

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

**Pharmakologische Charakterisierung eines neuartigen  
MDM2-spezifischen  $\alpha$ -Helix-Mimetikums in  
Zellkulturmodellen zur zielgerichteten Therapie des  
*triple*-negativen Mammakarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Jasmin Linh On**

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stöcklein

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Georg Gasteiger

In Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

*Victory is in having done your best.*  
– Bill Bowerman

Teile der Daten dieser Arbeit wurden veröffentlicht und auf folgenden Fachtagungen als Vortrag präsentiert:

## Publikationen:

1. **ON, J. L., GHADERI, S., RITTMANN, C., HOFFMANN, G., GIER, F., WOLOSCHIN, V., TU, J.-W., BHATIA, S., KULIK, A., NIEDERACHER, D., NEUBAUER, H., KURZ, T., FEHM, T., ESSER, K.**

*Pharmacological Inhibition of MDM2 Induces Apoptosis in p53-Mutated Triple-Negative Breast Cancer.*

International Journal of Molecular Sciences, 2025. 26(3): p. 1078.

DOI: 10.3390/ijms26031078 [1]

2. **ON, J. L.\*, WOLOSCHIN, V.\*, GIER, F., TU, J.-W., BHATIA, S., LENZ, T., KULIK, A., STÜHLER, K., NIEDERACHER, D., NEUBAUER, H., FEHM, T., KURZ, T.\* & ESSER, K.\***  
\*gleichwertiger Autorenbeitrag.

*Development of a Bipyrimidineamide based  $\alpha$ -Helix Mimetic Lead Compound for efficient Targeting of MDM2 in Triple-Negative Breast Cancer. (Preprint)*

bioRxiv, 2024.

DOI: 10.1101/2024.03.02.582899 [2]

## Vortragspräsentationen:

1. **ON, J., NEUBAUER, H., NIEDERACHER, D., KURZ, T., FEHM, T. & ESSER, K.**

MDM2-Inhibitoren als neuartiger Therapieansatz zur zielgerichteten Behandlung des p53-mutierten *triple*-negativen Mammakarzinoms (TNBC). (*Selected Abstract*)

42. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Senologie e.V. – München, Deutschland, 2023.

2. **ON, J. L., KULIK, A., NEUBAUER, H., NIEDERACHER, D., KURZ, T., ESSER, K. & FEHM, T.**

MDM2-Inhibitoren als neuartiger Ansatz zur zielgerichteten Therapie des *triple*-negativen Mammakarzinoms (TNBC). (*Selected Abstract*)

64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. – München, Deutschland, 2022.

Der zum Vortrag zugehörige *Abstract* wurde publiziert in:

Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2022. 82(10): p. 134.

DOI: 10.1055/s-0042-1756976

# Zusammenfassung

Das *triple*-negative Mammakarzinom (TNBC) ist die aggressivste Form aller Brustkrebs-Subtypen. Die verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten sind limitiert, sodass neue pharmakologische Zielstrukturen gesucht werden müssen. Eine mögliche therapeutische Strategie in der Onkologie stellt die Inhibition des Onkoproteins *Murine double minute 2 homolog* (MDM2) dar, die folglich zur Apoptoseinduktion in p53-Wildtyp-Tumoren führt. MDM2 ist der wichtigste negative Regulator des Tumorsuppressorproteins p53. Über die Rolle des MDM2 beim TNBC, bei dem in bis zu 80 % der Fälle eine p53-Mutation vorliegt, ist bisher nur wenig bekannt. In Vorarbeiten wurde der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor VWK603 identifiziert, der überraschenderweise einen Zelltod in der p53-mutierten TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 induzierte. Aus diesen Daten ergab sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, VWK603 pharmakologisch detaillierter zu charakterisieren und eine mögliche Anwendung in der Behandlung des TNBC zu überprüfen.

Dafür wurden drei TNBC-Zelllinien mit einer p53-Mutation (MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468) mit VWK603 oder mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3a als Referenzsubstanz behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Zur Überprüfung der Wirkungsabhängigkeit vom p53-Status wurden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 mit einem p53-Wildtyp bzw. mit einem p53-Knockout herangezogen. Darüber hinaus wurden die Bax/Bcl-2-Ratios als Maß der Apoptosesensitivität mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion in nicht toxischen Wirkstoffkonzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen bestimmt. Zur Evaluation der potenziellen Nebenwirkungen wurden nicht maligne NIH-3T3-Fibroblasten und MCF-10A-Zellen verwendet.

Insgesamt wurde in allen TNBC-Zelllinien eine signifikante Zellviabilitätsreduktion für beide getesteten MDM2-adressierenden Inhibitoren beobachtet. Für VWK603 wurden IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 3,67 µM und 6,58 µM und für Nutlin-3a IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 19,36 µM und 23,15 µM bestimmt. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied der IC<sub>50</sub>-Werte in den beiden Kolonkarzinomzelllinien lag nicht vor. Für VWK603 wurde eine deutliche Erhöhung der Bax/Bcl-2-Ratio dargestellt. In den nicht malignen Zelllinien NIH-3T3 und MCF-10A wurde eine Zellviabilitätsreduktion durch VWK603 mit IC<sub>50</sub>-Werten von 4,53 µM und 16,29 µM bestimmt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass VWK603 in TNBC-Zellen effizient die Zellviabilität reduziert, wobei als grundlegender Mechanismus eine Induktion der Apoptose angenommen werden kann. Hinsichtlich der Antitumorwirkung zeigte sich VWK603 potenter als Nutlin-3a. Die in den TNBC-Zellen offensichtlich p53-unabhängige Zellviabilitätsreduktion lässt sich möglicherweise auf Mechanismen wie die Inhibition der MDM2/p73-Interaktion zurückführen, die zukünftig charakterisiert werden sollen. Insgesamt weisen die durchgeführten Studien darauf hin, dass VWK603 erfolgreich für eine zielgerichtete Behandlung des p53-mutierten TNBC weiterentwickelt werden könnte.

