle Block and Modulates Retinoblastoma and E2F1 Protein Levels in P53 Mutated Leukemic Cell Lines. *Invest New Drugs* **2011**, *29*, 392–395, doi:10.1007/s10637-009-9370-1.
143. Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. *Science (1979)* **2010**, doi:10.1126/science.1174621.
144. Chiron, D.; Dousset, C.; Brosseau, C.; Touzeau, C.; Maïga, S.; Moreau, P.; Pellat-Deceunynck, C.; Gouill, S. Le; Amiot, M. Biological Rationale for Sequential Targeting of Bruton Tyrosine Kinase and Bcl-2 to Overcome CD40-Induced ABT-199 Resistance in Mantle Cell Lymphoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8750–8759, doi:10.18632/oncotarget.3275.
145. Fürstenau, M.; Hallek, M.; Eichhorst, B. Sequential and Combination Treatments with Novel Agents in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Haematologica* **2019**, *104*, 2144–2154, doi:10.3324/haematol.2018.208603.
146. Alford, S.E.; Kothari, A.; Loeff, F.C.; Eichhorn, J.M.; Sakurikar, N.; Goselink, H.M.; Saylor, R.L.; Jedema, I.; Falkenburg, J.H.F.; Chambers, T.C. BH3 Inhibitor Sensitivity and

- Bcl-2 Dependence in Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Res* **2015**, *75*, 1366–1375, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1849.
147. Leonard, J.T.; Rowley, J.S.J.; Eide, C.A.; Traer, E.; Hayes-lattin, B.; Loriaux, M.; Spurgeon, S.E.; Druker, B.J.; Tyner, J.W.; Chang, B.H. Targeting BCL-2 and ABL / LYN in Philadelphia Chromosome – Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med* **2016**, doi:10.1126/scitranslmed.aaf5309.
148. Scherr, M.; Kirchhoff, H.; Battmer, K.; Wohlan, K.; Lee, C.W.; Ricke-Hoch, M.; Erschow, S.; Law, E.; Kloos, A.; Heuser, M.; et al. Optimized Induction of Mitochondrial Apoptosis for Chemotherapy-Free Treatment of BCR-ABL+acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* **2019**, *33*, 1313–1323, doi:10.1038/s41375-018-0315-6.
149. Aubrey, B.J.; Kelly, G.L.; Janic, A.; Herold, M.J.; Strasser, A. How Does P53 Induce Apoptosis and How Does This Relate to P53-Mediated Tumour Suppression? *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 104–113, doi:10.1038/cdd.2017.169.
150. Bashash, D.; Safaroghli-Azar, A.; Delshad, M.; Bayati, S.; Nooshinfar, E.; Ghaffari, S.H. Inhibitor of Pan Class-I PI3K Induces Differentially Apoptotic Pathways in Acute Leukemia Cells: Shedding New Light on NVP-BKM120 Mechanism of Action. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2016**, *79*, 308–317, doi:10.1016/j.biocel.2016.09.004.
151. Biondo, A.; Yap, T.A.; Yan, L.; Patnaik, A.; Fearen, I.; Baird, R.D.; Papadopoulos, K.P.; Delgado, L.M.; Taylor, A.; Lupinacci, L.; et al. Phase I Clinical Trial of an Allosteric AKT Inhibitor, MK-2206, Using a Once Weekly (QW) Dose Regimen in Patients with Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology* **2011**, *29*, 3037, doi:10.1200/jco.2011.29.15\_suppl.3037.
152. Papa, V.; Tazzari, P.L.; Chiarini, F.; Cappellini, A.; Ricci, F.; Billi, A.M.; Evangelisti, C.; Ottaviani, E.; Martinelli, G.; Testoni, N.; et al. Proapoptotic Activity and Chemosensitizing Effect of the Novel Akt Inhibitor Perifosine in Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Leukemia* **2008**, doi:10.1038/sj.leu.2404980.
153. Lannutti, B.J.; Meadows, S.A.; Herman, S.E.M.; Kashishian, A.; Steiner, B.; Johnson, A.J.; Byrd, J.C.; Tyner, J.W.; Loriaux, M.M.; Deininger, M.; et al. CAL-101, a P110delta Selective Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor for the Treatment of B-Cell Malignancies, Inhibits PI3K Signaling and Cellular Viability. *Blood* **2011**, *117*, 591–594, doi:10.1182/blood-2010-03-275305.
154. Simioni, C.; Neri, L.M.; Tabellini, G.; Ricci, F.; Bressanin, D.; Chiarini, F.; Evangelisti, C.; Cani, A.; Tazzari, P.L.; Melchionda, F. Cytotoxic Activity of the Novel Akt Inhibitor , MK-2206 , in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* **2012**, 2336–2342, doi:10.1038/leu.2012.136.

155. Song, T.; Chai, G.; Liu, Y.; Yu, X.; Wang, Z.; Zhang, Z. Bcl-2 Phosphorylation Confers Resistance on Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells to the BH3 Mimetics ABT-737, ABT-263 and ABT-199 by Impeding Direct Binding. *Br J Pharmacol* **2016**, *173*, 471–483, doi:10.1111/bph.13370.
156. Ruvolo, P.P.; Deng, X.; May, W.S. Phosphorylation of Bcl2 and Regulation of Apoptosis. *Leukemia* **2001**, *15*, 515–522, doi:10.1038/sj.leu.2402090.
157. Luca, A. de; Maiello, M.R.; Alessio, A.D.; Pergameno, M.; Normanno, N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT Signalling Pathways: Role in Cancer Pathogenesis and Implications for Therapeutic Approaches. *Expert Opin Ther Targets* **2012**, doi:10.1517/14728222.2011.639361.
158. Ramakrishnan, V.; Kimlinger, T.; Haug, J.; Painuly, U.; Wellik, L.; Halling, T.; Rajkumar, S.V.; Kumar, S. Anti-Myeloma Activity of Akt Inhibition Is Linked to the Activation Status of PI3K/Akt and MEK/ERK Pathway. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0050005.
159. Choudhary, G.S.; Al-Harbi, S.; Mazumder, S.; Hill, B.T.; Smith, M.R.; Bodo, J.; Hsi, E.D.; Almasan, A. MCL-1 and BCL-XL-Dependent Resistance to the BCL-2 Inhibitor ABT-199 Can Be Overcome by Preventing PI3K/AKT/MTOR Activation in Lymphoid Malignancies. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1593-12, doi:10.1038/cddis.2014.525.
160. van Blitterswijk, W.; Verheij, M. Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects. *Curr Pharm Des* **2008**, *14*, 2061–2074, doi:10.2174/138161208785294636.
161. Lazaro-Navarro, J.; Pimentel-Gutierrez, H.J.; Gauert, A.; Hagemann, A.I.H.; Eisen-schmid, J.; Gokbuget, N.; Vick, B.; Jeremias, I.; Seyfried, F.; Meyer, L.H.; et al. Inhibiting Casein Kinase 2 Sensitizes Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to Venetoclax via MCL1 Degradation. *Blood Adv* **2021**, *5*, 5501–5506, doi:10.1182/bloodadvances.2021004513.
162. Alhoshani, A.; Alatawi, F.O.; Al-Anazi, F.E.; Attafi, I.M.; Zeidan, A.; Agouni, A.; El Gamal, H.M.; Shamooun, L.S.; Khalaf, S.; Korashy, H.M. BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Onco Targets Ther* **2020**, *13*, 13357–13370, doi:10.2147/OTT.S281519.
163. Stirewalt, D.L.; Radich, J.P. The Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 650–665, doi:10.1038/nrc1169.
164. Mizuki, M.; Fenski, R.; Halfter, H.; Matsumura, I.; Schmidt, R.; Müller, C.; Grüning, W.; Kratz-Albers, K.; Serve, S.; Steur, C.; et al. Flt3 Mutations from Patients with Acute Myeloid Leukemia Induce Transformation of 32D Cells Mediated by the Ras and STAT5 Pathways. *Blood* **2000**, *96*, 3907–3914.

165. Brandts, C.H.; Sargin, B.; Rode, M.; Biermann, C.; Lindtner, B.; Schwäble, J.; Buerger, H.; Müller-Tidow, C.; Choudhary, C.; McMahon, M.; et al. Constitutive Activation of Akt by Flt3 Internal Tandem Duplications Is Necessary for Increased Survival, Proliferation, and Myeloid Transformation. *Cancer Res* **2005**, *65*, 9643–9650, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0422.
166. Levine, R.L.; Pardanani, A.; Tefferi, A.; Gilliland, D.G. Role of JAK2 in the Pathogenesis and Therapy of Myeloproliferative Disorders. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 673–683, doi:10.1038/nrc2210.
167. Busik, E.; Antazeri Liabadi, H. “Do We Know Jack” but Not Jack? Clarifies Link at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front Oncol* **2018**, *8*, 1–20, doi:10.3389/fonc.2018.00287.
168. Galluzzi, L.; Kroemer, G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell* **2008**, *135*, 1161–1163, doi:10.1016/j.cell.2008.12.004.
169. Frank, D.; Vince, J.E. Pyroptosis versus Necroptosis: Similarities, Differences, and Crosstalk. *Cell Death Differ* **2019**, *26*, 99–114, doi:10.1038/s41418-018-0212-6.
170. Ameyar, M.; Wisniewska, M.; Weitzman, J.B. A Role for AP-1 in Apoptosis: The Case for and Against. *Biochimie* **2003**, *85*, 747–752, doi:10.1016/j.biochi.2003.09.006.
171. Chipuk, J.E.; Green, D.R. PUMA Cooperates with Direct Activator Proteins to Promote Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2692–2696, doi:10.4161/cc.8.17.9412.
172. Lin, K.H.; Winter, P.S.; Xie, A.; Roth, C.; Martz, C.A.; Stein, E.M.; Anderson, G.R.; Tingley, J.P.; Wood, K.C. Targeting MCL-1/BCL-XL Forestalls the Acquisition of Resistance to ABT-199 in Acute Myeloid Leukemia. *Sci Rep* **2016**, *6*, 1–10, doi:10.1038/srep27696.
173. Pan, R.; Ruvolo, V.; Mu, H.; Levenson, J.D.; Nichols, G.; Reed, J.C.; Konopleva, M.; Andreeff, M. Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and P53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 748–760.e6, doi:10.1016/j.ccell.2017.11.003.
174. Yu, H.J.; Ahn, C.H.; Yang, I.H.; Won, D.H.; Jin, B.; Cho, N.P.; Hong, S.D.; Shin, J.A.; Cho, S.D. Apoptosis Induced by Methanol Extract of *Potentilla discolor* in Human Mucoepidermoid Carcinoma Cells through STAT3/PUMA Signaling Axis. *Mol Med Rep* **2018**, *17*, 5258–5264, doi:10.3892/mmr.2018.8468.
175. Liu, Z.Q.; Shen, M.; Wu, W.J.; Li, B.J.; Weng, Q.N.; Li, M.; Liu, H.L. Expression of PUMA in Follicular Granulosa Cells Regulated by FoxO1 Activation During Oxidative Stress. *Reproductive Sciences* **2015**, *22*, 696–705, doi:10.1177/1933719114556483.
176. Li, L.; Ji, S.-Y.; Yang, J.-L.; Li, X.-X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Hu, Z.-Y.; Liu, Y. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Follicular Development by Modulating the Expression of

- Foxo3a Signaling Components. *Mol Cell Endocrinol* **2014**, *382*, 915–925, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.11.007>.
177. Akhter, R.; Sanphui, P.; Biswas, S.C. The Essential Role of P53-up-Regulated Modulator of Apoptosis (Puma) and Its Regulation by FoxO3a Transcription Factor in  $\beta$ -Amyloid-Induced Neuron Death. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 10812–10822, doi:[10.1074/jbc.M113.519355](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.519355).
178. Schubert, F.; Rapp, J.; Brauns-Schubert, P.; Schlicher, L.; Stock, K.; Wissler, M.; Weiß, M.; Charvet, C.; Borner, C.; Maurer, U. Requirement of GSK-3 for PUMA Induction upon Loss of pro-Survival PI3K Signaling Article. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, doi:[10.1038/s41419-018-0502-4](https://doi.org/10.1038/s41419-018-0502-4).
179. Matallanas, D.; Romano, D.; Yee, K.; Meissl, K.; Kucerova, L.; Piazzolla, D.; Baccarini, M.; Vass, J.K.; Klich, W.; O'Neill, E. R. SSF1 Elicits Apoptosis through an S2 Pathway Directing Proapoptotic Transcription by the P73 Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell* **2007**, *27*, 962–975, doi:[10.1016/j.molcel.2007.08.008](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.008).
180. Zhang, D.-X.; Ma, D.-Y.; Yao, Z.-Q.; Fu, C.-Y.; Shi, Y.-X.; Wang, Q.-L. *ERK1/2/P53 and NF-KB Dependent-PUMA Activation Involves in Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis*;
181. Akhter, R.; Sanphui, P.; Das, H.; Saha, P.; Biswas, S.C. The Regulation of P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis by JNK/c-Jun Pathway in  $\beta$ -Amyloid-Induced Neuron Death. *J Neurochem* **2015**, *134*, 1091–1103, doi:<https://doi.org/10.1111/jnc.13128>.
182. Gomez-Lazaro, M.; Galindo, M.F.; Concannon, C.G.; Segura, M.F.; Fernandez-Gomez, F.J.; Llecha, N.; Comella, J.X.; Prehn, J.H.M.; Jordan, J. 6-Hydroxydopamine Activates the Mitochondrial Apoptosis Pathway through P38 MAPK-Mediated, P53-Independent Activation of Bax and PUMA. *J Neurochem* **2008**, *104*, 1599–1612, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05115.x>.
183. Lee, S.H.; Jung, Y.S.; Chung, J.Y.; Oh, A.Y.; Lee, S.J.; Choi, D.H.; Jang, S.M.; Jang, K.S.; Paik, S.S.; Ha, N.C.; et al. Novel Tumor Suppressive Function of Smad4 in Serum Starvation-Induced Cell Death through PAK1-PUMA Pathway. *Cell Death Dis* **2011**, *2*, doi:[10.1038/cddis.2011.116](https://doi.org/10.1038/cddis.2011.116).
184. Spender, L.C.; Carter, J.; O'Brien, D.I.; Clark, L.J.; Yu, J.; Michalak, E.; Happ, L.; Cragg, M.S.; Inman, G.J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Directly Induces P53-up-Regulated Modulator of Apoptosis (PUMA) during the Rapid Induction of Apoptosis in Myc-Driven B-Cell Lymphomas. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 5198–5209, doi:[10.1074/jbc.M112.410274](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410274).