## Summary

The triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive form among all mamma carcinoma subtypes. Due to its limited therapy, identification of new pharmacological targets is an urgent medical need. One possible strategy in oncology is the inhibition of the oncoprotein murine double minute 2 homolog (MDM2) leading to apoptosis induction in wild-type p53 tumors. MDM2 is the most important negative regulator of the tumor suppressor protein p53. Despite the fact that in TNBC p53 mutations occur in 80% of all cases, little is known about the role of MDM2 inhibitors in this mamma carcinoma subtype. In preliminary studies, a novel MDM2-addressing inhibitor named VWK603 was identified to induce cell death in the p53-mutated TNBC cell line MDA-MB-231. Hence, the aims of this dissertation are the pharmacological characterization of the novel compound VWK603 and the evaluation of its potential use in the treatment of TNBC.

In the study presented here, p53-mutated TNBC cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468) were treated with the novel compound VWK603 or with the reference MDM2 inhibitor Nutlin-3a. Subsequently, cell viability was measured by CellTiter-Glo Assay. Colon carcinoma cell lines HCT116 with p53 wild-type or with p53 knockout were chosen to investigate the p53 dependency of both MDM2-addressing inhibitors. Furthermore, Bax/Bcl-2 ratio as a marker for apoptosis susceptibility was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction in MDA-MB-231 cells treated with non-toxic concentrations of VWK603. Finally, for evaluation of first potential side effects, non-malignant cell lines NIH-3T3 and MCF-10A treated with VWK603 were investigated.

In all investigated TNBC cell lines, a significant reduction of cell viability was observed for both MDM2-addressing inhibitors. IC<sub>50</sub> values of VWK603 ranged from 3.67  $\mu$ M to 6.58  $\mu$ M and from 19.36  $\mu$ M to 23.15  $\mu$ M for the reference compound Nutlin-3a. No significant differences in IC<sub>50</sub> values were observed between both HCT116 cell lines. A significant improvement of the Bax/Bcl-2 ratio was detected in MDA-MB-231 cells treated with non-toxic concentrations of VWK603. A distinct reduction of cell viability with IC<sub>50</sub> values of 4.53  $\mu$ M and 16.29  $\mu$ M, respectively, was also determined in NIH-3T3 fibroblasts and MCF-10A cells.

The findings of this dissertation reveal an efficient reduction of cell viability in TNBC cells by the novel MDM2-addressing inhibitor VWK603 and suggest the induction of apoptosis as the underlying cell death inducing mechanism. In comparison to Nutlin-3a, VWK603 illustrated a superior potency indicating a higher antitumoral effect. Regarding the apparent p53-independent reduction of the cell viability in the TNBC cell lines, possible underlying pharmacological mechanisms, e.g., the inhibition of the interaction between MDM2 and p73, should be investigated in the future. Taken together, the results of this dissertation suggest that VWK603 could provide a promising candidate for preclinical drug development for personalized therapy of TNBC in the future.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AGO</b>	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>AMPK</b>	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
<b>APAF-1</b>	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATM</b>	<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATR</b>	<i>ataxia telangiectasia and rad3 related protein</i>
<b>AWMF</b>	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
<b>Bad</b>	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
<b>Bak</b>	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
<b>Bcl-xL</b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>BH</b>	<i>Bcl-2 homology</i>
<b>BL1</b>	<i>Basal-like-1</i>
<b>BL2</b>	<i>Basal-like-2</i>
<b>BRCA1</b>	<i>breast cancer gene 1</i>
<b>BRCA2</b>	<i>breast cancer gene 2</i>
<b>CBP</b>	<i>creb binding protein</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
<b>CETSA</b>	<i>cellular thermal shift assay</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DISC</b>	<i>death inducing signaling complex</i>
<b>DMEM/F-12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid

<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
<b>DNA-PK</b>	DNA-abhängige Proteinkinase
<b>DNp73</b>	N-terminal verkürzte und transaktivierungsdefiziente p73-Isoform
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution</i>
<b>DR2</b>	<i>death receptor 2</i>
<b>EDTA</b>	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>EMT</b>	Epitheliale-mesenchymale Transition
<b>ER</b>	<i>estrogen receptor</i>
<b>ESMO</b>	<i>European Society for Medical Oncology</i>
<b>et al</b>	<i>et alii/aliae</i>
<b>FADD</b>	<i>Fas-associated death domain</i>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> = fetales Kälberserum
<b>FDA</b>	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
<b>FGFR</b>	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
<b>FUSCC</b>	<i>Fudan University Shanghai Cancer Center</i>
<b>g</b>	1. Gramm, 2. Erdbeschleunigung
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>HER2</b>	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>HPRT1</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
<b>HSP90</b>	Hitzeschockprotein 90
<b>IC<sub>50</sub></b>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>IM</b>	immunmodulatorisch
<b>Kap</b>	Kapitel
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAR</b>	<i>luminal androgen receptor</i>
<b>log</b>	logarithmisch
<b>M</b>	<i>mesenchymal</i>
<b>MAP-Kinase-Inhibitor</b>	Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Inhibitor
<b>MDM2</b>	<i>murine double minute 2 homolog</i>

<b>MDM4/MDMX</b>	<i>murine double minute 4 homolog/murine double minute X homolog</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mRNA</b>	<i>messenger-RNA</i>
<b>MSL</b>	<i>mesenchymal-stem-like</i>
<b>n</b>	Anzahl
<b>NES</b>	<i>nuclear export signal</i> = nukleäres Exportsignal
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NLS</b>	<i>nuclear localisation signal</i> = nukleäres Importsignal
<b>nM</b>	1. Nanomolar, 2. Nanometer
<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>p21</b>	Protein p21
<b>p53</b>	Tumorsuppressorprotein p53
<b>p53<sup>-/-</sup></b>	p53-Knockout oder p53-defizient
<b>p53<sup>+/+</sup></b>	p53-Wildtyp
<b>p53-RE</b>	<i>p53-response element</i>
<b>p63</b>	Protein p63
<b>p73</b>	Protein p73
<b>PARP</b>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
<b>PD-1</b>	<i>programmed cell death protein 1</i>
<b>PD-L1</b>	<i>programmed cell death ligand 1</i>
<b>PI3K/Akt</b>	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt
<b>PP<sub>i</sub></b>	Pyrophosphat
<b>PPI</b>	Protein-Protein-Interaktion
<b>PR</b>	<i>progesterone receptor</i>
<b>PROTAC</b>	<i>proteolysis targeting chimera</i>
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PUMA</b>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>

<b>qRT-PCR/qPCR</b>	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> = quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
<b>Rb</b>	Retinoblastom-Protein
<b>RETRA</b>	<i>reactivation of transcriptional reporter activity</i>
<b>RING</b>	<i>really interesting new gene</i>
<b>RITA</b>	<i>reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>SAM</b>	<i>sterile alpha motif</i>
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SMAC</b>	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
<b>TAp73</b>	p73-Isoform mit intakter Transaktivierungsdomäne
<b>(t)Bid</b>	<i>(truncated) BH3 interacting domain death agonist</i>
<b>TNBC</b>	<i>triple-negative breast cancer</i> = <i>triple-negatives</i> Mammakarzinom
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TNM</b>	Klassifikation nach Tumor, Nodus und Metastasen
<b>TP53</b>	Gen des Proteins p53
<b>TP73</b>	Gen des Proteins p73
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
<b>UICC</b>	<i>Union for International Cancer Control</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>vs</b>	versus
<b>VWK603</b>	Bezeichnung des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors
<b>(X)IAP</b>	<i>(X-linked) inhibitor of apoptosis</i>
<b>ZEB1</b>	<i>zinc finger E-Box binding homeobox 1</i>
<b>°C</b>	Grad Celcius
<b>Δ</b>	delta = Differenz
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μM</b>	Mikromolar

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Mammakarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Einteilung des Mammakarzinoms .....	1
1.1.3 Therapie des Mammakarzinoms.....	2
1.2 Das <i>triple</i> -negative Mammakarzinom .....	3
1.2.1 Definition und molekulargenetische Einteilung.....	3
1.2.2 Charakteristika und Risikofaktoren .....	4
1.2.3 Aktuelle Therapie und mögliche Therapieansätze .....	5
1.3 Das Tumorsuppressorgen TP53 .....	6
1.3.1 Eigenschaften und Funktionen .....	6
1.3.2 Bedeutung in der Tumorigenese.....	7
1.4 Das Onkogen MDM2.....	9
1.4.1 Eigenschaften und Funktionen .....	9
1.4.2 Bedeutung in der Tumorigenese.....	10
1.5 Die p53/MDM2-Interaktion .....	11
1.6 Die Apoptose .....	12
1.6.1 Ablauf der Apoptose .....	12
1.6.2 Induktion der Apoptose als therapeutischer Ansatz in Krebszellen .....	15
1.7 Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren .....	18
1.7.1 Definition und Rolle in der therapeutischen Anwendung .....	18
1.7.2 MDM2-Inhibitoren und deren Bedeutung in der Tumorthherapie .....	19
1.7.3 $\alpha$ -Helix-Mimetika.....	20
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	21
2 Material und Methoden .....	24

2.1	Materialien .....	24
2.1.1	Zelllinien .....	24
2.1.2	Zusammensetzung der Medien .....	25
2.1.3	Wirkstoffe .....	26
2.1.4	Chemikalien.....	26
2.1.5	Laborgeräte .....	27
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.7	Kits .....	28
2.1.8	Primer.....	29
2.1.9	Software .....	29
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellkultur.....	29
2.2.1.1	Auftauen von Zellen.....	29
2.2.1.2	Kultivierung der Zellen .....	30
2.2.1.3	Zählen der Zellen.....	30
2.2.1.4	Einfrieren der Zellen .....	31
2.2.2	Zellviabilitätstestung .....	31
2.2.2.1	Lösen und Verdünnen der MDM2-adressierenden Inhibitoren.....	31
2.2.2.2	Aussaat der Zellen zur Zellviabilitätstestung .....	31
2.2.2.3	Behandlung der Zellen mit den MDM2-adressierenden Inhibitoren.....	31
2.2.2.4	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay .....	33
2.2.2.5	Auswertung der Zellviabilitätstestung.....	33
2.2.3	Molekularbiologie.....	34
2.2.3.1	Aussaat der Zellen zur Analyse der Apoptoseinduzierbarkeit .....	34
2.2.3.2	Behandlung der Zellen mit VWK603 .....	34
2.2.3.3	mRNA-Isolation .....	34
2.2.3.4	cDNA-Synthese .....	35
2.2.3.5	Quantitative Echtzeit-PCR .....	36
2.2.4	Statistische Auswertung .....	38
3	Ergebnisse.....	39

3.1	Untersuchung der Wirksamkeit von VWK603 in p53-mutierten TNBC-Zellen .....	39
3.2	Vergleich der Wirksamkeit von VWK603 mit Nutlin-3a .....	41
3.3	Untersuchung der Wirkung in p53-defizienten Zellen .....	43
3.4	Charakterisierung des Einflusses auf die zelluläre Apoptoseinduzierbarkeit.....	47
3.5	Toxizitätstestung in nicht malignen Zellen .....	50
4	Diskussion .....	54
4.1	Übersicht.....	54
4.2	Untersuchung der pharmakologischen Wirksamkeit von VWK603 in TNBC-Zellen und Vergleich zu Nutlin-3a .....	54
4.3	Charakterisierung des Wirkmechanismus von VWK603.....	57
4.3.1	Induktion des Zelltodes durch Apoptose .....	57
4.3.2	p53-unabhängige Wirkung von VWK603 .....	59
4.3.3	Adressierung der MDM2/p73-Interaktion als möglicher p53-unabhängiger Mechanismus .....	61
4.3.4	Mögliche nicht direkt die Protein-Protein-Interaktionen des MDM2 adressierende Wirkmechanismen von VWK603 .....	65
4.4	VWK603 als möglicher Wirkstoff in der zukünftigen Krebstherapie.....	67
4.4.1	Einführung .....	67
4.4.2	Toxizitätsbestimmung von VWK603 in nicht malignen Zellmodellen und Abschätzung potenzieller Nebenwirkungen im menschlichen Organismus .....	67
4.4.3	Resistenzentwicklung von MDM2-Inhibitoren <i>in vivo</i> und mögliche synergistische Anwendung von VWK603 mit Paclitaxel.....	69
4.4.4	Mögliche synergistische Anwendung in der zukünftigen Chemotherapie- unabhängigen Behandlung .....	70
4.4.5	Erweiterung des Wirkstoffprofils von VWK603 über duale Adressierung von MDM2 und MDMX .....	71
4.5	Limitationen der Untersuchungen und Ausblick.....	73
4.6	Schlussfolgerung.....	75
5	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	77
5.1	Literaturverzeichnis .....	77
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	90
5.3	Tabellenverzeichnis .....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist die häufigste Krebserkrankung insgesamt und der Frau weltweit. Im Jahr 2020 machte es mit einer Inzidenzzahl von ca. 2,3 Millionen ein Viertel aller neuen Krebspatientinnen aus. In demselben Jahr war das Mammakarzinom für 15,5 % aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich [3]. Das generelle Durchschnittsalter der Patientinnen mit einem Mammakarzinom in Deutschland liegt bei 65 Jahren. Auch Männer können von der Erkrankung betroffen sein. Die Inzidenzrate liegt dabei bei ca. 1 % [4].