## 9. Anhang

### 9.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle S1: Auflistung aller untersuchten Gene innerhalb des RNA-Panels

Gen	Genname*	Protein*	Funktion
<i>ACIN1</i>	Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1	Functional Spliceosome-Associated Protein 152	Induktion Apoptose
<i>AFF3</i>	AF4/FMR2 Family Member	Lymphoid Nuclear Protein 4	Differenzierung
<i>AIFM1</i>	Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1	Apoptosis Inducing Factor	Induktion Apoptose
<i>AKT1</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	Proliferation, Überleben
<i>AKT2</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 2	AKT Serine/Threonine Kinase 2	Proliferation, Überleben
<i>AKT3</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 3	AKT Serine/Threonine Kinase 3	Proliferation, Überleben
<i>ANKHD1</i>	Ankyrin Repeat and KH Domain Containing 1	Ankyrin Repeat and KH Domain Containing 1 protein	Inhibition Apoptose
<i>APAF1</i>	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	Induktion Apoptose
<i>ARID1A</i>	AT-Rich Interaction Domain 1A	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator	Proliferation
<i>ASXL1</i>	ASXL Transcriptional Regulator 1	ASXL Transcriptional Regulator 1 protein	Proliferation
<i>ATF1</i>	Activating Transcription Factor 1	Cyclic AMP-dependent Transcription Factor ATF-1	Proliferation, Überleben
<i>ATF2</i>	Activating Transcription Factor 2	Cyclic AMP-dependent Transcription Factor ATF-1	Proliferation, Überleben
<i>ATM</i>	ATM Serine/Threonine Kinase	ATM Serine/Threonine Kinase	Zellzykluskontrolle
<i>ATRX</i>	ATRX Chromatin Remodeler	ATP-dependent Helicase ATRX	Zellzykluskontrolle

\* Laut <http://www.Genecards.org>

<i>AVEN</i>	Apoptosis and Caspase Activation Inhibitor	Apoptosis and Caspase Activation Inhibitor protein	Inhibition Apoptose
<i>BACH2</i>	BTB Domain And CNC Homolog 2	BACH2 protein	Induktion Apoptose
<i>BAD</i>	BCL2 Associated Agonist of Cell Death	BAD	Induktion Apoptose
<i>BAK1</i>	BCL2 Antagonist/Killer 1	BAK	Induktion Apoptose
<i>BAX</i>	BCL2 Associated X	BAX	Induktion Apoptose
<i>BBC3</i>	BBC3	PUMA	Induktion Apoptose
<i>BCL11A</i>	BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit	B-Cell CLL/lymphoma 11A	Onkogenese
<i>BCL2</i>	BCL2 Apoptosis Regulator	BCL-2	Inhibition Apoptose
<i>BCL2A1</i>	BCL2 Related Protein A1	BCL-2-related protein A1	Inhibition Apoptose
<i>BCL2L1</i>	BCL2 Like 1	BCL-2-Like Protein 1	Regulation Apoptose
<i>BCL2L10</i>	BCL2 Like 10	BCL-2-Like Protein 10	Inhibition Apoptose
<i>BCL2L11</i>	BCL2 Like 11	BCL-2-Like Protein 11	Induktion Apoptose
<i>BCL2L13</i>	BCL2 Like 13	BCL-2-Like Protein 13	Induktion Apoptose
<i>BCL2L2</i>	BCL2 Like 2	BCL-W	Inhibition Apoptose
<i>BCL6</i>	BCL6 Transcription Re-pressor	B-Cell CLL/lymphoma 6	Onkogenese
<i>BID</i>	BH3 Interacting Domain Death Agonis	BID	Induktion Apoptose
<i>BIK</i>	BCL2 Interacting Killer	BIK	Induktion Apoptose
<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 2	Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 2	Inhibition Apoptose
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 3	Inhibition Apoptose
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 5 / Survivin	Inhibition Apoptose
<i>BIRC6</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 6	Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 6	Inhibition Apoptose

<i>BIRC7</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 7	Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 7	Inhibition Apoptose
<i>BMF</i>	BCL2 Modifying Factor	BCL-2 Modifying Factor Protein	Induktion Apoptose
<i>BRAF</i>	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	B-Raf Serine/Threonine-Protein	Proliferation, Differenzierung
<i>BTG1</i>	BTG Anti-Proliferation Factor 1	BTG1 protein	Proliferation, Differenzierung
<i>CASP1</i>	Caspase 1	Caspase 1	Apoptose
<i>CASP10</i>	Caspase 10	Caspase 10	Apoptose
<i>CASP14</i>	Caspase 14	Caspase 14	Apoptose
<i>CASP2</i>	Caspase 2	Caspase 2	Apoptose
<i>CASP3</i>	Caspase 3	Caspase 3	Apoptose
<i>CASP4</i>	Caspase 4	Caspase 4	Apoptose
<i>CASP5</i>	Caspase 5	Caspase 5	Apoptose
<i>CASP6</i>	Caspase 6	Caspase 6	Apoptose
<i>CASP7</i>	Caspase 7	Caspase 7	Apoptose
<i>CASP8</i>	Caspase 8	Caspase 8	Apoptose
<i>CASP9</i>	Caspase 9	Caspase 9	Apoptose
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	Cyclin D1	Zellzykluskontrolle
<i>CDKN1A</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	p21	Zellzykluskontrolle
<i>CDKN1B</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B	p27, Kip1	Zellzykluskontrolle
<i>CDKN2A</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	Zellzykluskontrolle
<i>CDKN2B</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B	Zellzykluskontrolle
<i>CDX2</i>	Caudal Type Homeobox 2	CDX2 Protein	Proliferation, Differenzierung

<i>CELSR3</i>	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3	Regulation Wachstum
<i>CFLAR</i>	CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator	CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator	Regulation Apoptose
<i>CREB1</i>	CAMP Responsive Element Binding Protein 1	CAMP Responsive Element Binding Protein 1	Proliferation, Überleben
<i>CREBBP</i>	CREB Binding Protein	CBP	Proliferation, Überleben
<i>CRLF2</i>	Cytokine Receptor Like Factor 2	Cytokine Receptor Like Factor 2	Proliferation, Differenzierung
<i>CSNK2A1</i>	Casein Kinase 2 Alpha 1	Casein Kinase II	Negativregulator PI3Ks
<i>DAP</i>	Death Associated Protein	Death Associated Protein	Induktion Apoptose
<i>DAPK1</i>	Death Associated Protein Kinase 1	Death Associated Protein Kinase 1	Induktion Apoptose
<i>DAPK3</i>	Death Associated Protein Kinase 3	Death Associated Protein Kinase 3	Induktion Apoptose
<i>DAXX</i>	Death Domain Associated Protein	Death Domain Associated Protein	Regulation Apoptose
<i>DDIT4</i>	DNA Damage Inducible Transcript 4	DNA Damage Inducible Transcript 4 Protein	Proliferation, Überleben
<i>DEPTOR</i>	DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein	DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein	Proliferation, Überleben
<i>DIABLO</i>	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein	Induktion Apoptose
<i>DNMT3A</i>	DNA Methyltransferase 3 Alpha	DNA Methyltransferase 3 Alpha	Proliferation, Differenzierung
<i>DOT1L</i>	DOT1 Like Histone Lysine Methyltransferase	DOT1 Like Histone Lysine Methyltransferase	Proliferation, Differenzierung
<i>EIF4EBP1</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1	4E-BP1	Proliferation, Differenzierung
<i>EP300</i>	E1A Binding Protein P300	E1A Binding Protein P300	Proliferation, Differenzierung
<i>ERG</i>	ETS Transcription Factor ERG	ETS Transcription Factor ERG	Proliferation, Differenzierung
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	Estrogen Receptor 1	Wachstum, Metabolismus

<i>ETV6</i>	ETS Variant Transcription Factor 6	ETS Variant Transcription Factor 6	Proliferation, Differenzierung
<i>EZH2</i>	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	Wachstum, Differenzierung
<i>FADD</i>	Fas Associated via Death Domain	Fas Associated via Death Domain	Induktion Apoptose
<i>FAF1</i>	Fas Associated Factor 1	Fas Associated Factor 1	Induktion Apoptose
<i>FAIM</i>	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule	Inhibition Apoptose
<i>FAS</i>	Fas Cell Surface Death Receptor	Fas Cell Surface Death Receptor	Induktion Apoptose
<i>FASLG</i>	Fas Ligand	Fas Ligand	Induktion Apoptose
<i>FHIT</i>	Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase	Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase	Tumorsuppressor
<i>FLCN</i>	Folliculin	Folliculin	Tumorsuppressor
<i>FLT1</i>	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1	Wachstum, Proliferation
<i>FLT3</i>	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3	Wachstum, Proliferation
<i>FOS</i>	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	<i>c-Fos</i>	Differenzierung
<i>FOXO1</i>	Forkhead Box O1	Forkhead Box O1	Proliferation, Differenzierung
<i>FOXO3</i>	Forkhead Box O3	Forkhead Box O3	Induktion Apoptose
<i>FOXO4</i>	Forkhead Box O4	Forkhead Box O4	Proliferation, Differenzierung
<i>GAB2</i>	GRB2 Associated Binding Protein 2	GRB2 Associated Binding Protein 2	Aktivierung PI3ks
<i>GSK3A</i>	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha	Proliferation, Apoptose
<i>GSK3B</i>	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta	Proliferation, Apoptose
<i>GZMA</i>	Granzyme A	Granzyme A	Induktion Apoptose
<i>GZMB</i>	Granzyme B	Granzyme B	Induktion Apoptose

<i>HDAC9</i>	Histone Deacetylase 9	Histone Deacetylase 9	Zellzyklus, Differenzierung
<i>HOXA3</i>	Homeobox A3	Homeobox A3	Differenzierung
<i>HOXA5</i>	Homeobox A5	Homeobox A5	Differenzierung
<i>HOXA9</i>	Homeobox A9	Homeobox A9	Differenzierung
<i>HRK</i>	Harakiri, BCL2 Interacting Protein	HRK	Induktion Apoptose
<i>HTRA2</i>	HtrA Serine Peptidase 2	HtrA Serine Peptidase 2	Induktion Apoptose
<i>IKZF1</i>	IKAROS Family Zinc Finger 1	DNA-Binding Protein Ikaros	Differenzierung
<i>IL10</i>	Interleukin 10	Interleukin 10	Proliferation, Überleben
<i>IL7</i>	Interleukin 7	Interleukin 7	Proliferation, Überleben
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 Receptor	Interleukin 7 Receptor	Proliferation, Überleben
<i>JAK1</i>	Janus Kinase 1	Janus Kinase 1	Proliferation, Überleben
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2	Janus Kinase 2	Proliferation, Überleben
<i>JUN</i>	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	c-Jun	Differenzierung
<i>KDM6A</i>	Lysine Demethylase 6A	Lysine Demethylase 6A	Tumorsupressor
<i>KRAS</i>	KRAS Proto-Oncogene, GTPase	k-Ras	Proto-Onkogen
<i>LYN</i>	LYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase	Src Family Tyrosine Kinase	Differenzierung
<i>MAP2K1</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	Proliferation, Differenzierung
<i>MAP2K2</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2	Proliferation, Differenzierung
<i>MAP2K3</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3	Proliferation, Differenzierung

<i>MAP2K4</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4	Proliferation, Differenzierung
<i>MAP2K6</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6	Zellzyklus, Apoptose
<i>MAP2K7</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7	Proliferation, Differenzierung
<i>MAP3K11</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 11	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 11	Regulation JNK-Signalweg
<i>MAP3K12</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 12	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 12	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPK1</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPK10</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPK14</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPK3</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPK9</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 9	Mitogen-Activated Protein Kinase 9	Proliferation, Differenzierung
<i>MAPKAPK2</i>	MAPK Activated Protein Kinase 2	MAPK Activated Protein Kinase 2	Proliferation, Differenzierung
<i>MAX</i>	MYC Associated Factor X	MYC Associated Factor X	Proliferation, Apoptose
<i>MCL1</i>	MCL1 Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member	MCL-1	Inhibition Apoptose
<i>MDM2</i>	MDM2 Proto-Oncogene	MDM2	Inhibition Apoptose
<i>MDM4</i>	MDM4 Regulator of P53	MDM4	Inhibition Apoptose
<i>MEIS1</i>	Meis Homeobox 1	Homeobox Protein Meis1	Differenzierung
<i>MELK</i>	Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase	Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase	Proliferation, Zellzyklus
<i>MKNK2</i>	MAPK Interacting Serine/Threonine Kinase 2	MAPK Interacting Serine/Threonine Kinase 2	Proliferation, Differenzierung

<i>MLL2/KMT2D</i>	Lysine Methyltransferase 2D	Lysine Methyltransferase 2D	Proliferation, Differenzierung
<i>MTOR</i>	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	Proliferation, Apoptose
<i>MXD1</i>	MAX Dimerization Protein 1	MAX Dimerization Protein 1	Proliferation, Apoptose
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1	Neurofibromin 1	Negativregulator RAS/MAPK-Signalweg
<i>NFKB1</i>	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	Proliferation, Apoptose
<i>NOTCH1</i>	Notch Receptor 1	Notch Receptor 1	Proliferation, Differenzierung
<i>NOTCH2</i>	Notch Receptor 2	Notch Receptor 2	Proliferation, Differenzierung
<i>NOTCH3</i>	Notch Receptor 3	Notch Receptor 3	Proliferation, Differenzierung
<i>NOTCH4</i>	Notch Receptor 4	Notch Receptor 4	Proliferation, Differenzierung
<i>NRAS</i>	NRAS Proto-Oncogene, GTPase	N-Ras	Proliferation, Differenzierung
<i>PAWR</i>	Pro-Apoptotic WT1 Regulator	Pro-Apoptotic WT1 Regulator	Induktion Apoptose
<i>PAX5</i>	Paired Box 5	Pax-5	Differenzierung
<i>PDCD4</i>	Programmed Cell Death 4	Programmed Cell Death protein 4	Induktion Apoptose
<i>PDCD6IP</i>	Programmed Cell Death 6 Interacting Protein	Programmed Cell Death 6 Interacting Protein	Inhibition Apoptose
<i>PKD1</i>	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	AKT-Aktivierung
<i>PEA15</i>	Proliferation and Apoptosis Adaptor Protein 15	Proliferation and Apoptosis Adaptor Protein 15	Inhibition Apoptose
<i>PHLDA3</i>	Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 3	Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 3	Induktion Apoptose
<i>PIDD</i>	P53-Induced Death Domain Protein 1	P53-Induced Death Domain Protein 1	Induktion Apoptose

<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	PI3K p110 $\alpha$	PI3K/AKT-Signalweg
<i>PIK3R1</i>	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1	PI3-Kinase Subunit P85-Alpha	PI3K/AKT-Signalweg
<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1	NOXA	Induktion Apoptose
<i>POLR2A</i>	RNA Polymerase II Subunit A	RNA Polymerase II Subunit A	Induktion Apoptose
<i>POLR2B</i>	RNA Polymerase II Subunit B	RNA Polymerase II Subunit B	Induktion Apoptose
<i>PRKCD</i>	Protein Kinase C Delta	Protein Kinase C Delta	Regulation Proliferation
<i>PTEN</i>	Phosphatase and Tensin Homolog	Phosphatase and Tensin Homolog	PI3K/AKT-Signalweg
<i>PTPN11</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11	Proliferation, Differenzierung
<i>PTPRS</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type S	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type S	Proliferation, Differenzierung
<i>PTRH2</i>	Peptidyl-TRNA Hydrolase 2	Peptidyl-TRNA Hydrolase 2	Regulation Apoptose
<i>RAG1</i>	Recombination Activating 1	V(D)J Recombination-Activating Protein 1	Proliferation, Differenzierung
<i>RB1</i>	RB Transcriptional Corepressor 1	Retinoblastoma Protein	Tumorsuppressor
<i>RGCC</i>	Regulator of Cell Cycle	Regulator of Cell Cycle	Zellzykluskontrolle
<i>RHEB</i>	Ras Homolog, MTORC1 Binding	GTP-Binding Protein Rheb	Wachstums-, Zellzykluskontrolle
<i>RICTOR</i>	RPTOR Independent Companion of MTOR Complex 2	RPTOR Independent Companion of MTOR Complex 2	Wachstum, Proliferation
<i>ROS1</i>	ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase	C-Ros-1	Proliferation, Differenzierung
<i>RPS6KA1</i>	Ribosomal Protein S6 Kinase A1	Ribosomal Protein S6 Kinase A1	Proliferation, Differenzierung
<i>RPS6KA3</i>	Ribosomal Protein S6 Kinase A3	Ribosomal Protein S6 Kinase A3	Proliferation, Wachstum

<i>RPS6KB1</i>	Ribosomal Protein S6 Kinase B1	Ribosomal Protein S6 Kinase B1	Proliferation, Wachstum
<i>RPS6KB2</i>	Ribosomal Protein S6 Kinase B2	Ribosomal Protein S6 Kinase B2	Proliferation, Wachstum
<i>RUNX1</i>	RUNX Family Transcription Factor 1	RUNX Family Transcription Factor 1	Proliferation, Differenzierung
<i>SETD2</i>	SET Domain Containing 2	SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase	Proliferation
<i>SH3RF1</i>	SH3 Domain Containing Ring Finger 1	SH3 Domain Containing Ring Finger 1	Proliferation, Differenzierung
<i>SIVA1</i>	SIVA1 Apoptosis Inducing Factor	Siva-1	Proliferation, Apoptose
<i>STAT3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Proliferation, Apoptose
<i>STAT5A</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 5A	Signal Transducer and Activator of Transcription 5A	Inhibition Apoptose
<i>STAT5B</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 5B	Signal Transducer and Activator of Transcription 5B	Proliferation, Apoptose
<i>STK17B</i>	Serine/Threonine Kinase 17b	Serine/Threonine Kinase 17b	Regulation Apoptose
<i>STK3</i>	Serine/Threonine Kinase 3	Serine/Threonine Kinase 3	Induktion Apoptose
<i>STK4</i>	Serine/Threonine Kinase 4	Serine/Threonine Kinase 4	Induktion Apoptose
<i>TET2</i>	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2	Proliferation, Differenzierung
<i>THEM4</i>	Thioesterase Superfamily Member 4	Thioesterase Superfamily Member 4	Negativregulation AKT
<i>TNF</i>	Tumor Necrosis Factor	Tumor Necrosis Factor	Induktion Apoptose
<i>TNFRSF10A</i>	TNF Receptor Superfamily Member 10a	TNF Receptor Superfamily Member 10a	Induktion Apoptose
<i>TNFRSF10C</i>	TNF Receptor Superfamily Member 10c	TNF Receptor Superfamily Member 10c	Induktion Apoptose
<i>TNFRSF13B</i>	TNF Receptor Superfamily Member 13B	TNF Receptor Superfamily Member 13B	Induktion Apoptose
<i>TNFRSF13C</i>	TNF Receptor Superfamily Member 13C	TNF Receptor Superfamily Member 13C	Induktion Apoptose