Für die Entstehung des Mammakarzinoms sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. Dazu zählen Lebensstilfaktoren wie Adipositas bzw. Übergewicht in der postmenopausalen Phase, geringe körperliche Aktivität sowie hoher Alkohol- und Rauchkonsum [4, 5]. Hormone können ebenfalls das Entstehungsrisiko begünstigen. Dazu gehören zum einen eine frühe Menarche und eine späte Menopause, zum anderen die Einnahme eines Ovulationshemmers oder eine Hormonersatztherapie sowie eine spätere erste Schwangerschaft und eine geringe Anzahl an Schwangerschaften [4, 5]. Zusätzlich können benigne Brustveränderungen und eine hohe Brustdrüsengewebsdichte zu der Entstehung beitragen [4, 5]. Genetische Prädispositionen wie das Vorhandensein einer Mutation in den Tumorsuppressorgenen BRCA-1 (*breast cancer gene 1*) und BRCA-2 (*breast cancer gene 2*) erhöhen ebenfalls das Risiko der Entstehung [4, 5].

### 1.1.2 Einteilung des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom lässt sich in verschiedenen Kategorien einteilen. Neben der Einteilung nach der TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen), UICC/AJCC-Klassifikation (*Union for International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer Classification*) und der histomorphologischen Einteilung spielt die Bestimmung des zellulären Rezeptorstatus in der Klinik eine wichtige therapeutische und prognostische Rolle. In der Leitlinie der *European Society for Medical Oncology* (ESMO) [6] erfolgt die Einteilung des Mammakarzinoms nach den „intrinsischen“ Subtypen, die auf den Genexpressionsanalysen von Perou *et al.* basiert [7]: Luminal-A-Typ, Luminal-B-Typ, HER2+-Typ (*human epidermal growth factor receptor-2-positive subtype*) und *Basal-like*-Typ (Tabelle 1) [7]. Zusätzlich erfolgt eine Bestimmung des Proliferationsindex Ki-67, wobei ein hoher Proliferationsindex für ein schnelles Tumorwachstum spricht. Die Bestimmung der Subtypen erfolgt im klinischen Alltag immunhistochemisch [6, 8]. In der Literatur variieren dabei stark die Anteile der Subtypen. Dennoch machen die beiden Luminal-Typen zusammen den größten Anteil der Mammakarzinome (ca. 70 – 80 %) aus [9-12]. Bis zu ca. 20 % aller Mamakarzinome werden

dem *triple*-negativen Mammakarzinom (TNBC, *triple-negative breast cancer*) zugeordnet [9-14]. Der HER2+-Typ lässt sich bis zu einem Anteil von 20 % beobachten [9-12]. Prognostisch unterscheiden sich die Subtypen voneinander. Alle Subtypen weisen beispielsweise im Stadium I nach der UICC/AJCC-Klassifikation eine gute Prognose mit einer mehr als 90%iger 10-Jahres-Überlebensrate auf. Jedoch unterscheiden sie sich stark im fortgeschrittenen Stadium. Während die 10-Jahres-Überlebensrate für Stadium III zwischen 54 % und 75 % beim Luminal- und HER2+-Typ liegt, beträgt sie bei TNBC-Patientinnen nur 37 % [11].

**Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms.**

<b>Subtyp</b>	<b>ER/PR-Status</b>	<b>HER2-Status</b>	<b>Ki-67</b>
Luminal-A-Typ	+	-	niedrig
Luminal-B-Typ	+	-	hoch
Luminal-B-Typ	+	+	variiert
HER2+-Typ	-	+	variiert
<i>Basal-like</i> -Typ	-	-	variiert

Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (ER = *estrogen receptor*, PR = *progesterone receptor*, HER2 = *human epidermal growth factor receptor 2*) [6, 7, 15, 16]. Tabelle in Anlehnung an [16].

### 1.1.3 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms in Deutschland orientiert sich an der S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) [8] und an den Empfehlungen der Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) [17]. Dabei wird die Therapie zwischen einer lokalen und einer systemischen Behandlung unterschieden, deren Reihenfolge und Notwendigkeit vom Stadien- und Subtyp sich unterscheiden. Zu der lokalen Behandlung gehören die operative Behandlung mit einer möglichen Lymphknotendissektion in der Axilla sowie die Strahlentherapie [8]. Die systemische Therapie umfasst die (neo-)adjuvante Kombination von Chemotherapeutika, die monoklonale Antikörpertherapie, die endokrine Therapie und die HER2-zielgerichtete Therapie [8, 17], wobei die personalisierte zielgerichtete Therapie als vielversprechend gilt. Beim hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom wird beispielsweise der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen angewandt [8, 17]. Dabei konnte in einer Meta-Analyse gezeigt werden, dass ein fünfjähriger Einsatz von Tamoxifen die Mortalitätsrate um ein Drittel in den ersten 15 Jahren reduzierte [18]. Bei HER2+-Patientinnen wurde die krankheitsfreie 10-Jahres-Überlebensrate durch den einjährigen Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab nach der adjuvanten Chemotherapie um ca. 7 % verbessert [19]. Trastuzumab bindet an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 der Karzinomzellen [10]. Die systematische Übersichtsarbeit von Moja *et al.* zeigte ebenfalls eine signifikante Verbesserung der gesamten Überlebensrate um ein Drittel beim Einsatz von Trastuzumab in Kombination