<i>TNFRSF1A</i>	TNF Receptor Superfamily Member 1A	TNF Receptor Superfamily Member 1A	Induktion Apoptose
<i>TNFRSF6B</i>	TNF Receptor Superfamily Member 6B	TNF Receptor Superfamily Member 6B	Induktion Apoptose
<i>TNFSF10</i>	TNF Superfamily Member 10	TNF Superfamily Member 10	Induktion Apoptose
<i>TNFSF13</i>	TNF Superfamily Member 13	TNF Superfamily Member 13	Induktion Apoptose
<i>TNFSF13B</i>	TNF Superfamily Member 13B	TNF Superfamily Member 13B	Induktion Apoptose
<i>TP53</i>	Tumor Protein P53	p53	Induktion Apoptose
<i>TRADD</i>	TNFRSF1A Associated via Death Domain	TNFRSF1A Associated via Death Domain	Induktion Apoptose
<i>TRAF3</i>	TNF Receptor Associated Factor 3	TNF Receptor Associated Factor 3	Induktion Apoptose
<i>TRAF6</i>	TNF Receptor Associated Factor 6	TNF Receptor Associated Factor 6	Induktion Apoptose
<i>TRIM24</i>	Tripartite Motif Containing 24	Tripartite Motif Containing 24	Proliferation
<i>TSC1</i>	TSC Complex Subunit 1	TSC Complex Subunit 1	Proliferation, Differenzierung
<i>TSC2</i>	TSC Complex Subunit 2	TSC Complex Subunit 2	Proliferation, Differenzierung
<i>TWIST1</i>	Twist Family BHLH Transcription Factor 1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1	Wachstum, Therapieresistenz
<i>VDAC1</i>	Voltage Dependent Anion Channel 1	Voltage Dependent Anion Channel 1	Induktion Apoptose
<i>VDAC2</i>	Voltage Dependent Anion Channel 2	Voltage Dependent Anion Channel 2	Induktion Apoptose
<i>WEE1</i>	WEE1 G2 Checkpoint Kinase	WEE1 G2 Checkpoint Kinase	Zellzykluskontrolle
<i>WWOX</i>	WW Domain Containing Oxidoreductase	WW Domain Containing Oxidoreductase	Induktion Apoptose
<i>XAF1</i>	XIAP Associated Factor 1	XIAP Associated Factor 1	Induktion Apoptose
<i>XIAP</i>	X-Linked Inhibitor of Apoptosis	X-Linked Inhibitor of Apoptosis	Inhibition Apoptose
<i>YAP1</i>	Yes1 Associated Transcriptional Regulator	Yes1 Associated Transcriptional Regulator	Proliferation, Differenzierung
<i>YWHAB</i>	14-3-3 Protein Beta/Alpha	14-3-3 Protein Beta/Alpha	Inhibition Apoptose

Tabelle S2: Genregulation zur Kontrolle in SEM

Gene	VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
ACIN1	1,04	-1,09	-1,34	-1,12	-1,19	-1,33	-1,24	-1,00	-1,09
AFF3	-1,09	2,92	1,52	2,32	1,03	2,72	2,41	1,54	1,20
AIFM1	1,16	-1,21	-1,06	-1,18	-1,01	-1,21	-1,33	-1,01	-1,07
AKT1	1,01	-1,48	-1,27	-1,01	-1,06	-1,41	-1,38	-1,15	1,13
AKT2	1,01	-1,17	-1,07	-1,06	-1,01	-1,07	-1,14	1,02	-1,02
AKT3	1,02	1,44	1,61	1,15	1,27	1,69	1,44	1,10	1,02
ANKHD1	1,12	1,15	1,08	1,23	1,26	1,10	1,14	-1,00	1,06
APAF1	1,03	-1,11	1,10	1,05	-1,04	-1,09	1,07	1,11	1,25
ARID1A	1,07	-1,02	1,12	1,13	1,01	-1,05	-1,02	1,05	1,08
ASXL1	1,10	1,29	1,19	1,17	1,07	1,16	1,23	1,01	-1,03
ATF1	1,01	-1,20	-1,19	-1,02	-1,06	-1,12	-1,09	-1,05	1,02
ATF2	-1,01	1,13	1,09	1,07	1,13	1,08	1,11	-1,04	-1,02
ATM	1,04	1,56	1,68	1,26	1,39	2,07	2,24	-1,11	-1,01
ATRX	1,05	-1,28	-1,22	1,21	1,00	-1,00	1,03	-1,35	-1,18
AVEN	1,02	1,12	-1,08	-1,02	1,10	1,21	1,08	1,02	-1,04
BACH2	-1,31	1,82	1,36	2,32	1,36	2,09	1,76	-1,03	-1,16
BAD	1,12	-1,26	-1,18	-1,13	-1,10	-1,40	-1,28	1,07	1,07
BAK1	1,02	-1,25	-1,24	-1,15	-1,11	-1,22	-1,16	1,09	1,12
BAX	-1,01	-1,41	-1,30	-1,23	-1,14	-1,44	-1,35	1,08	1,05
BBC3	-1,00	1,07	1,00	1,04	1,14	1,02	1,09	3,82	3,07
BCL11A	-1,05	1,05	1,18	1,20	1,20	1,12	1,26	-1,10	1,06
BCL2	1,02	-1,15	1,24	1,14	1,21	1,22	1,11	-1,17	1,03
BCL2L1	1,02	1,03	1,14	1,17	1,12	1,10	1,14	-1,02	-1,02
BCL2L11	1,04	-1,06	1,15	1,15	1,02	-1,05	-1,04	1,01	-1,15
BCL2L13	1,03	1,08	-1,06	-1,03	-1,10	-1,04	-1,00	-1,11	-1,01
BCL2L2	-1,03	-1,60	-1,46	-1,09	1,09	-1,71	-1,44	1,26	1,26
BCL6	-1,18	1,15	-1,00	1,06	-1,09	1,24	1,07	-1,17	-1,26
BID	1,02	1,33	1,18	1,06	-1,00	1,08	1,22	-1,04	1,01
BIRC2	-1,08	1,21	1,25	1,08	-1,00	1,29	1,11	1,10	-1,04
BIRC5	1,08	-2,17	-1,30	-1,34	-1,23	-2,18	-2,26	1,09	-1,08
BIRC6	1,19	1,25	1,23	1,23	1,16	1,21	1,49	-1,06	1,11
BMF	1,04	1,22	1,21	-1,00	-1,02	1,29	1,09	-1,08	-1,29
BRAF	1,06	1,42	1,22	1,16	1,22	1,38	1,30	-1,07	1,02
BTG1	-1,00	1,57	1,23	1,01	1,06	1,57	1,53	1,22	1,01
CASP1	-1,10	1,19	1,12	1,10	-1,03	1,08	1,11	-1,03	-1,04
CASP10	1,17	1,52	1,27	1,21	1,33	1,51	1,70	1,15	1,09
CASP2	1,00	-1,06	1,05	-1,01	-1,10	-1,19	-1,20	1,00	-1,02
CASP3	1,04	1,06	1,10	1,19	1,16	1,10	1,05	1,09	1,17
CASP4	-1,09	1,36	1,34	1,06	1,09	1,51	1,30	-1,01	-1,11
CASP6	-1,02	-1,26	-1,07	-1,26	1,04	-1,31	-1,27	1,07	-1,06
CASP7	-1,11	-1,16	-1,40	-1,09	-1,10	-1,20	-1,14	-1,06	1,15
CASP8	1,07	-1,04	1,31	1,05	1,11	1,12	1,09	-1,15	1,03
CASP9	1,11	1,10	1,13	1,13	1,09	1,25	1,14	-1,07	-1,07
CDKN1A	-1,05	-1,06	1,09	-1,06	-1,02	-1,13	-1,06	1,42	1,75
CDKN1B	-1,11	1,14	1,02	1,14	-1,18	1,02	1,29	1,06	1,22
CDKN2A	1,19	-1,21	-1,30	-1,21	1,05	-1,31	-1,21	-1,06	1,12
CELSR3	1,10	1,07	-1,11	1,83	1,64	-1,08	1,11	-1,13	1,03
CFLAR	-1,03	1,59	1,65	1,19	1,08	1,70	1,81	1,14	1,08
CREB1	-1,06	-1,05	1,02	1,09	-1,07	1,03	-1,02	-1,12	-1,12
CREBBP	1,05	1,37	1,18	1,16	1,07	1,57	1,23	1,12	-1,07
CSNK2A1	-1,06	-1,15	1,02	-1,02	-1,07	1,06	-1,12	1,11	1,07
DAP	-1,10	-1,34	-1,31	-1,25	-1,24	-1,41	-1,35	-1,14	-1,03
DAPK3	1,21	1,17	1,07	1,06	1,04	-1,11	-1,10	1,23	1,13
DAXX	1,01	-1,35	-1,18	-1,05	-1,02	-1,27	-1,35	-1,02	1,01
DDIT4	1,16	1,26	1,24	1,15	1,20	1,29	1,42	1,19	1,30
DEPTOR	-1,14	1,45	1,00	1,34	1,63	1,44	1,40	-1,20	-1,29
DIABLO	1,01	1,00	-1,11	-1,22	-1,07	-1,28	-1,25	-1,01	-1,03
DNMT3A	-1,08	-1,12	-1,17	-1,08	1,02	-1,17	-1,09	-1,15	-1,16
DOT1L	-1,03	-1,00	1,10	-1,06	1,14	-1,06	1,02	1,30	1,24
EIF4EBP1	1,12	-1,31	-1,19	-1,32	-1,02	-1,24	-1,31	1,08	-1,01
EP300	-1,06	1,41	1,79	1,60	1,30	2,00	1,96	1,24	1,10
ERG	-1,09	1,06	-1,06	-1,09	1,01	-1,11	1,01	-1,07	-1,18
ETV6	-1,04	1,31	1,32	-1,05	1,05	1,32	1,33	-1,16	-1,04
EZH2	-1,01	1,10	1,06	1,05	-1,13	-1,13	-1,14	1,05	1,00
FADD	1,13	-1,20	-1,19	1,01	-1,12	-1,20	-1,21	1,10	1,10
FAF1	-1,16	-1,38	-1,42	-1,13	-1,19	-1,46	-1,34	-1,31	-1,06
FAIM	1,03	-1,24	-1,17	-1,34	-1,22	-1,39	-1,23	-1,06	-1,24
FAS	1,15	-1,11	1,07	1,18	1,04	-1,08	1,24	1,21	1,31
FHIT	-1,02	-1,56	-1,71	-1,14	1,16	-1,64	-1,33	-1,13	-1,67
FLCN	1,11	-1,16	1,08	-1,03	1,04	1,07	-1,14	1,21	1,02
FLT3	-1,07	1,41	1,05	-1,14	-1,01	1,33	1,34	1,07	-1,08
FOS	1,24	2,70	2,03	1,19	-1,07	2,59	3,34	1,34	1,54

FOXO1	-1,36	1,13	-1,18	1,73	-1,22	1,22	-1,09	1,14	-1,11
FOXO3	1,11	1,25	1,38	1,09	1,15	1,29	1,42	-1,04	-1,07
FOXO4	1,13	-1,14	-1,09	1,22	1,34	-1,10	1,14	1,04	1,09
GAB2	1,02	1,07	1,02	1,20	-1,02	1,14	1,16	-1,05	-1,07
GSK3A	-1,06	-1,17	-1,23	-1,21	-1,02	-1,20	-1,16	1,11	-1,09
GSK3B	1,04	1,05	-1,10	1,08	1,04	-1,02	-1,02	-1,00	1,05
GZMA	1,03	-1,35	-1,22	-1,30	-1,07	-1,14	-1,32	2,60	3,78
HDAC9	-1,09	1,07	-1,11	1,08	1,21	1,33	1,11	1,16	-1,03
HOXA3	1,02	1,39	1,69	1,19	1,37	1,84	1,44	1,26	-1,07
HOXA5	-1,11	1,10	1,07	1,06	1,11	1,18	1,18	-1,31	-1,32
HOXA9	1,00	1,14	1,05	-1,01	-1,00	1,11	1,25	-1,24	-1,19
HTRA2	-1,02	-1,10	-1,09	1,02	-1,07	-1,20	-1,23	1,11	-1,00
IKZF1	1,09	-1,05	-1,07	1,19	-1,22	1,09	-1,14	-1,05	-1,20
IL7R	1,01	-1,12	-1,42	1,05	-1,26	-1,19	-1,56	-1,37	-1,65
JAK1	1,02	1,41	1,53	1,21	1,14	1,54	1,42	-1,00	1,04
JAK2	-1,23	1,06	-1,06	1,25	1,19	1,16	1,29	1,08	1,12
KDM6A	1,09	1,73	1,52	1,37	-1,25	1,60	1,37	1,22	1,24
KRAS	1,14	-1,26	1,07	1,09	1,28	-1,04	-1,11	1,41	1,40
LYN	1,00	-1,02	1,10	-1,18	1,04	1,02	-1,02	-1,07	-1,03
MAP2K1	1,04	-1,06	-1,08	-1,05	-1,00	-1,00	-1,01	1,14	1,21
MAP2K2	-1,22	-1,49	-1,65	-1,43	-1,33	-1,62	-1,44	-1,20	-1,05
MAP2K3	-1,00	-1,19	-1,01	-1,04	1,10	1,00	1,00	1,07	1,04
MAP2K4	-1,04	1,10	-1,03	-1,06	1,04	1,34	1,25	-1,20	-1,15
MAP2K6	1,17	-1,16	-1,04	1,01	1,06	-1,21	1,08	-1,32	-1,35
MAP2K7	1,12	-1,12	1,04	1,00	1,13	1,04	-1,02	1,09	1,08
MAP3K11	1,13	-1,11	-1,15	-1,16	-1,29	-1,40	-1,29	1,19	1,03
MAP3K12	1,04	-1,06	1,21	1,02	-1,08	1,19	1,15	1,36	1,20
MAPK1	1,08	1,06	1,08	-1,07	1,08	1,08	-1,05	1,11	1,01
MAPK14	-1,00	-1,11	-1,11	-1,07	1,01	-1,18	-1,03	1,06	1,03
MAPK3	1,08	-1,27	1,19	1,10	1,11	-1,03	-1,16	1,30	1,02
MAPK9	-1,20	-1,09	-1,09	1,11	-1,00	-1,17	-1,06	-1,08	-1,11
MAPKAPK2	-1,07	-1,18	-1,17	-1,11	1,00	-1,15	-1,17	1,12	1,13
MAX	-1,02	-1,10	-1,06	-1,09	-1,05	-1,13	-1,09	1,09	1,09
MCL1	-1,09	1,05	-1,01	-1,06	1,01	-1,03	1,09	-1,14	1,12
MDM2	-1,13	-1,51	-1,36	-1,13	-1,10	-1,11	-1,32	-1,24	-1,21
MDM4	1,07	1,28	1,21	1,15	1,09	1,22	1,49	-1,02	1,11
MEIS1	1,08	1,26	1,26	1,06	1,09	1,26	1,38	1,01	-1,04
MELK	1,08	-1,79	1,16	1,07	-1,03	-1,46	-1,56	1,35	1,30
MKNK2	-1,01	-1,13	-1,07	-1,03	-1,00	-1,22	-1,02	1,29	1,34
MLL2	1,03	1,01	1,01	1,09	-1,16	1,01	1,05	-1,01	1,05
MTOR	1,15	-1,04	1,01	1,17	1,00	-1,06	-1,03	1,08	1,21
MXD1	-1,06	1,34	1,21	1,35	1,15	1,26	1,34	1,05	-1,01
NF1	-1,01	1,09	1,10	-1,07	1,04	1,15	1,27	-1,25	-1,10
NFKB1	-1,02	1,13	1,07	1,07	1,14	1,03	1,18	-1,02	1,08
NOTCH1	1,15	1,05	1,14	1,35	1,20	1,01	1,19	1,04	1,23
NOTCH2	-1,06	1,01	-1,18	-1,03	1,06	1,04	1,06	1,02	1,14
NRAS	1,07	1,05	-1,12	1,12	-1,19	-1,10	-1,16	1,12	1,13
PAWR	1,00	1,18	1,22	1,13	1,10	1,35	1,19	-1,10	-1,14
PAX5	1,02	1,04	1,09	1,21	1,21	1,09	1,19	-1,11	1,04
PDCD4	-1,02	1,35	1,10	1,11	1,17	1,58	1,41	-1,17	-1,22
PDCD6IP	-1,04	-1,18	1,01	-1,02	-1,07	1,04	-1,11	-1,15	-1,13
PK1	-1,02	1,08	-1,04	-1,00	1,03	1,16	1,22	-1,15	-1,01
PEA15	-1,06	-1,23	-1,34	-1,11	-1,04	-1,34	-1,27	1,01	1,09
PIDD	1,01	-1,55	-1,01	1,06	1,23	-1,39	-1,46	1,14	1,04
PIK3CA	-1,05	1,14	1,02	1,07	-1,01	1,11	1,07	-1,10	-1,17
PIK3R1	1,03	1,00	1,27	1,09	1,01	1,19	1,01	-1,07	-1,37
PMAIP1	-1,15	-1,41	-1,34	-1,34	-1,42	-1,46	-1,41	-1,31	-1,22
POLR2A	-1,01	-1,12	-1,13	1,01	-1,11	-1,13	-1,18	-1,12	-1,07
POLR2B	1,03	1,01	1,04	1,01	1,12	-1,03	-1,11	-1,02	-1,05
PRKCD	-1,07	-1,25	-1,30	-1,03	-1,03	-2,18	-1,29	1,14	1,23
PTEN	-1,31	-1,24	-1,29	-1,27	-1,49	-1,26	-1,37	-1,26	-1,29
PTPN11	-1,04	-1,31	-1,21	-1,13	-1,08	-1,26	-1,24	1,05	-1,01
PTRH2	-1,06	-1,36	-1,23	-1,18	-1,10	-1,04	-1,23	-1,38	-1,21
RB1	1,01	1,13	1,16	1,02	-1,04	1,12	1,10	1,18	1,13
RHEB	-1,13	-1,13	-1,16	-1,07	-1,13	-1,15	-1,22	-1,09	-1,09
RICTOR	1,06	1,38	1,30	1,13	1,22	1,46	1,44	1,01	-1,06
RPS6KA1	-1,08	-1,02	1,04	-1,01	-1,08	-1,08	-1,08	1,23	1,24
RPS6KA3	-1,05	1,12	1,03	1,13	1,10	1,11	1,11	-1,22	1,01
RPS6KB1	-1,04	1,04	-1,10	-1,07	-1,04	-1,17	-1,24	-1,01	-1,17
RPS6KB2	-1,05	-1,22	-1,06	-1,01	-1,10	-1,22	-1,32	1,01	-1,12
RUNX1	1,00	1,13	1,16	1,05	1,10	1,03	1,22	-1,01	1,16
SETD2	1,02	1,15	1,00	1,03	1,01	1,02	1,03	-1,00	-1,05
SH3RF1	-1,03	-1,06	-1,09	1,08	-1,03	-1,15	-1,04	1,10	1,18