mit einer Chemotherapie zusammen [20]. Der kombinierte Einsatz der zwei monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab verbesserte als adjuvante Therapie in einer sechsjährigen *Follow-Up*-Studie das invasive krankheitsfreie Überleben bei Patientinnen mit frühem HER2+-Typ-Stadium um weitere 3 %. Insbesondere verbesserte diese Kombinationstherapie das invasive krankheitsfreie Überleben bei Patientinnen mit einem positiven Lymphknotenstatus um ca. 5 % [21]. Im Gegensatz zu den genannten Therapien steht beim TNBC bis heute noch keine effiziente personalisierte zielgerichtete Therapie zur Verfügung, sodass die Identifizierung von neuen Zielstrukturen und möglichen therapeutischen Angriffspunkten ein medizinisch hochgradig relevantes Forschungsgebiet darstellt.

## 1.2 Das *triple*-negative Mammakarzinom

### 1.2.1 Definition und molekulargenetische Einteilung

Der *Basal-like*-Typ und das TNBC werden oft in der Literatur als Synonyme verwendet, obwohl beide nicht zwangsläufig dieselbe Tumorentität aufweisen [13]. Dem TNBC werden Tumore, die immunhistochemisch keine oder kaum Hormonrezeptoren (< 1 % Östrogen- und Progesteronrezeptoren) und keine bis wenige (< 10 %) HER2-Rezeptoren aufweisen, zugeordnet [6, 13]. Die *Basal-like*-Tumore werden hingegen nach einem bestimmten Expressionsmuster auf der molekulargenetischen Ebene klassifiziert [7, 13]. Dennoch liegt eine 70 – 80%ige Überschneidung zwischen dem TNBC und den *Basal-like*-Tumoren vor [6, 13, 15, 22, 23]. Schon im Laufe der letzten zwei Dekaden wurden verschiedene Klassifizierungssysteme für das TNBC anhand der molekulargenetischen Expressionsprofile entwickelt. Ein oft in der Literatur angewandtes Klassifizierungssystem ist die Einteilung nach Lehmann *et al.*, die das TNBC in sechs molekulare Subtypen einteilte: *Basal-like-1*-(BL1)-Subtyp, *Basal-like-2*-(BL2)-Subtyp, Luminal-Androgen-Rezeptor-(LAR)-Subtyp, mesenchymaler (M) Subtyp, mesenchymal-stem-like-(MSL)-Subtyp und immunomodulatorischer (IM) Subtyp [24]. In seinem Manuskript beschrieb Lehmann, dass beispielsweise Gene der Zellteilung und des Zellzyklus in den BL1-Tumoren im Gegensatz zu den anderen Subtypen vermehrt verändert waren. Charakteristisch für den M- und MSL-Subtyp war hingegen eine veränderte Expression in den Genen der Zellmotilität, Zelldifferenzierung und der epithel-mesenchymalen Transition (EMT). Zudem wurde der MSL-Subtyp vom M-Subtyp durch die veränderte Expression der Proliferationsgene und der mesenchymalen stammzellspezifischen Marker abgegrenzt [24]. Basierend auf diesen Charakteristika wird bis heute versucht, zielgerichtete Therapieansätze zu entwickeln. Im Jahre 2016 wurde die Klassifikation revidiert und neu definiert. Dabei entfielen die Einteilungssubtypen IM und MSL, da die Infiltration der Leukozyten und der Stromazellen im Tumor die Charakterisierung der Genexpressionsprofile in der von Lehman *et al.*

durchgeführten Einteilung beeinflussten [25]. Dennoch findet man bis heute in der aktuellen Literatur die alte Einteilung nach Lehmann *et al.* Neben der Einteilung nach Lehmann werden ebenfalls die Klassifikation nach Burstein *et al.* und die FUSCC-Klassifikation (*Fudan University Shanghai Cancer Center Classification*) nach Liu *et al.* angewandt [26]. Die Klassifizierungssysteme heben somit die Heterogenität des TNBC hervor und deuten darauf hin, dass gezielte Angriffspunkte im Rahmen einer personalisierten Therapie für eine effiziente Behandlung notwendig sind [27].

### 1.2.2 Charakteristika und Risikofaktoren

Epidemiologisch tritt das TNBC im Vergleich zu den anderen Subtypen vermehrt im jüngeren Alter auf (53 Jahre versus (vs.) 57,7 Jahre) [28]. Insbesondere in den ersten fünf Jahren zeigt das TNBC verglichen mit anderen Subtypen eine schlechtere Gesamtüberlebensrate (1,8-fach höheres Sterberisiko) auf. Das Risiko für eine Metastasenbildung innerhalb von fünf Jahren liegt um das 2,6-Fache höher als bei den anderen Subtypen, vor allem in den ersten drei Jahren [28]. Dabei lassen sich öfter viszerale Metastasen als Knochenmetastasen beobachten [28, 29]. Die mittlere Überlebensrate nach Feststellung der Metastasen beträgt neun Monate (Durchschnitt der Vergleichsgruppe mit anderen Subtypen: 20 Monate) [28]. Ein lokales Rezidiv geht typischerweise nicht den Metastasen voraus [28], sodass man eher von einer hämatologischen Streuung ausgeht [29, 30]. Zudem besteht keine Korrelation zwischen einem positiven Lymphknotenbefall und der Tumorgroße [28]. Das TNBC präsentiert sich bei der Diagnosestellung im Vergleich zu den anderen Subtypen größer und histologisch schlechter differenziert und wird eher als Zufallsbefund bei der körperlichen Untersuchung entdeckt [28]. Zudem tritt das TNBC im Vergleich zu den anderen Subtypen häufiger als Intervallkarzinom auf, welches sowohl in der Mammographie als auch in der Sonographie erst einmal nicht detektiert wird und während der Zeit bis zum nächsten Screening rasch an Größe zunimmt [28, 31]. Dies unterstreicht das aggressive Wachstumsverhalten des TNBC.