SIVA1	1,08	-1,55	-1,31	-1,04	-1,09	-1,87	-1,56	-1,01	1,14
STAT3	1,10	1,26	1,10	1,02	1,06	1,18	1,20	1,16	1,16
STAT5A	-1,10	1,81	2,00	-1,02	1,22	1,83	1,82	-1,20	-1,16
STAT5B	1,08	1,46	1,02	1,07	1,01	1,17	1,33	-1,11	1,03
STK17B	-1,19	1,25	1,05	-1,00	-1,35	1,03	1,11	-1,06	1,00
STK3	1,02	-1,15	-1,13	-1,06	-1,21	-1,14	1,03	-1,23	-1,17
STK4	1,19	1,25	1,28	1,20	1,26	1,18	1,24	1,01	1,15
TET2	1,01	1,34	1,28	1,15	1,00	1,34	1,21	-1,08	1,00
TNF	1,01	2,61	2,28	1,69	1,78	2,25	2,94	1,98	2,94
TNFRSF13C	-1,15	-1,07	-1,07	-1,01	-1,18	-1,08	1,15	-1,33	-1,35
TNFRSF1A	1,11	1,06	1,28	1,00	1,20	1,14	1,33	1,69	1,78
TNFRSF6B	-1,22	1,23	-1,22	1,02	1,03	1,01	1,10	1,05	1,13
TNFSF10	1,03	1,43	1,39	1,48	-1,07	1,57	1,62	1,08	-1,23
TNFSF13	1,01	1,09	1,17	-1,04	1,07	1,25	1,17	1,14	1,13
TNFSF13B	1,04	-1,63	-1,02	-1,13	-1,20	-1,17	-1,15	1,30	-1,00
TP53	-1,03	1,20	-1,14	-1,03	-1,10	-1,15	1,07	-1,09	-1,13
TRADD	-1,00	-1,44	-1,40	-1,20	-1,10	-1,46	-1,15	1,00	1,05
TRAF3	1,18	1,14	-1,13	1,08	1,12	-1,12	1,09	-1,17	-1,01
TRAF6	-1,01	1,12	-1,00	1,00	1,03	1,13	1,02	1,19	1,15
TRIM24	1,04	1,01	-1,02	-1,01	1,07	-1,15	-1,20	-1,09	-1,04
TSC1	-1,01	1,16	1,01	1,07	1,05	1,06	1,10	-1,15	-1,06
TSC2	1,27	1,14	1,18	1,18	1,18	1,11	1,13	1,17	1,13
TWIST1	-1,09	-1,05	-1,25	-1,28	-1,04	-1,38	-1,18	-1,04	-1,13
VDAC1	-1,11	-1,59	-1,44	-1,28	-1,23	-1,52	-1,51	-1,11	-1,17
VDAC2	-1,11	-1,35	-1,41	-1,33	-1,17	-1,46	-1,53	-1,05	-1,21
WEE1	-1,09	-1,30	-1,16	-1,16	-1,28	-1,48	-1,58	1,04	-1,07
WWOX	-1,03	-1,02	1,03	1,07	1,35	-1,06	1,06	-1,08	-1,07
XAF1	1,01	1,36	1,62	1,16	-1,01	1,53	1,34	-1,08	-1,10
XIAP	1,04	1,08	1,08	1,04	1,13	1,00	1,25	-1,01	1,07
YAP1	1,01	1,10	1,21	1,03	1,13	1,05	1,16	1,16	1,21
YWHAB	1,03	-1,36	-1,41	-1,32	-1,33	-1,46	-1,34	1,04	1,17

cut off: total reads > 50

**Tabelle S3: Genregulation zur Kontrolle in RS4;11**

Gene	VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
ACIN1	-1,21	-1,42	-1,46	-1,09	-1,19	-1,31	-1,18	-1,14	-1,13
AFF3	-1,23	1,75	1,83	1,57	1,09	1,80	1,50	-1,25	-1,29
AIFM1	1,19	-1,11	-1,18	-1,03	-1,13	-1,39	-1,31	1,09	1,06
AKT1	-1,03	-1,30	-1,21	-1,18	-1,13	-1,22	-1,22	-1,06	1,11
AKT2	1,01	-1,14	-1,11	-1,15	-1,11	-1,08	-1,11	-1,06	-1,01
AKT3	-1,03	1,16	1,14	1,40	1,37	1,48	1,25	1,09	1,12
ANKHD1	-1,05	-1,06	1,08	1,10	1,03	1,09	1,12	1,01	1,01
APAF1	-1,18	-1,12	-1,07	-1,17	1,13	1,02	-1,00	1,00	1,03
ARID1A	1,06	-1,17	-1,27	1,01	1,03	-1,02	-1,07	-1,03	1,08
ASXL1	-1,08	1,15	1,11	1,08	-1,09	1,15	1,14	1,03	1,08
ATF1	1,11	-1,12	-1,16	-1,20	-1,26	-1,21	-1,07	-1,10	-1,00
ATF2	-1,06	1,00	1,02	1,09	1,03	1,10	1,01	1,07	-1,06
ATM	1,16	1,35	1,44	1,42	1,66	1,55	1,47	1,27	1,31
ATRX	-1,06	-1,13	-1,11	1,01	1,07	-1,02	-1,01	-1,15	-1,10
AVEN	1,07	1,08	1,07	1,10	1,06	1,15	1,23	-1,09	-1,08
BACH2	-1,01	2,57	2,80	3,53	3,27	4,04	3,92	1,44	1,53
BAD	1,06	-1,32	-1,29	-1,10	-1,12	-1,18	-1,07	1,04	-1,03
BAK1	1,17	-1,26	-1,29	-1,20	-1,11	-1,25	-1,43	-1,10	-1,02
BAX	-1,15	-1,27	-1,46	-1,53	-1,85	-1,61	-1,97	-1,31	-1,25
BBC3	-1,22	1,04	-1,20	-1,26	-1,58	-1,31	-1,38	-1,22	1,00
BCL2	-1,09	-1,00	-1,09	1,02	1,06	1,02	-1,10	-1,02	-1,06
BCL2L1	-1,05	-1,05	-1,05	-1,02	-1,01	1,07	1,13	-1,03	1,10
BCL2L2	-1,01	-1,36	-1,38	-1,15	-1,13	-1,08	-1,20	-1,26	-1,38
BCL2L11	1,02	-1,02	-1,13	1,07	1,02	1,00	-1,04	1,12	-1,06
BCL2L13	-1,00	-1,18	-1,08	-1,08	-1,17	-1,08	-1,01	-1,07	-1,16
BCL6	-1,10	-1,10	-1,12	-1,05	1,00	1,10	1,08	-1,12	-1,28
BCL11A	-1,09	1,02	-1,04	1,08	1,04	1,07	1,04	-1,10	-1,02
BID	1,11	-1,12	-1,08	-1,18	-1,17	-1,36	-1,21	-1,11	-1,05
BIK	1,35	1,57	1,46	1,31	1,12	1,47	1,15	1,49	1,31
BIRC2	1,25	1,26	1,32	1,12	1,26	1,29	1,18	1,22	1,11
BIRC5	1,11	1,03	1,01	-1,08	-1,02	-1,18	-1,16	1,03	1,06
BIRC6	-1,01	-1,17	-1,04	-1,16	-1,01	-1,20	-1,14	-1,06	1,09
BMF	-1,51	1,28	1,36	1,71	1,48	2,11	2,07	1,05	-1,04
BRAF	-1,17	1,02	1,30	1,02	-1,03	-1,02	1,10	-1,04	-1,01
BTG1	-1,19	1,24	1,24	1,21	1,13	1,46	1,43	1,15	1,00

# Anhang

CASP1	-1,04	-1,17	-1,05	-1,15	-1,05	-1,09	-1,10	1,00	1,03
CASP2	-1,02	1,06	1,19	1,10	-1,02	1,01	1,02	1,08	1,11
CASP3	1,10	1,25	1,13	1,21	1,16	1,06	1,17	1,25	1,09
CASP4	1,02	1,27	1,19	1,18	1,21	1,17	1,11	1,24	1,03
CASP6	1,10	1,04	1,18	1,12	1,28	1,16	1,26	1,19	1,15
CASP7	1,02	-1,22	-1,22	-1,19	-1,11	-1,29	-1,37	-1,16	-1,09
CASP8	-1,09	-1,18	-1,13	-1,08	-1,04	-1,29	-1,23	-1,03	-1,24
CASP9	-1,02	-1,20	-1,20	1,12	1,13	-1,06	-1,04	1,01	1,00
CASP10	-1,10	-1,07	-1,03	1,10	1,01	1,09	1,13	1,02	-1,07
CDKN1A	-1,39	-1,79	-2,20	-2,33	-2,95	-2,59	-3,09	-1,40	-1,47
CDKN1B	-1,17	-1,13	1,05	-1,25	-1,04	-1,11	1,03	-1,54	-1,17
CELSR3	-1,46	-1,35	-1,30	1,02	1,02	-1,11	-1,38	-1,22	-1,10
CFLAR	-1,08	1,22	1,17	1,21	-1,00	1,00	-1,05	1,09	1,08
CREB1	1,01	-1,11	-1,06	-1,04	-1,10	-1,17	-1,07	-1,03	-1,07
CREBBP	1,01	1,03	1,19	1,18	1,15	1,13	-1,03	1,02	1,11
CSNK2A1	1,42	1,06	-1,03	-1,18	1,05	-1,00	-1,02	-1,02	1,27
DAP	-1,04	-1,31	-1,36	-1,19	-1,13	-1,46	-1,34	-1,02	-1,02
DAPK3	-1,06	1,04	1,05	1,14	-1,08	1,01	1,19	1,04	1,04
DAXX	1,09	-1,14	-1,12	1,00	1,01	1,01	-1,11	-1,05	1,07
DDIT4	1,10	-1,18	-1,22	-1,53	-1,24	-1,40	-1,40	1,13	1,47
DEPTOR	-1,12	1,57	1,39	1,43	1,34	1,52	1,53	-1,19	-1,12
DIABLO	-1,06	-1,09	1,01	1,05	-1,15	-1,06	-1,09	-1,11	-1,06
DNMT3A	-1,08	1,01	-1,04	-1,04	1,04	-1,08	-1,17	-1,02	-1,04
DOT1L	1,20	-1,21	-1,06	-1,06	-1,05	-1,23	-1,11	1,10	1,16
EIF4EBP1	1,05	-1,30	-1,44	-1,53	-1,50	-1,44	-1,36	-1,10	-1,15
EP300	1,48	-1,16	1,14	-1,11	-1,46	1,37	-1,22	-1,02	-1,14
ERG	-1,15	-1,11	1,16	-1,02	-1,11	-1,01	1,10	-1,17	-1,13
ESR1	-1,26	-1,32	-1,40	-1,17	1,24	1,13	1,27	1,04	1,04
ETV6	-1,05	1,06	1,02	-1,03	-1,08	-1,08	1,13	1,02	-1,10
EZH2	-1,10	-1,03	1,04	-1,15	-1,09	-1,14	-1,17	-1,22	1,00
FADD	-1,04	-1,41	-1,17	-1,07	-1,30	-1,21	-1,35	-1,09	-1,17
FAF1	-1,09	-1,12	-1,17	-1,13	-1,16	-1,15	-1,19	-1,13	-1,27
FAIM	-1,18	-1,63	-1,71	-1,70	-1,83	-1,76	-1,78	-1,59	-1,33
FAS	-1,23	-1,56	-1,79	-2,11	-2,57	-2,09	-2,41	-1,59	-1,60
FLCN	1,07	-1,04	-1,07	1,10	1,19	1,07	1,18	1,09	1,25
FLT3	1,10	1,39	1,28	1,26	1,19	1,49	1,45	-1,03	-1,08
FOS	1,60	-1,25	1,02	-1,21	-1,06	-1,00	-1,72	-1,43	-1,10
FOXO1	1,12	1,28	1,27	1,46	1,28	1,38	1,44	1,28	1,20
FOXO3	1,11	1,15	1,09	1,07	1,05	1,31	1,17	1,12	1,15
FOXO4	-1,19	1,27	1,25	1,35	1,45	1,65	1,67	1,04	1,15
GAB2	-1,01	-1,03	-1,03	1,04	1,06	1,22	1,14	-1,03	-1,01
GSK3A	-1,10	-1,28	-1,29	-1,07	-1,12	-1,21	-1,24	-1,04	-1,06
GSK3B	1,01	-1,04	-1,02	-1,06	1,00	-1,03	1,01	1,13	1,19
GZMA	1,51	-2,36	-2,78	-2,91	-4,63	-3,01	-2,94	1,29	1,16
HDAC9	-1,10	-1,04	1,08	1,10	1,24	-1,01	-1,12	1,09	1,03
HOXA3	1,35	1,48	1,41	1,30	1,29	1,54	-1,02	-1,39	1,13
HOXA5	-1,08	1,20	1,01	1,10	1,22	1,13	1,33	1,07	1,14
HOXA9	-1,02	-1,11	-1,02	1,00	-1,00	-1,06	-1,08	-1,08	-1,02
HTRA2	1,08	-1,07	-1,01	1,04	-1,01	-1,17	-1,07	1,07	-1,10
IKZF1	1,06	1,26	1,22	1,18	1,24	1,23	1,17	1,14	1,10
IL7R	1,00	1,04	-1,01	-1,31	-1,22	-1,15	-1,16	-1,06	-1,14
JAK1	-1,26	1,24	1,34	1,13	1,13	1,20	1,18	-1,09	-1,16
JAK2	-1,10	1,07	1,02	1,19	1,26	1,08	1,08	1,03	1,02
KDM6A	1,08	-1,01	1,20	1,10	1,25	1,18	-1,29	-1,04	-1,14
KRAS	1,12	1,08	-1,11	-1,20	-1,03	-1,14	-1,08	-1,01	1,13
LYN	1,06	-1,06	-1,02	-1,08	-1,14	-1,16	-1,14	-1,00	1,06
MAP2K1	1,01	-1,35	-1,26	-1,25	-1,16	-1,25	-1,19	1,01	1,11
MAP2K2	1,02	-1,20	-1,16	-1,16	-1,13	-1,26	-1,19	-1,11	1,00
MAP2K3	-1,00	-1,26	-1,27	-1,30	-1,17	-1,38	-1,56	-1,12	-1,11
MAP2K4	1,05	1,16	1,09	-1,02	-1,01	-1,04	-1,12	-1,03	-1,02
MAP2K6	-1,15	-1,02	-1,04	-1,06	1,07	1,13	-1,04	-1,13	1,01
MAP2K7	-1,03	-1,09	1,03	-1,02	-1,00	-1,05	-1,07	1,00	1,06
MAP3K11	-1,04	-1,08	-1,21	-1,11	-1,09	-1,21	-1,08	1,03	-1,04
MAP3K12	1,28	-1,34	-1,12	-1,24	1,01	-1,14	-1,21	-1,05	-1,13
MAPK1	1,10	-1,05	-1,04	1,06	1,08	-1,09	1,10	1,14	1,12
MAPK3	-1,07	-1,15	-1,28	-1,02	1,09	-1,11	-1,23	1,06	1,13
MAPK9	1,23	1,09	1,14	1,05	-1,01	-1,07	-1,00	1,15	-1,03
MAPK14	1,02	-1,07	-1,13	-1,08	-1,05	-1,11	-1,03	-1,01	-1,05
MAPKAPK2	1,17	1,21	1,13	1,03	1,02	1,13	1,16	1,12	1,08
MAX	1,01	-1,04	-1,02	-1,15	-1,19	-1,14	-1,10	-1,19	-1,16
MCL1	-1,06	-1,14	-1,03	-1,30	-1,20	-1,34	-1,32	-1,37	-1,36
MDM2	-1,03	1,79	1,63	2,00	1,54	2,23	2,11	1,08	-1,18
MDM4	-1,09	1,25	1,35	1,15	1,28	1,32	1,34	1,00	1,17
MEIS1	1,04	1,45	1,40	1,18	1,16	1,25	1,41	1,08	1,13