Zu den Risikofaktoren der Entwicklung des TNBC gehören junges Alter bei der Schwangerschaft, hohe Parität, frühe Menarche, abdominale Adipositas, hoher Taille-Hüft-Index und ethnische Herkunft [13, 27, 32]. Dabei ist das Erkrankungsrisiko für ein TNBC bei prämenopausalen afroamerikanischen Frauen am größten [32]. Darüber hinaus ist das TNBC mit dem Tumorsuppressorgen BRCA-1 assoziiert [13, 28, 33]. Dabei weisen 57 % der BRCA-1-Brustkrebspatientinnen ein TNBC auf [33]. Hingegen reduziert das Stillen, vor allem länger als vier Monate bei hoher Parität, das Erkrankungsrisiko [32].

### 1.2.3 Aktuelle Therapie und mögliche Therapieansätze

Aufgrund des Mangels einer personalisierten zielgerichteten Therapie und seiner hohen Aggressivität stellt das TNBC von allen Subtypen die am schwierigsten zu therapierende Erkrankung dar und ist somit eine besondere medizinische Herausforderung. Die aktuelle systemische Therapie besteht aus Antrazyklinen und Taxanen. Alternativ kann ein Platinderivat therapeutisch in Erwägung gezogen werden [17]. Für TNBC-Patientinnen mit einer BRCA-Mutation kann ein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-(PARP-)Inhibitor hinzugezogen werden [17]. Seit Anfang 2023 ergänzt der *programmed cell death protein 1*-(PD-1-)Inhibitor Pembrolizumab die bisherige Therapie. Dabei besteht die Indikation für die Immuntherapie unabhängig vom *programmed cell death ligand 1*-(PD-L1-)Status der TNBC-Patientinnen [17]. In der *KEYNOTE*-Studie 522 wurde gezeigt, dass die pathologische Komplettremission im frühen Stadium des TNBC durch die Kombination von Pembrolizumab und neoadjuvanter Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen neoadjuvanten Chemotherapie signifikant um 13,6 % verbessert wurde [34]. Ein ereignisfreies Überleben in den ersten drei Jahren wurde durch Pembrolizumab um 7,7 % verbessert [35].

Da das TNBC eine hohe Heterogenität aufweist, werden verschiedene Therapieansätze in Studien untersucht. Mögliche Therapieansätze werden beispielsweise im *Review* von Hwang *et al.* [27] dargestellt. Dabei wurden Wirkstoffe in den etablierten klinischen Studien von denen in den präklinischen Studien unterschieden. In den klinischen Studien werden zurzeit neben den PARP-Inhibitoren und PD-(L)1-Inhibitoren verschiedene Inhibitoren gegen die Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*), VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) und FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) evaluiert, die in TNBC stark angereichert sein können [27, 36]. Für den LAR-Subtyp wird die Anwendung von Androgenrezeptor-Inhibitoren getestet [27]. In den präklinischen Studien werden hingegen therapeutische Ansätze wie die Inhibition von Hitzeschockprotein 90 (HSP90) oder die Aktivierung von AMP-abhängiger Kinase (AMPK, Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase) in TNBC untersucht. Während das HSP90 bei der Modulation sämtlicher Signalwege in der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielt [27], könnte die Aktivierung von AMPK durch Phosphorylierung das metastatische Potenzial der zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*) im Blut reduzieren [27, 37]. Darüber hinaus stellen die *murine double minute 2 homolog*-(MDM2-)Inhibitoren einen möglichen neuartigen Ansatz dar [27], die in dieser Arbeit im Fokus stehen werden.

## 1.3 Das Tumorsuppressorgen TP53

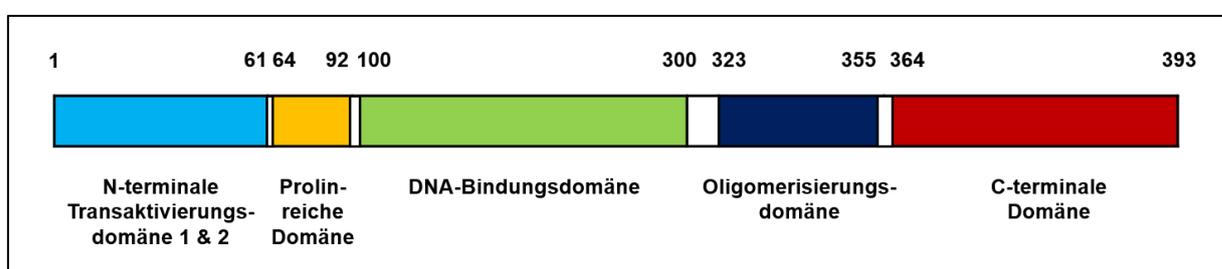
### 1.3.1 Eigenschaften und Funktionen

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist aufgrund seiner Funktion und Bedeutung hinsichtlich der Tumorprävention auch als „Wächter des Genoms“ bekannt [38] und wurde im Jahre 1979 entdeckt [39, 40]. Es befindet sich auf dem Chromosom 17p13.1 [41, 42] und kodiert das Tumorsuppressorprotein p53, bestehend aus 393 Aminosäuren [39], mit einem Molekulargewicht von ca. 53 Kilodalton (kDa) [39, 40]. Es besitzt insgesamt 11 Exons [41, 42].

Der Aufbau des p53 zeichnet sich durch fünf Untereinheiten mit verschiedenen Funktionen aus (Abb. 1) [43]:

1. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne [43], die für die Transaktivierung der p53-Zielgene wichtig ist [43, 44]. Sie unterliegt den posttranslationalen Modifikationen [45].
2. Die prolinreiche Domäne [43].  
Beide genannten Domänen spielen bei der Apoptoseinduktion eine relevante Rolle [43, 46].
3. Die DNA-Bindungsdomäne [43], die die sequenzspezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA) der p53-responsiven Elemente (p53-RE) in den Promotoren der Zielgene erkennt [43, 47, 48].
4. Die Oligomerisierungsdomäne [43], die für die tetramere Konformation und somit adäquate Funktion des p53 essenziell ist [49].
5. Die C-terminale Domäne [43], welche ebenfalls den posttranslationalen Modifikationen unterliegt [45]. Sie kann neben der Stabilisation der Transaktivierungen auch die Aktivität der spezifischen DNA-Bindungen regulieren. Weiterhin wird sie wie andere Domänen für die Apoptoseinduktion benötigt [46].

Darüber hinaus besitzt p53 drei nukleäre Importsignale (*NLS*, *nuclear localisation signal*) [50] und ein Exportsignal (*NES*, *nuclear export signal*) [43], die seinen Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma regulieren.



**Abb. 1: Aufbau des Tumorsuppressorproteins p53.**

Dargestellt ist der Aufbau des Tumorsuppressorproteins p53. Es besteht aus fünf verschiedenen Domänen: N-terminale Transaktivierungsdomäne 1 und 2, prolinreiche Domäne, DNA-Bindungsdomäne, Oligomerisierungsdomäne und C-terminale Domäne. Zudem besitzt p53 drei nukleäre Importsignale [50] und ein Exportsignal [43] (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Abbildung mit PowerPoint erstellt, angelehnt an Koo *et al.* [43].

Reguliert werden seine Aktivität und Stabilisation unter anderem mittels posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung oder Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen [43, 45]. Jedoch ist das Onkoprotein MDM2 der negative Hauptregulator des p53 [38]. Die genaue Regulation durch MDM2 wird im Kapitel 1.5 thematisiert. Das Tumorsuppressorprotein p53 fungiert nicht nur als Transkriptionsfaktor durch seine erhöhte Transkriptionsaktivität seiner Zielgene [38, 51], sondern es kann zudem auch ohne Transkription Zielproteine direkt aktivieren [52, 53]. Viele seiner Zielgene und -proteine lassen sich dabei in den vier Kategorien einordnen: Zellzyklusarrest, Apoptose, DNA-Reparatur zur genetischen Stabilität und Antiangiogenese [51]. Darüber hinaus verfügt p53 über weitere regulatorische Funktionen [39, 54], die hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht näher erwähnt werden. Aktiviert wird p53 durch verschiedene Stressstimuli wie Hypoxie oder DNA-Schäden [55]. Folglich führt Letzteres zu Phosphorylierungen am p53, die durch verschiedene Proteine wie das *ataxia telangiectasia mutated*-(ATM-)Protein, *ataxia telangiectasia and rad3 related*-(ATR-)Protein oder DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) erfolgen können [56-59]. Dadurch steigt die Konzentration des p53 an, sodass seine Aktivität zunimmt [38]. Ebenfalls wird MDM2 phosphoryliert, sodass die Interaktion mit p53 eingeschränkt wird und somit zur Stabilisation des p53 beiträgt [60, 61]. In Abhängigkeit von der Größe des DNA-Schadens wird dabei entweder die Apoptose oder der Zellzyklusarrest zur Reparatur der Schäden eingeleitet, sodass das Zellwachstum inhibiert wird [62, 63]. Bei geringerem DNA-Schaden erfolgt die Induktion des Zellzyklusarrests oder der DNA-Reparaturmechanismen, während beim großen DNA-Schaden die Apoptose eingeleitet wird [62-64]. Bei der Induktion des Zyklusarrests wird das Protein p21 aktiviert [51, 55, 63]. Das Protein p21 ist ein cyclin-abhängiger Kinaseninhibitor, der die Schlüsselregulatoren des Zellzyklus, die cyclin-abhängigen Kinasen, hemmt. Dadurch werden die kritischen Phasen des Zellzyklus wie die Transition von G1- in die S-Phase oder die G2-Phase in die Mitose gehemmt [51]. Während des Zyklusarrests werden DNA-Reparaturmechanismen aktiviert [55, 62, 63]. Zur Induktion einer Apoptose erfolgen unter anderem die Aktivierung des proapoptischen Proteins Bax (*Bcl-2 associated X protein*) und eine gesteigerte Expression von weiteren Proteinen wie PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und Noxa (s. Kap. 1.6.1 zum detaillierten Ablauf der Apoptose) [39, 52, 65, 66]. Auf diese Weise wird das Zellwachstum, aber auch eine mögliche Tumorentstehung, verhindert [51].

### 1.3.2 Bedeutung in der Tumorigenese

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist das häufigste mutierte Gen. In mehr als 50 % der menschlichen Tumoren liegt es mutiert vor [51, 67, 68]. Beim Mammakarzinom ist es bis zu 37 % der Fälle mutiert, in TNBC sogar bis zu 80 % [69]. Klinisch zeigten Mammakarzinom-Patientinnen mit einem mutierten p53 in vielen Studien eine schlechtere Prognose [70], sodass

das mutierte p53 schon seit einiger Zeit als möglicher prognostischer und therapeutischer Biomarker in der Klinik diskutiert wird [68, 71]. Sowohl eine Mutation als auch ein Knockout des TP53 führen zur spontanen Tumorentstehung, wobei in Studien gezeigt wurde, dass Knock-in-Mäuse mit mutiertem p53 mehr Tumorvarianten und/oder mehr Metastasen im Vergleich zu den p53-Knock-Out-Mäusen oder p53<sup>+/-</sup>-Mäusen entwickelten [72-75]. Sie zeigten in Abhängigkeit von der Mutationsstelle auch eine kürzere Überlebenszeit [72]. Eine Mutation erfolgt meistens somatisch [76]. Genetisch kann das defekte TP53 beispielsweise im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms auch vererbt werden [76, 77]. Das Li-Fraumeni-Syndrom beschreibt eine autosomal-dominante p53-Erkrankung, durch die Patientinnen und Patienten im Laufe ihrer Lebenszeit an einem Malignom erkranken. Zu den typischen Malignomen gehören das Mammakarzinom, Sarkome, Leukämien, Hirntumore und Nebennierentumore [77].