# Anhang

MELK	1,04	-1,15	-1,03	-1,01	1,05	-1,25	-1,15	1,26	1,39
MKNK2	-1,11	-1,15	-1,13	-1,17	-1,24	-1,39	-1,09	-1,04	-1,06
MLL2	-1,06	-1,15	-1,12	1,02	-1,04	-1,24	-1,13	-1,06	-1,02
MTOR	1,11	1,02	1,11	-1,03	-1,00	1,14	1,03	-1,18	-1,05
MXD1	-1,05	1,10	1,05	1,19	1,08	1,06	1,13	-1,01	1,00
NF1	1,02	1,05	1,12	-1,01	1,13	1,18	1,17	-1,04	1,12
NFKB1	-1,02	-1,11	-1,11	-1,05	-1,15	-1,01	-1,01	-1,02	1,01
NOTCH1	-1,11	-1,22	-1,15	-1,17	-1,09	-1,22	-1,17	-1,11	1,06
NOTCH2	1,13	1,13	1,14	1,01	1,07	1,18	1,10	1,14	1,19
NRAS	1,15	1,13	1,22	-1,04	1,00	1,02	1,18	1,12	1,00
PAX5	-1,17	-1,28	-1,17	-1,15	1,05	-1,12	-1,19	-1,17	-1,06
PDCD4	-1,08	1,37	1,42	1,35	1,28	1,48	1,36	1,06	1,07
PDCD6IP	1,12	1,14	1,04	1,15	1,02	-1,07	1,00	1,02	-1,08
PDK1	1,16	-1,01	-1,03	1,00	1,05	-1,03	-1,09	-1,07	-1,05
PEA15	1,07	-1,19	-1,30	-1,10	1,04	-1,21	-1,27	-1,09	-1,08
PHLDA3	-1,41	-1,69	-1,84	-2,04	-2,88	-2,49	-3,61	-1,52	-1,96
PIDD	1,03	-1,05	-1,38	1,04	1,04	1,04	-1,12	-1,02	1,12
PIK3CA	1,11	1,15	1,21	1,19	1,23	1,26	1,24	1,19	-1,08
PIK3R1	1,10	1,14	1,21	1,13	1,35	1,02	1,12	1,47	1,29
PMAIP1	-1,07	-1,64	-1,64	-1,74	-1,47	-1,71	-1,86	-1,47	-1,22
POLR2A	-1,07	-1,09	-1,12	1,12	-1,01	1,02	1,02	1,07	1,05
POLR2B	1,18	-1,03	-1,02	-1,06	1,06	-1,07	1,09	1,04	1,06
PRKCD	-1,22	-1,42	-1,31	-1,16	-1,22	-1,37	-1,16	-1,32	1,05
PTEN	1,05	1,09	1,04	1,08	-1,05	1,04	-1,13	1,13	1,04
PTPN11	1,12	-1,09	-1,18	-1,23	-1,03	-1,25	-1,17	-1,02	-1,12
PTRH2	1,24	1,25	-1,01	-1,02	1,05	-1,02	-1,15	1,12	1,20
RAG1	-1,42	1,25	1,43	1,92	1,58	2,14	1,78	1,16	1,13
RB1	1,33	1,20	1,29	1,04	1,06	1,00	-1,02	1,31	1,25
RHEB	1,19	1,08	1,14	1,04	-1,12	-1,04	-1,10	1,06	1,01
RICTOR	-1,10	1,02	1,08	1,08	1,02	1,12	1,09	1,09	1,02
RPS6KA1	-1,10	-1,15	-1,08	-1,02	-1,15	-1,13	-1,19	1,01	1,01
RPS6KA3	-1,01	-1,29	-1,10	-1,14	-1,26	-1,22	-1,31	-1,18	-1,15
RPS6KB1	1,09	1,11	1,09	1,07	1,05	1,02	-1,02	1,02	-1,12
RPS6KB2	1,05	-1,15	-1,17	-1,05	-1,10	-1,15	-1,23	-1,04	1,02
RUNX1	-1,26	-1,06	-1,04	-1,13	-1,04	1,02	-1,00	-1,24	-1,25
SETD2	-1,09	1,18	1,02	1,03	-1,06	1,06	1,12	1,08	1,05
SH3RF1	-1,00	-1,73	-1,73	-1,45	-1,58	-1,71	-1,51	-1,26	-1,14
SIVA1	-1,04	-1,63	-1,36	-1,42	-1,41	-1,61	-1,41	-1,28	-1,01
STAT3	-1,08	-1,01	-1,04	-1,07	-1,02	-1,09	-1,10	1,02	1,00
STAT5A	-1,04	-1,11	1,11	1,07	-1,03	-1,06	-1,13	1,00	1,11
STAT5B	-1,25	-1,24	-1,24	-1,10	-1,13	-1,04	1,03	-1,10	-1,05
STK3	1,11	-1,05	1,09	-1,32	-1,18	-1,09	1,03	-1,15	-1,07
STK4	1,05	-1,05	-1,02	-1,11	1,00	1,01	1,10	-1,04	1,01
STK17B	1,01	-1,01	-1,16	-1,08	-1,12	-1,09	-1,17	-1,10	-1,07
TET2	-1,24	-1,14	-1,14	-1,10	-1,07	-1,07	-1,09	-1,05	-1,14
TNF	-1,01	-1,10	-1,25	-1,67	-1,41	-1,69	-1,63	1,06	1,08
TNFRSF1A	1,04	-1,03	-1,03	-1,01	-1,13	-1,04	1,00	1,09	1,05
TNFRSF6B	-1,17	1,02	1,11	1,17	-1,08	1,04	1,06	1,07	1,02
TNFRSF13C	-1,18	-1,20	-1,05	-1,22	-1,12	-1,38	-1,36	-1,19	1,07
TNFSF10	-1,12	1,70	1,59	1,76	1,48	2,35	2,46	1,18	1,51
TNFSF13	-1,06	-1,18	-1,07	-1,22	-1,20	-1,02	-1,05	-1,13	-1,06
TNFSF13B	1,62	-1,44	-1,47	-1,40	-1,25	-1,40	-1,71	1,04	1,01
TP53	-1,14	-1,20	-1,36	-1,11	-1,26	-1,28	-1,11	-1,20	-1,11
TRADD	-1,27	-1,44	-1,31	-1,24	-1,05	-1,27	-1,42	-1,37	-1,29
TRAF3	-1,17	-1,20	-1,25	-1,15	-1,26	-1,38	-1,19	-1,13	-1,19
TRAF6	1,08	1,18	1,17	1,10	1,15	1,21	1,19	-1,01	1,04
TRIM24	-1,01	1,09	1,01	1,17	1,05	1,15	1,18	1,11	-1,02
TSC1	-1,12	-1,05	-1,02	1,04	-1,06	1,02	1,14	-1,01	-1,10
TSC2	1,01	-1,02	1,01	1,00	1,07	1,12	1,06	1,04	1,06
TWIST1	-1,26	-1,26	-1,30	-1,08	-1,11	-1,63	-1,32	-1,20	-1,14
VDAC1	1,04	-1,05	-1,30	-1,18	-1,17	-1,30	-1,34	-1,14	-1,14
VDAC2	1,11	1,09	1,06	1,02	-1,08	-1,11	-1,09	-1,08	-1,07
WEE1	1,13	1,12	1,28	1,01	1,05	1,05	1,15	1,06	1,15
WWOX	-1,15	-1,01	1,03	-1,08	1,04	1,05	1,04	-1,02	-1,03
XAF1	1,12	1,05	1,17	1,23	1,09	1,32	-1,09	-1,07	1,00
XIAP	1,16	1,14	1,18	-1,09	-1,02	-1,03	1,15	-1,22	1,11
YWHAB	1,16	-1,29	-1,15	-1,36	-1,17	-1,34	-1,16	-1,16	1,06

cut off: total reads > 50

**Tabelle S4: Stärkste Regulationen der Genexpression in SEM****Stärkste Induktion in SEM**

VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
TSC2	AFF3	TNF	BACH2	TNF	AFF3	FOS	BBC3	GZMA
FOS	FOS	FOS	AFF3	CELSR3	FOS	TNF	GZMA	BBC3
DAPK3	TNF	STAT5A	CELSR3	DEPTOR	TNF	AFF3	TNF	TNF
STK4	BACH2	EP300	FOXO1	ATM	BACH2	ATM	TNFRSF1A	TNFRSF1A
BIRC6	STAT5A	HOXA3	TNF	HOXA3	ATM	EP300	AFF3	CDKN1A
CDKN2A	KDM6A	ATM	EP300	BACH2	EP300	STAT5A	CDKN1A	FOS
TRAF3	CFLAR	CFLAR	TNFSF10	WVVOX	HOXA3	CFLAR	KRAS	KRAS
MAP2K6	BTG1	XAF1	KDM6A	FOXO4	STAT5A	BACH2	MAP3K12	MKNK2
CASP10	ATM	AKT3	MXD1	CASP10	CFLAR	CASP10	MELK	FAS
DDIT4	DDIT4	JAK1	NOTCH1	EP300	AKT3	TNFSF10	FOS	MELK

**Stärkste Suppression in SEM**

VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
FOXO1	BIRC5	MAP2K2	MAP2K2	PTEN	BCL2L2	WEE1	IL7R	PTRH2
BACH2	MELK	BCL2L2	BIRC5	PMAIP1	MAP2K2	SIVA1	ATRX	IL7R
PTEN	TNFSF13B	VDAC1	FAIM	STK17B	VDAC1	IL7R	TNFRSF13C	ATRX
JAK2	BCL2L2	IL7R	PMAIP1	YWHAB	WEE1	MELK	MAP2K6	TNFRSF13C
MAP2K2	VDAC1	FAF1	VDAC2	MAP2K2	YWHAB	VDAC2	PMAIP1	MAP2K6
TNFRSF6B	SIVA1	VDAC2	YWHAB	MAP3K11	MELK	VDAC1	HOXA5	PMAIP1
MAPK9	PIDD	YWHAB	EIF4EBP1	WEE1	PMAIP1	PIDD	FAF1	HOXA5
STK17B	MDM2	CASP7	GZMA	IL7R	TRADD	BCL2L2	PTEN	FAF1
BCL6	MAP2K2	TRADD	VDAC1	KDM6A	FAF1	MAP2K2	NF1	PTEN
FAF1	AKT1	MDM2	TWIST1	DAP	VDAC2	PMAIP1	HOXA9	NF1

**Tabelle S5: Stärkste Regulationen der Genexpression in RS4;11****Stärkste Induktion in RS4;11**

VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
TNFSF13B	BACH2	BACH2	BACH2	BACH2	BACH2	BACH2	BIK	BACH2
FOS	MDM2	AFF3	MDM2	ATM	TNFSF10	TNFSF10	PIK3R1	TNFSF10
GZMA	AFF3	MDM2	RAG1	RAG1	MDM2	MDM2	BACH2	DDIT4
EP300	TNFSF10	TNFSF10	TNFSF10	MDM2	RAG1	BMF	RB1	MELK
CSNK2A1	BIK	BIK	BMF	TNFSF10	BMF	RAG1	GZMA	BIK
HOXA3	DEPTOR	ATM	AFF3	BMF	AFF3	FOXO4	FOXO1	ATM
BIK	HOXA3	RAG1	FOXO1	FOXO4	FOXO4	DEPTOR	ATM	PIK3R1
RB1	MEIS1	PDCD4	DEPTOR	AKT3	ATM	AFF3	MELK	CSNK2A1
MAP3K12	FLT3	HOXA3	ATM	PIK3R1	HOXA3	ATM	CASP3	RB1
BIRC2	PDCD4	MEIS1	AKT3	DEPTOR	DEPTOR	FLT3	CASP4	FLCN

**Stärkste Suppression in RS4;11**

VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
BMF	GZMA	GZMA	GZMA	GZMA	GZMA	PHLDA3	FAIM	PHLDA3
CELSR3	CDKN1A	CDKN1A	CDKN1A	CDKN1A	CDKN1A	CDKN1A	FAS	FAS
RAG1	SH3RF1	PHLDA3	FAS	PHLDA3	PHLDA3	GZMA	CDKN1B	CDKN1A
PHLDA3	PHLDA3	FAS	PHLDA3	FAS	FAS	PHLDA3	PHLDA3	BCL2L2
CDKN1A	PMAIP1	SH3RF1	PMAIP1	BAX	FAIM	BAX	PMAIP1	MCL1
TRADD	FAIM	FAIM	FAIM	FAIM	PMAIP1	PMAIP1	FOS	FAIM
RUNX1	SIVA1	PMAIP1	TNF	BBC3	SH3RF1	FAIM	CDKN1A	AFF3
TWIST1	FAS	TNFSF13B	BAX	SH3RF1	TNF	FOS	HOXA3	TRADD
JAK1	TNFSF13B	ACIN1	DDIT4	EIF4EBP1	TWIST1	TNFSF13B	MCL1	BCL6
STAT5B	TRADD	BAX	EIF4EBP1	PMAIP1	BAX	TNF	TRADD	FAF1

Tabelle S6: Niedrig exprimierte Gene in SEM

KON	VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1
BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10
BIK	BIK	BIK	BIK	BIK	BIK	BIK	BIK	BIK	BIK
BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3
BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7
CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14
CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5
CCND1	CCND1	CDKN2B	CCND1	CCND1	CCND1	CDKN2B	CDKN2B	CCND1	CCND1
CDKN2B	CDKN2B	CRLF2	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CRLF2	CDX2	CDKN2B	CDKN2B
CDX2	CDX2	DAPK1	CRLF2	CDX2	CDX2	DAPK1	CRLF2	CDX2	CDX2
CRLF2	CRLF2	ESR1	DAPK1	CRLF2	CRLF2	ESR1	DAPK1	CRLF2	CRLF2
DAPK1	DAPK1	FASLG	ESR1	DAPK1	DAPK1	FASLG	ESR1	DAPK1	DAPK1
ESR1	ESR1	FHIT	FASLG	ESR1	ESR1	FHIT	FASLG	ESR1	ESR1
FASLG	FASLG	FLT1	FHIT	FASLG	FASLG	FLT1	FLT1	FASLG	FASLG
FLT1	FLT1	GZMB	FLT1	FLT1	FLT1	GZMB	GZMB	FLT1	FHIT
GZMB	GZMB	HRK	GZMB	GZMB	GZMB	HRK	HRK	GZMB	FLT1
HRK	HRK	IL10	HRK	HRK	HRK	IL10	IL10	HRK	GZMB
IL10	IL10	JUN	IL10	IL10	IL10	JUN	JUN	IL10	HRK
IL7	IL7	MAPK10	JUN	IL7	IL7	MAPK10	MAPK10	IL7	IL10
JUN	JUN	NOTCH3	MAPK10	JUN	JUN	NOTCH3	NOTCH3	JUN	IL7
MAPK10	MAPK10	NOTCH4	NOTCH3	MAPK10	MAPK10	NOTCH4	NOTCH4	MAPK10	JUN
NOTCH3	NOTCH3	PHLDA3	NOTCH4	NOTCH3	NOTCH3	PHLDA3	PHLDA3	NOTCH3	MAPK10
NOTCH4	NOTCH4	PTPRS	PHLDA3	NOTCH4	NOTCH4	PTPRS	PTPRS	NOTCH4	NOTCH3
PHLDA3	PHLDA3	RAG1	PTPRS	PHLDA3	PHLDA3	RAG1	RAG1	PHLDA3	NOTCH4
PTPRS	PTPRS	RGCC	RAG1	PTPRS	PTPRS	RGCC	RGCC	PTPRS	PHLDA3
RAG1	RAG1	ROS1	RGCC	RAG1	RAG1	ROS1	ROS1	RAG1	PTPRS
RGCC	RGCC	THEM4	ROS1	RGCC	RGCC	THEM4	THEM4	RGCC	RAG1
ROS1	ROS1	TNFRSF10A	THEM4	ROS1	ROS1	TNFRSF10A	TNFRSF10A	ROS1	RGCC
THEM4	THEM4	TNFRSF10C	TNFRSF10A	THEM4	THEM4	TNFRSF10C	TNFRSF10C	THEM4	ROS1
TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF13B	TNFRSF10C	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF10A	THEM4
TNFRSF10C	TNFRSF10C		TNFRSF13B	TNFRSF10C	TNFRSF10C			TNFRSF10C	TNFRSF10A
TNFRSF13B	TNFRSF13B			TNFRSF13B	TNFRSF13B			TNFRSF13B	TNFRSF10C

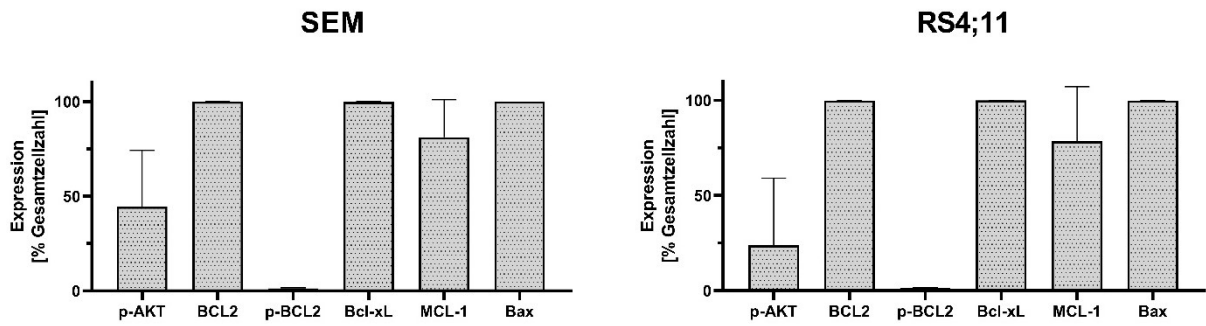
total reads &lt; 50

Tabelle S7: Niedrig exprimierte Gene in RS4;11

KON	VEN	BKM	BKM + VEN	IDEL	IDEL + VEN	MK	MK + VEN	PERI	PERI + VEN
BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1
BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10	BCL2L10
BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3	BIRC3
BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7	BIRC7
CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5	CASP5
CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14	CASP14
CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1	CCND1
CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A	CDKN2A
CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B	CDKN2B
CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2	CDX2
CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2	CRLF2
DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1	DAPK1
FASLG	ESR1	ESR1	ESR1	ESR1	FASLG	FASLG	FASLG	FASLG	FASLG
FHIT	FASLG	FASLG	FASLG	FASLG	FHIT	FHIT	FHIT	FHIT	FHIT
FLT1	FHIT	FHIT	FHIT	FHIT	FLT1	FLT1	FLT1	FLT1	FLT1
GZMB	FLT1	FLT1	FLT1	FLT1	GZMB	GZMB	GZMB	GZMB	GZMB
HRK	GZMB	GZMB	GZMB	GZMB	HRK	HRK	HRK	HRK	HRK
IL7	HRK	HRK	HRK	HRK	IL7	IL7	IL7	IL7	IL7
IL10	IL7	IL7	IL7	IL7	IL10	IL10	IL10	IL10	IL10
JUN	IL10	IL10	IL10	IL10	JUN	JUN	JUN	JUN	JUN
MAPK10	JUN	JUN	JUN	JUN	MAPK10	MAPK10	MAPK10	MAPK10	MAPK10
NOTCH3	MAPK10	MAPK10	MAPK10	MAPK10	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH3
NOTCH4	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH3	NOTCH4	NOTCH4	NOTCH4	NOTCH4	NOTCH4
PAWR	NOTCH4	NOTCH4	NOTCH4	NOTCH4	PAWR	PAWR	PAWR	PAWR	PAWR
PTPRS	PAWR	PAWR	PAWR	PAWR	PTPRS	PTPRS	PTPRS	PTPRS	PTPRS
RGCC	PTPRS	PTPRS	PTPRS	PTPRS	RGCC	RGCC	RGCC	RGCC	RGCC
ROS1	RGCC	RGCC	RGCC	RGCC	ROS1	ROS1	ROS1	ROS1	ROS1
THEM4	ROS1	ROS1	ROS1	ROS1	THEM4	THEM4	THEM4	THEM4	THEM4
TNFRSF10A	THEM4	THEM4	THEM4	THEM4	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10A
TNFRSF10C	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10A	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF10C
TNFRSF13B	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF10C	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF13B
YAP1	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF13B	TNFRSF13B	YAP1	YAP1	YAP1	YAP1	YAP1

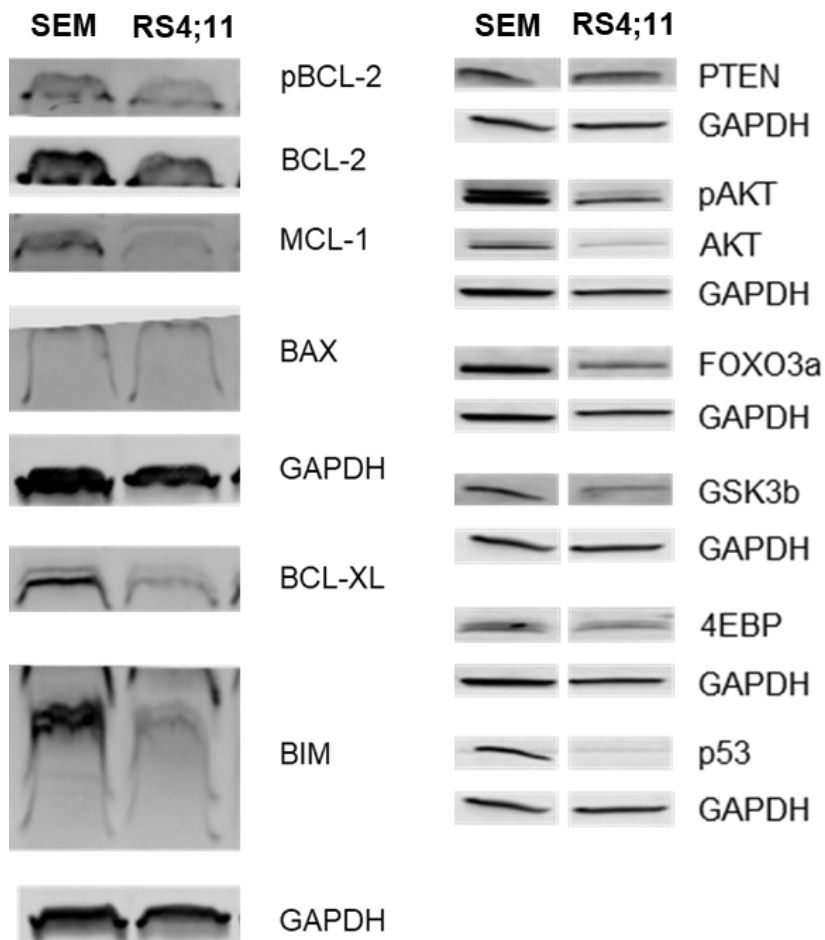
total reads &lt; 50

## 9.2 Ergänzende Abbildungen



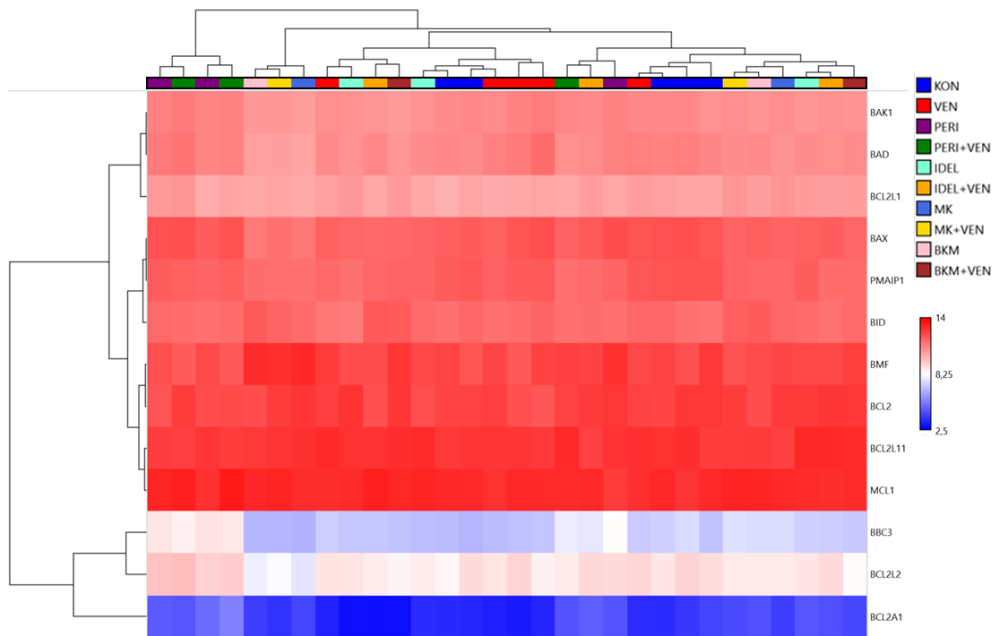
**Abb. S1: Nachweis der basalen Proteinexpression in SEM und RS4;11**

Nachweis der basalen Expression von pAKT und BCL-2-Proteinen mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der absoluten Expression, MW  $\pm$  SD, n  $\geq$  3.



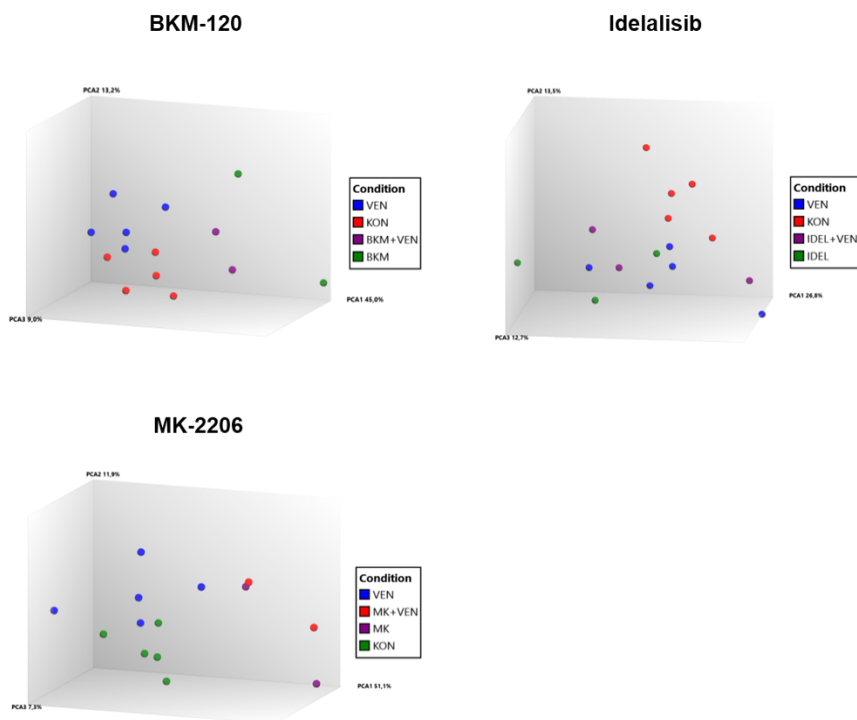
**Abb. S2: Charakterisierung der basalen Proteinexpression des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs in SEM und RS4;11**

Nachweis von BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegproteinen mittels Western Blot. Als Kontrolle diente für jede Probe GAPDH. Übernommen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.



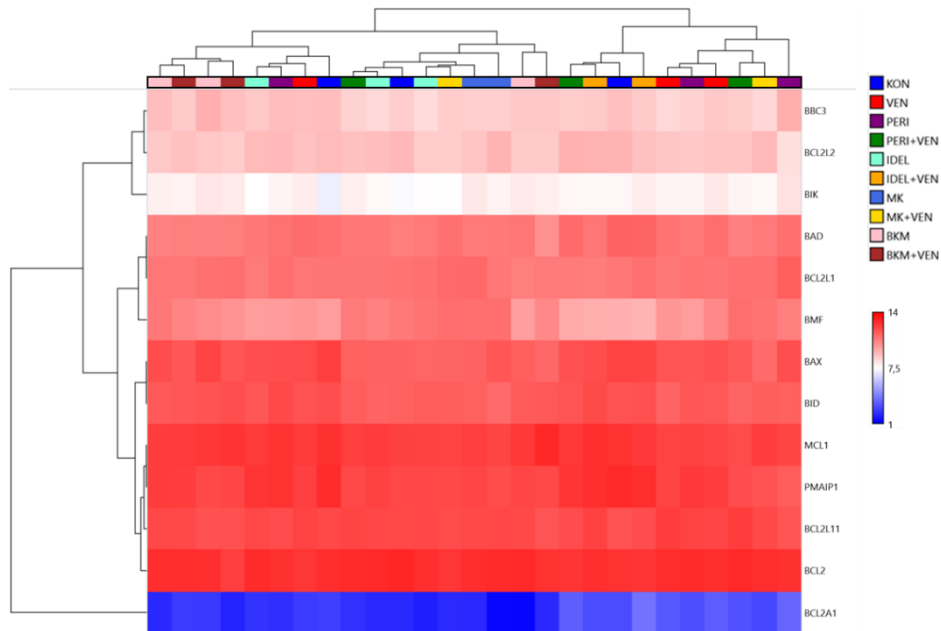
**Abb. S3: Hierarchische Gliederung der Expression der BCL-2-Signalwegene nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in SEM-Zellen**

Mittlere log<sub>2</sub>-Expressionswerte der Gene des BCL-2-Signalwegs in SEM wurden mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) berechnet und als *heatmap* dargestellt. Rote und blaue Farbgebung kennzeichnet hohe bzw. niedrige Expressionswerte.



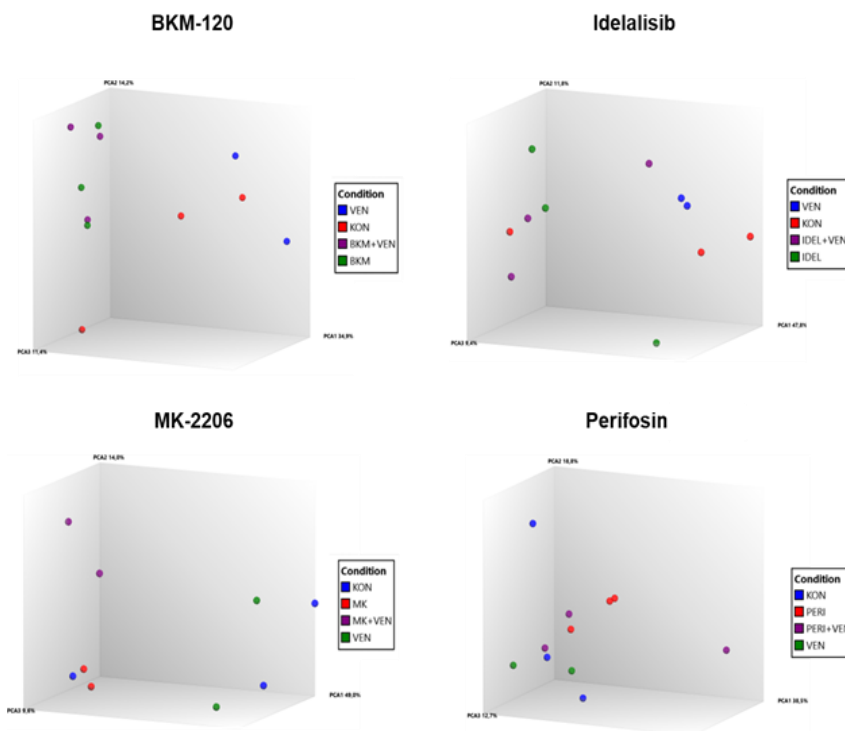
**Abb. S4: PCA-plots nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination in SEM-Zellen**

Darstellung der differenzierten Regulation der Genexpression mittels *PCA-plots* nach Inkubation von Venetoclax, BKM-120, Idelalisib, MK-2206 oder den Kombinationen. Eine Inkubation mit DMSO diente als Kontr. IIansatz n ≥ 2.



**Abb. S5: Hierarchische Gliederung der Expression des BCL-2-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in RS4;11-Zellen**

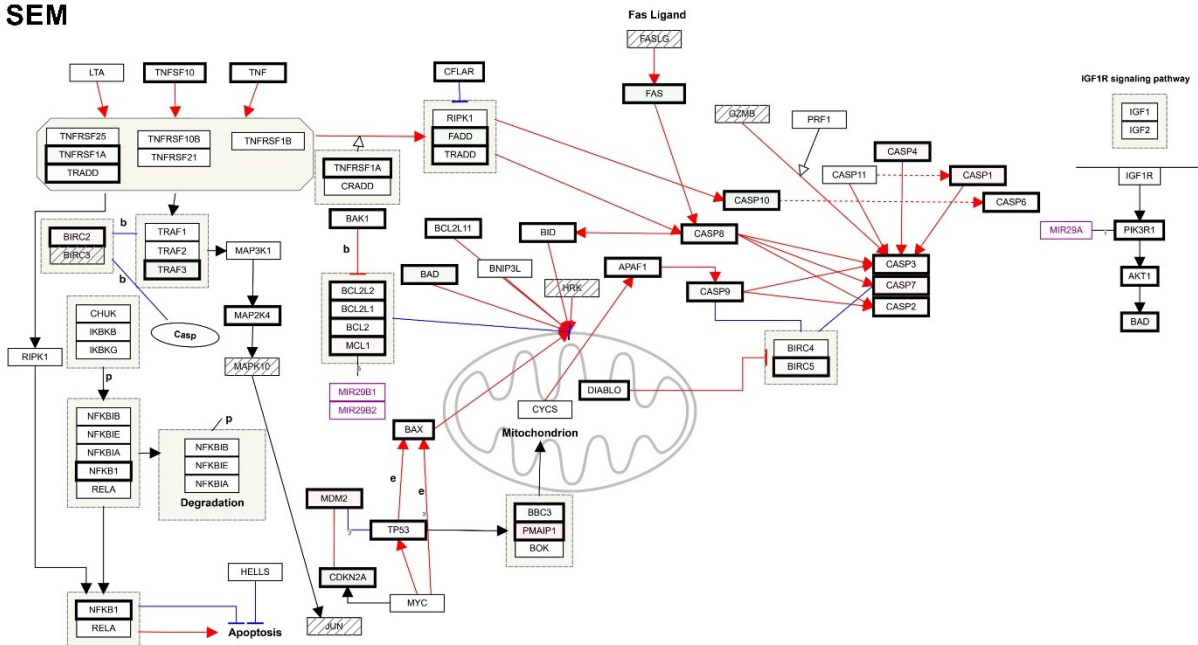
Mittlere log<sub>2</sub>-Expressionswerte der Gene des BCL-2 Signalwegs in RS4;11 wurde mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) erstellt und als *heatmap* dargestellt. Rote und blaue Farbgebung kennzeichnet hohe bzw. niedrige Expressionswerte.



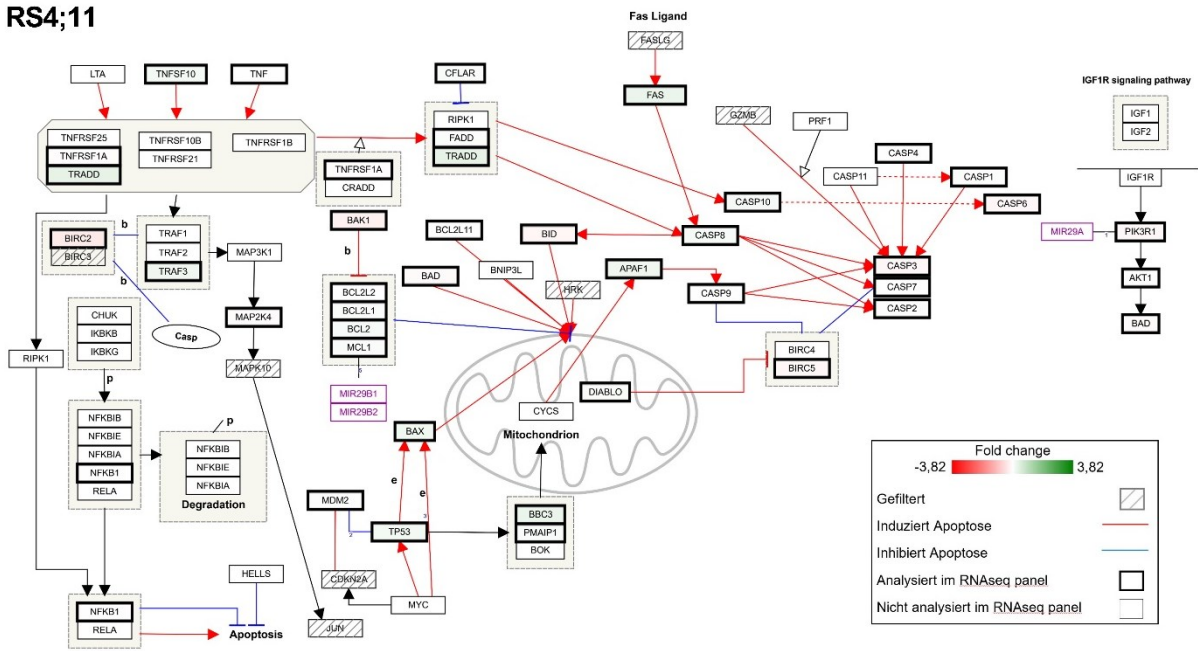
**Abb. S6: PCA-plots nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination in RS4;11-Zellen**

Darstellung der differenzierten Regulation der Genexpression mittels PCA-plots nach Inkubation von Venetoclax, BKM-120, Idelalisib, MK-2206, Perifosin oder den Kombinationen. Eine Inkubation mit DMSO diente als Kontrollansatz  $n \geq 2$ .

SEM

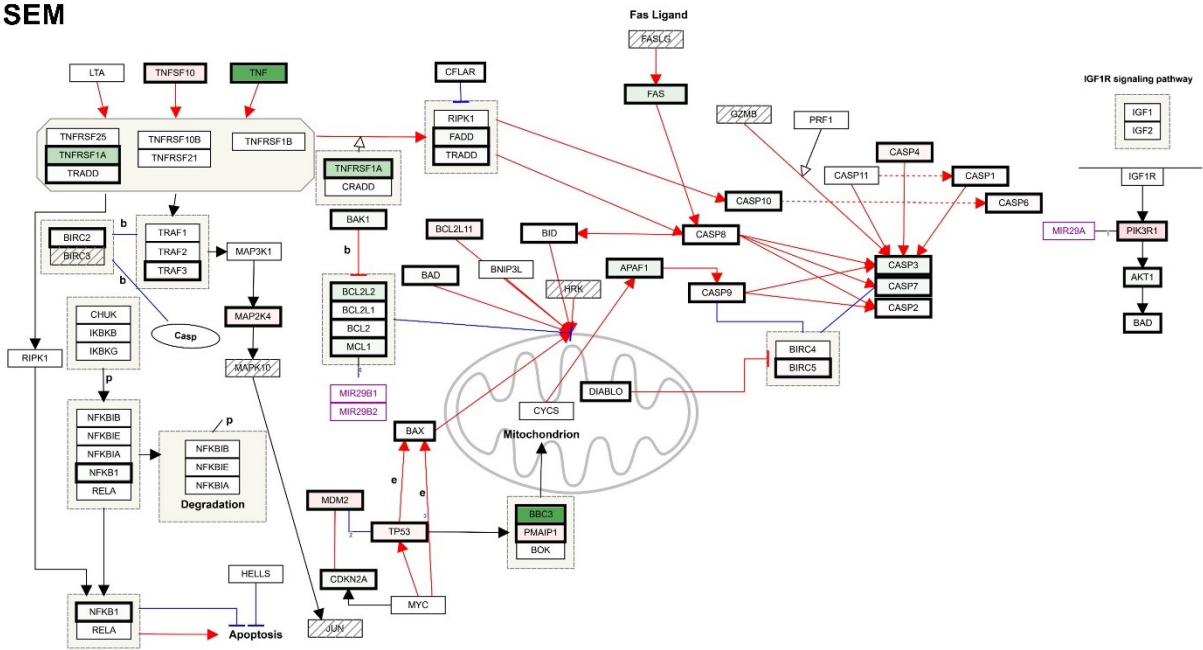


RS4;11

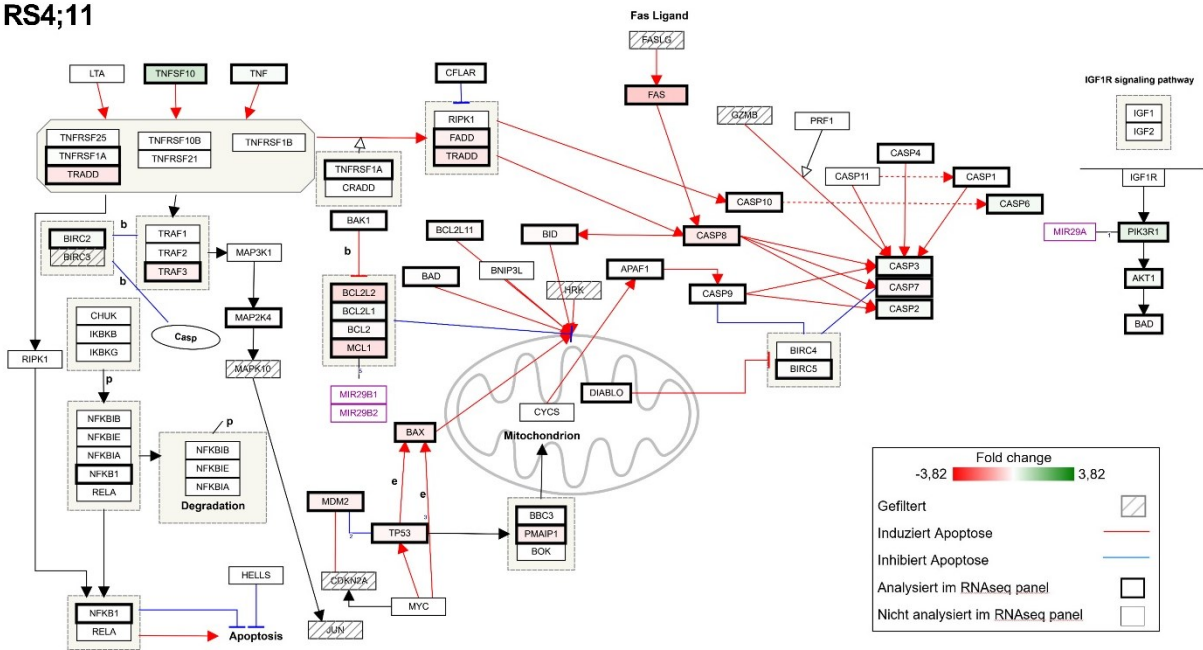


**Abb. S7: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach Applikation von Venetoclax**  
 Einfluss von Venetoclax auf die Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade in SEM und RS4;11. Mittels TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) und dem WikiPathways-plugin wurden die berechneten Werte des *fold change* in die apoptotische Signalwegkaskade integriert dargestellt. Gene mit mittleren *total reads* kleiner als 50 wurden zur Rechtfertigung biologischer Signifikanz ausgeschlossen (gefiltert).  $n \geq 3$ .

SEM

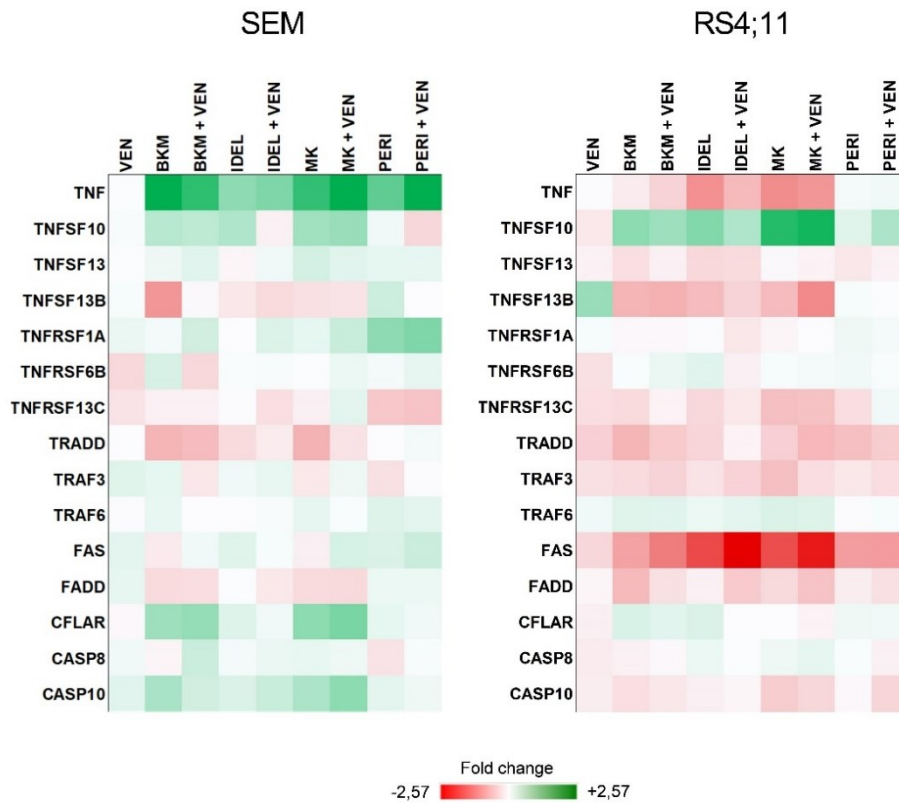


RS4;11



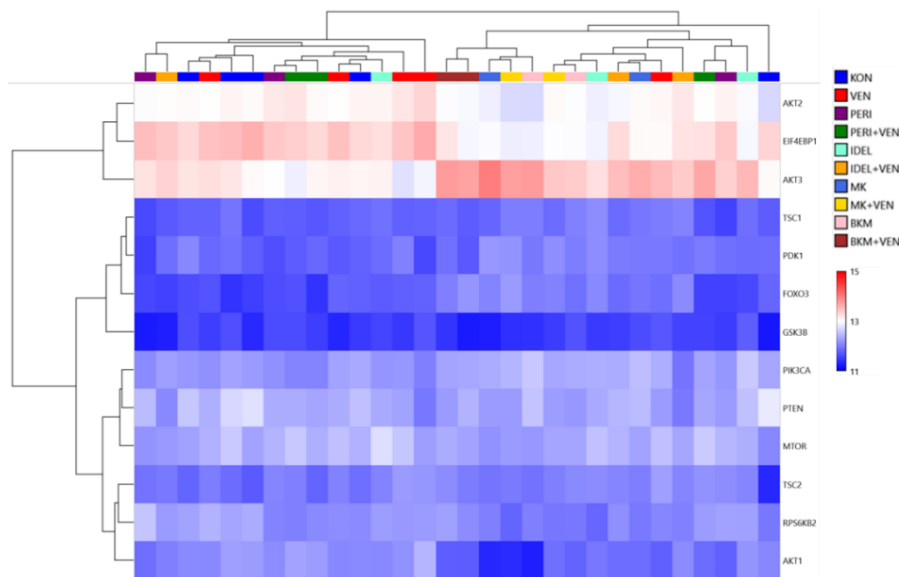
**Abb. S8: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach simultaner Applikation von Venetoclax und Perifosin**

Einfluss von simultaner Applikation von Venetoclax und Perifosin auf die Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade in SEM und RS4;11. Mittels TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) und dem WikiPathways-plugin wurden die berechneten Werte des *fold change* in die apoptotische Signalwegkaskade integriert dargestellt. Gene mit mittleren *total reads* kleiner als 50 wurden zur Rechtfertigung biologischer Signifikanz ausgeschlossen (gefiltert).  $n \geq 3$ .



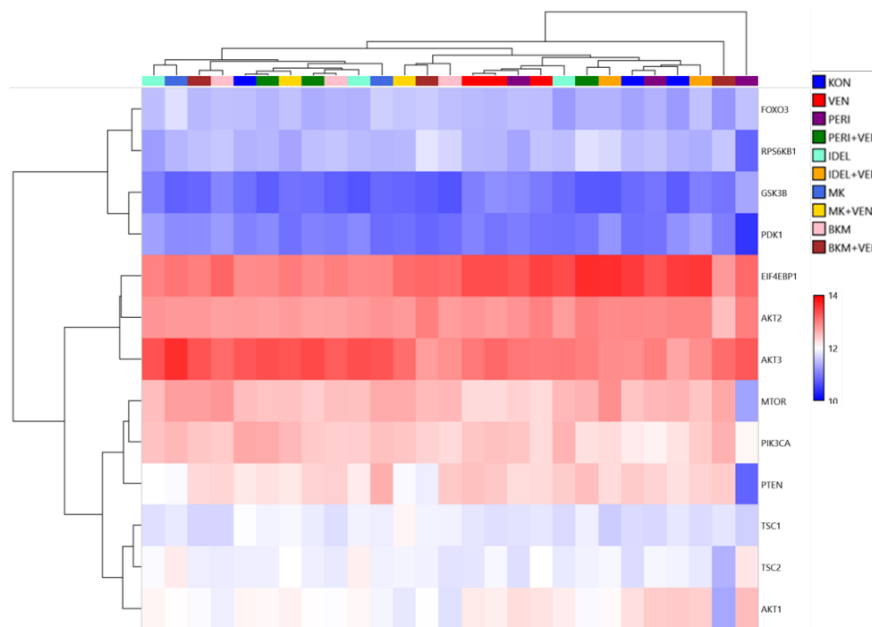
**Abb. S9: Einfluss auf die Genexpression des extrinsischen Signalwegs der Apoptose**

*Heatmap* des extrinsischen Signalwegs in SEM und RS4;11, *fold change* zu der Kontrolle, 24 h Inkubation. Berechnungen des *fold change* erfolgte mittels der TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0). Grüne und rote Farbgebung kennzeichnet Hoch- bzw. Runterregulation.  $n \geq 2$ .



**Abb. S10: Hierarchische Gliederung der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in SEM-Zellen**

Die *heatmap* stellt mittlere  $\log_2$ -Expressionswerte des PI3K/AKT-Signalwegs dar und wurde mittels TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) erstellt. Rote und blaue Farbgebung kennzeichnet hohe bzw. niedrige Expressionswerte.



**Abb. S11: Hierarchische Gliederung der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in RS4;11-Zellen**

Die *heatmap* stellt mittlere log<sub>2</sub>-Expressionswerte des PI3K/AKT-Signalwegs dar und wurde mittels TAC-Software (ThermoFisher, Version 4.0) erstellt. Rote und blaue Farbgebung kennzeichnet hohe bzw. niedrige Expressionswerte.

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über den intrinsischen Signalweg der Apoptose .....	3
Abb. 2: Wirkmechanismus von Venetoclax .....	5
Abb. 3: Darstellung des PI3K/AKT-Signalwegs .....	7
Abb. 4: Strukturformeln der verwendeten I3K-Inhibitoren Idelalisib und BKM-120 .....	9
Abb. 5: Strukturformeln der verwendeten AKT-Inhibitoren MK-2206 und Perifosin .....	11
Abb. 6: Interaktionen des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs .....	13
Abb. 7: Darstellung untersuchter Applikationssequenzen .....	24
Abb. 8: Durchflusszytometrische Differenzierung der frühen und späten Apoptose/Nekrose.....	26
Abb. 9: BAX-Translokations-Assay .....	28
Abb. 10: Übersicht des Ion Torrent-NGS-Verfahrens .....	32
Abb. 11: Einfluss der getesteten Kombinationen auf die Viabilität physiologischer Blutzellen .....	34
Abb. 12: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Proliferation.....	35
Abb. 13: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die metabolische Aktivität .....	36
Abb. 14: Einfluss der Applikationssequenzen auf die metabolische Aktivität .....	38
Abb. 15: Mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie.....	41
Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Annexin V/PI-Färbung nach einzelner und kombinierter Applikation von Venetoclax und Perifosin in SEM-Zellen .....	42
Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate .....	43
Abb. 18: Nachweis der <i>cleaved</i> -Caspase 3-Expression.....	44
Abb. 19: Nachweis der BAX-Translokation.....	46
Abb. 20: Nachweis der (p)BCL-2-Expression in SEM-Zellen.....	48
Abb. 21: Nachweis der (p)BCL-2-Expression in RS4;11-Zellen .....	49
Abb. 22: Nachweis der MCL-1-, BCL-xL- und BAX-Expression in SEM-Zellen.....	50
Abb. 23: Nachweis der MCL-1-, BCL-xL- und BAX-Expression in RS4;11-Zellen.....	51
Abb. 24: Nachweis der AKT-Phosphorylierung .....	52
Abb. 25: Basale Genexpression in den B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 .....	53
Abb. 26: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des BCL-2- Signalwegs in SEM-Zellen.....	54
Abb. 27: PCA- <i>plot</i> nach einzelner und simultaner Applikation von Venetoclax und Perifosin in SEM- Zellen.....	55
Abb. 28: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des BCL-2- Signalwegs in RS4;11-Zellen.....	57
Abb. 29: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach Applikation von Perifosin .....	58
Abb. 30: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des PI3K/AKT- Signalwegs in SEM-Zellen.....	61
Abb. 31: Einfluss von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren auf die Genexpression des PI3K/AKT- Signalwegs in RS4;11-Zellen.....	63

Abb. S1: Nachweis der basalen Proteinexpression in SEM und RS4;11 .....	118
Abb. S2: Charakterisierung der basalen Proteinexpression des BCL-2- und PI3K/AKT- Signalwegs in SEM und RS4;11 .....	118
Abb. S3: Hierarchische Gliederung der Expression der BCL-2-Signalweggene nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in SEM-Zellen.....	119
Abb. S4: PCA-plots nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination in SEM-Zellen.....	119
Abb. S5: Hierarchische Gliederung der Expression des BCL-2-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in RS4;11-Zellen.....	120
Abb. S6: PCA-plots nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren einzeln oder in Kombination in RS4;11-Zellen.....	120
Abb. S7: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach Applikation von Venetoclax ..	121
Abb. S8: Genexpression der apoptotischen Signalwegkaskade nach simultaner Applikation von Venetoclax und Perifosin .....	122
Abb. S9: Einfluss auf die Genexpression des extrinsischen Signalwegs der Apoptose.....	123
Abb. S10: Hierarchische Gliederung der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in SEM-Zellen .....	123
Abb. S11: Hierarchische Gliederung der Genexpression des PI3K/AKT-Signalwegs nach Applikation von Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren in RS4;11-Zellen.....	124

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborgeräte .....	16
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien .....	18
Tabelle 4: Liste der verwendeten Inhibitoren.....	19
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	19
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	20
Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen im Hämolyse-Assay .....	21
Tabelle 8: Verwendete Konzentrationen der Inhibitionsversuche .....	23
Tabelle 9: Absorptions- und Emmissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe .....	29
Tabelle 10: Simultaner Nachweis der Proteinexpression .....	30
Tabelle 11: Evaluation synergistischer antiproliferativer Aktivität .....	36
Tabelle 12: Evaluation synergistischer Inhibition des Metabolismus .....	37
Tabelle 13: Evaluation synergistischer Aktivität in Abhängigkeit von der Applikationssequenz.....	39
Tabelle 14: Evaluation synergistischer Apoptoseinduktion.....	43
Tabelle 15: Signifikant regulierte Gene des BCL-2-Signalwegs in SEM-Zellen.....	55
Tabelle 16: Signifikant regulierte Gene der Apoptose in SEM-Zellen.....	59
Tabelle 17: Signifikant regulierte Gene der Apoptose in RS4;11-Zellen.....	60
Tabelle 18: Weitere signifikant regulierte Gene in SEM-Zellen .....	65
Tabelle S1: Auflistung aller untersuchten Gene innerhalb des RNA-Panels .....	100
Tabelle S2: Genregulation zur Kontrolle in SEM .....	111
Tabelle S3: Genregulation zur Kontrolle in RS4;11 .....	113
Tabelle S4: Stärkste Regulationen der Genexpression in SEM .....	116
Tabelle S5: Stärkste Regulationen der Genexpression in RS4;11 .....	116
Tabelle S6: Niedrig exprimierte Gene in SEM .....	117
Tabelle S7: Niedrig exprimierte Gene in RS4;11 .....	117

## Thesen der Dissertation

### „Untersuchungen zur kombinierten Inhibition des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs bei der akuten lymphatischen Leukämie des B-Zell-Typs“

1. Aufgrund der selektiven Inhibition aberrant aktivierter Signalwege wird keine erhöhte zytotoxische Wirkung der kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweg-Inhibition auf physiologische Blutbestandteile angenommen.
2. Basierend auf der funktionellen Relevanz des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalwegs in der Pathogenese der B-ALL, sowie zugrundeliegenden Interaktionen beider Signalwege, werden synergistische antileukämische Effekte bei kombinierter Inhibition vermutet.
3. Alternierende Applikationssequenzen beeinflussen vermutlich die Effektivität einer kombinierten BCL-2- und PI3K/AKT-Inhibition.
4. Es wird angenommen, dass die proapoptotischen Effekte des BCL-2-Inhibitors Venetoclax durch die Applikation von PI3K/AKT-Inhibitoren verstärkt werden.
5. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass eine Inhibition beider Signalwege auf mitochondrialer Ebene in einer Induktion der Apoptose konvergiert und eine erhöhte Translokation des Effektorproteins BAX nachgewiesen werden kann.
6. Es wird vermutet, dass kompensatorische Mechanismen in Folge der Venetoclax-Applikation durch die Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs unterbunden werden.
7. Eine verminderte MCL-1-Expression in Folge der PI3K/AKT-Inhibition wird als ein zentraler Mechanismus der Synergie mit Venetoclax angenommen.
8. Venetoclax und PI3K/AKT-Inhibitoren bewirken vermutlich eine proapoptotische Modulation sowohl auf Protein- als auch Genexpressionseben.
9. Als potenzieller Wirkmechanismus der Kombination von Venetoclax und Perifosin wird eine Induktion proapoptotischer Gene und nachfolgende konvergierende Modulation des intrinsischen Signalwegs der Apoptose angenommen.

## Publikationen

### Originalarbeiten

1. **Holz C.**, Lange S., Sekora A., Knuebel G., Krohn S., Murua Escobar H., Junghanss C., & Richter A. (2023). Combined BCL-2 and PI3K/AKT Pathway Inhibition in *KMT2A*Re-arranged Acute B-Lymphoblastic Leukemia Cells. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1359. <https://doi.org/10.3390/ijms24021359>  
Impact Factor: 6,208
2. Richter A., Lange S., **Holz C.**, Brock L., Freitag T., Sekora A., Knuebel G., Krohn S., Schwarz R., Hinz B., Murua Escobar H., & Junghanss C. (2022). Effective tumor cell abrogation via Venetoclax-mediated BCL-2 inhibition in *KMT2A*rearranged acute B-lymphoblastic leukemia. *Cell death discovery*, 8(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01093-3>  
Impact Factor: 7,113
3. Richter A., Fischer E., **Holz C.**, Schulze J., Lange S., Sekora A., Knuebel G., Henze L., Roof C., Murua Escobar H., & Junghanss C. (2021). Combined Application of Pan-AKT Inhibitor MK-2206 and BCL-2 Antagonist Venetoclax in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2771. <https://doi.org/10.3390/ijms22052771>  
Impact Factor: 6,208

### Kongressbeiträge

1. **Holz C.**, Richter A., Lange S., Sekora A., Jeremias I., Vollmar B., Junghanss C. „Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax reduziert die Proliferation in Zellen der akuten B-lymphatischen Leukämie *in vitro* und *in vivo*.“ Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Berlin, 01-04.Oktober.2021, Vortrag
2. Richter A., **Holz C.**, Sekora A., Lange S., Junghanss C. “Co-targeting BCL-2- and PI3K/AKT-pathways reveals synergistic effects in acute B-lymphoblastic leukemia cells.” European School of Haematology: ESH – 2nd Translational Research Conference: Acute Lymphoblastic Leukaemia, E-Conference, 07-09.Mai.2021, Posterbeitrag

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name: Clemens Holz  
Geburtsdatum: 25.05.1998  
Geburtsort: Schwerin  
Adresse: Ahornweg 3, 19075 Holthusen  
Telefonnummer: +49 152 04108048  
E-Mail: clemens.holz@uni-rostock.de

---

### Ausbildung

seit 10/2017 Studium der Humanmedizin, 10. Fachsemester  
Universität Rostock  
1.Staatsexamen (02.09.2019), Note 1,0  
08/2010 – 07/2017 ecolea Internationale Schule Schwerin  
Abitur (08.07.2017), Note 1,0

---

### Forschungstätigkeit

seit 05/2020 Experimentelle Promotionsarbeit  
"Untersuchungen zur kombinierten Inhibition  
des BCL-2- und PI3K/AKT-Signalweges  
bei der akuten lymphatischen Leukämie des B-Zell- Typs"  
Zentrum für Innere Medizin, Klinik III  
Hämatologie, Onkologie & Palliativmedizin  
Universitätsmedizin Rostock  
Leitung: Prof. Dr. med. Christian Junghanß  
Betreuung: Dr. rer. hum. Anna Richter

Originalarbeiten

**Holz C. et al.** (2023). Combined BCL-2 and PI3K/AKT Pathway Inhibition in KMT2A Rearranged Acute B-Lymphoblastic Leukemia Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(2), 1359.  
Impact Factor: 6,208

Richter A., Lange S., **Holz C. et al** (2022). Effective tumor cell abrogation via Venetoclax-mediated BCL-2 inhibition in KMT2A rearranged acute B-lymphoblastic leukemia. *Cell Death Discov*, 8(1), 302.  
Impact Factor: 7,113

Richter A., Fischer E., **Holz C. et al.** (2021). Combined Application of Pan-AKT Inhibitor MK-2206 and BCL-2 Antagonist Venetoclax in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(5), 2771.  
Impact Factor: 6,208

Kongressbeiträge                      **Holz C. et al.** „Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax reduziert die Proliferation in Zellen der akuten B-lymphatischen Leukämie *in vitro* und *in vivo*.“ Jahrestagung der DGHO, Berlin, 01-04.Oktober.2021, Vortrag

Richter A., **Holz C. et al.** “C -targeting BCL-2- and PI3K/AKT-pathways reveals synergistic effects in acute B-lymph blastic leukemia cells.” ESH – 2nd Translational Research Conference: Acute Lymphoblastic Leukaemia, E-Conference, 07-09.Mai.2021, Posterbeitrag

---

### Sprachen

Englisch                                      sehr gute Kenntnisse, DAAD B2/C1  
Spanisch                                      gute Kenntnisse, DAAD B2

---

### Extracurriculare Aktivitäten

2020 – 2022                                  Engagement im Medinetz Rostock e.V., ehrenamtliche Vermittlung medizinischer Versorgung für Menschen ohne geklärten Aufenthaltsstatus

---

### Auszeichnungen

2023    PROMOS-Stipendium zur akademischen Aus- und Fortbildung im Ausland (PJ-Tertial, K.E.M Hospital, Mumbai, Indien)  
2022    Auszeichnung für exzellente Leistungen im ersten Staatsexamen  
2018    Buchpreis für ausgezeichnete Leistungen im Fach Anatomie im Rahmen des Humanmedizinstudiums an der Universität Rostock

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 01.08.2023

---

Clemens Holz

## **Danksagung**

Mit großer Dankbarkeit und Freude möchte ich diese Zeilen nutzen, denn viele Leute haben ein Danke verdient.

Ich möchte mich insbesondere bei Prof. Junghanß bedanken, dafür dass Sie mich in Ihrer Abteilung herzlich aufnahmen und mir die Möglichkeit gaben, mich in diesem Bereich weiterzuentwickeln, sowie für das Vertrauen und die wertschätzende Zusammenarbeit.

Einen sehr herzlichen Dank möchte ich an Dr. Anna Richter ausrichten. Liebe Anna, ich bin immer noch der Meinung sich für eine experimentelle Dissertation zu entscheiden ist wie Schrödingers Katze. Aber mit dir als Betreuerin an der Seite, würde ich wohl jede Arbeit annehmen. Danke, dass du zu jeder Zeit mit einem offenen Ohr für mich da warst und ich so viel von dir lernen durfte. Für all die investierte Arbeit habe ich mindestens genauso viel zurückbekommen, vielen Dank!

Ein großer Dank gilt auch unserem Laborteam. Lieber Hugo, vielen Dank, dass du immer ein verlässlicher Ansprechpartner warst und mich mit wertvollen Tipps in der Korrektur der Arbeit unterstützt hast. Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Netti richten. Ich kann mich an keinen einzigen Versuch erinnern, bei dem du mir nicht mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast. Ohne dich würde ich wahrscheinlich noch immer als verlorener Mediziner im Labor stehen. Liebe Sandra, dir möchte ich besonders für deine guten Kommentare und den kritischen Blick Danke sagen. Vielen Dank gilt in diesem Zuge auch an Saskia und Gudrun für die ganze Arbeit am NGS und den detaillierten Erklärungen. Ich möchte unserem gesamten Team für die vielen gemeinsamen Stunden beim Mittagessen oder den kleinen Kaffeepausen danken, welche dann auch mal ein missglücktes Experiment vergessen ließen.

Ich möchte diese Arbeit meiner geliebten Familien, meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern widmen. Nur Dank eurer bedingungslosen Unterstützung bin ich jemals in die Position gekommen zu Studieren und eine Dissertation anzufertigen. Ich bin sehr dankbar eine Familie wie euch zu haben und bin mir sehr bewusst, dass dies keine Selbstverständlichkeit im Leben ist.

An meine lieben Freunde möchte ich meinen aufrichtigen Dank für die Zeit zwischen den Experimenten ausdrücken. Eure moralische Unterstützung, eure aufmunternden Worte und ganz einfach, dass Ihr immer da wart hat mich in dieser Zeit sehr gestützt und ein zweites zu Hause gegeben.

Meine Liebe, Hanna, ich möchte dir auch hier nochmal ganz fest Danke sagen. Danke für die schöne Zeit abseits des Schreibens und deine ganze Mühe die du in die Korrektur und den Feinschliff investiert hast. Mit Hilfe deines kritischen Blicks und Beistandes bin ich nun bereit diese Arbeit abzuschließen, Danke!