Das Tumorsuppressorgen TP53 weist im Gegensatz zu den anderen Genen, bei denen eine Deletion als Gendefekt charakteristisch ist, in ca. 74 % der Fälle eine *Missense*-Mutation in den Tumoren auf [68, 70, 78], die meistens in der DNA-Bindungsdomäne zu finden ist [68, 76, 78]. Folglich führt die Mutation dazu, dass das veränderte Protein p53 nicht mehr an die p53-DNA-Bindungselemente der Zielgene binden kann, sodass es zu Beeinträchtigungen der Transkriptionsaktivitäten des p53 (*loss of function*) führt [51, 68, 79, 80]. Darüber hinaus inhibiert das mutierte p53 durch Heterodimerisierung auch das noch intakte p53 des Wildtyp-p53-Allels (dominant-negativer Effekt) [68, 79, 81]. Ein Drittel der TP53-Mutationen befindet sich in einem Codon der typischen sechs *Hotspots*-Positionen 175, 245, 248, 249, 273 und 282 [67, 68, 76]. Durch eine Mutation entsteht zwar ein *loss of function* des p53, aber gleichzeitig kann das mutierte p53 an neuen Funktionen (*gain of function*) gewinnen [67, 68]. Dabei begünstigen die *gain-of-function*-Mechanismen die Tumorigenese, indem sie die Zellproliferation, metabolische Umprogrammierung zugunsten der Tumorzellen, Metastasenbildung, genomische Instabilität, Ausbau der Tumormikroumgebung und Stammzellcharakteristika fördern [67]. Dazu interagiert das mutierte p53 mit vielen verschiedenen Proteinen. Beispielsweise interagiert es mit dem Transkriptionsfaktor Twist1 [82] und dem negativen Regulator microRNA-130b (RNA = Ribonukleinsäure) des Transkriptionsfaktors ZEB1 (*zinc finger E-Box binding homeobox 1*) [83], die die EMT fördern [67]. Weiterhin erhöht die Mutation die Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika [67, 68, 80]. Zudem liegt in vielen Tumoren, auch in Mammakarzinomzellen [84], eine hohe Akkumulation des mutierten p53 aufgrund der Proteinstabilität in den Zellen vor [67], sodass *gain-of-function*-Aktivitäten dominieren können. Die genannten Folgen zeigen, welche große Auswirkung die Mutation am p53 besitzen kann und wie wichtig es ist, weitere Therapiestrategien zu entwickeln, da bisher noch keine zielgerichtete Therapie in p53-mutierten Tumoren klinisch zugelassen wurde.

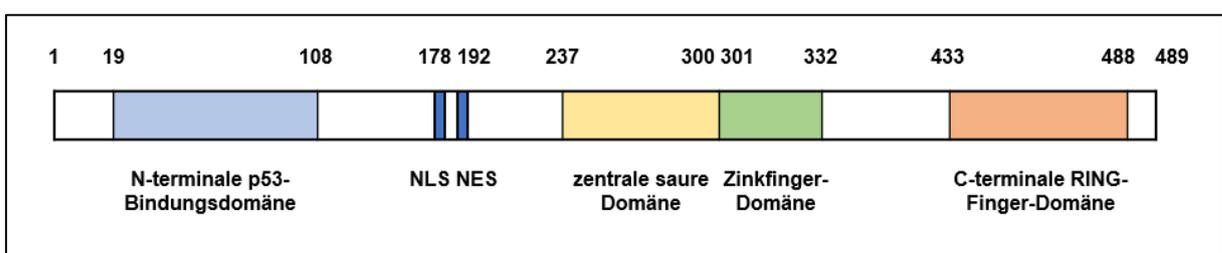
## 1.4 Das Onkogen MDM2

### 1.4.1 Eigenschaften und Funktionen

Das Onkoprotein MDM2 (*murine double minute 2 homolog*) ist der wichtigste negative Regulator des p53 [38] und ist auch unter dem Synonym HDM2 bekannt. MDM2 wurde als amplifiziertes Gen neben dem MDM1 und dem MDM3 in einer spontan transformierten Mauszelllinie (Balb/c 3T3-Fibroblasten) entdeckt. Dabei lagen die drei Gene als kleine gepaarte, azentrometrische, extrachromosomale Chromatinkörperchen, auch als *double minutes* genannt, in zahlreichen Kopien vor [85, 86]. Nach Analyse der Gene wurde festgestellt, dass nur MDM2 nach Transfektion in den Fibroblasten zu einem tumorauslösenden Wachstum führte und somit den Onkogenen zuzuordnen ist [85]. Später wurde MDM2 auch in menschlichen Tumoren identifiziert [87]. Das humane MDM2-Gen befindet sich auf dem Chromosom 12q15 [88] und kodiert ein Protein, bestehend aus 491 Aminosäuren [38, 43], mit einem Molekulargewicht von 90 kDa [89]. Es besteht aus 12 Exons [88], die durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen generieren können [87, 90-93]. In dieser Arbeit wird folglich nur noch von MDM2 gesprochen. Das Onkoprotein MDM2 besteht aus vier Domänen mit verschiedenen Funktionen (Abb. 2) [43, 93]:

1. Die N-terminale p53-Bindungsdomäne [43, 93], welche an die Transaktivierungsdomäne des p53 bindet und dessen Aktivität unterbindet [90].
2. Die zentrale saure Domäne [43, 93].
3. Die Zinkfinger-Domäne, wobei sie und die zentrale saure Domäne mit den ribosomalen Proteinen interagieren [43, 93].
4. Die C-terminale RING-Finger-Domäne (RING = *really interesting new gene*), welche als E3-Ligase zur Ubiquitinierung fungiert [43].

Darüber hinaus besitzt MDM2 nukleäre Import- (NLS, *nuclear localisation signal*) und Exportsignale (NES, *nuclear export signal*), die seinen Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma regulieren, sodass es seinen Funktionen in beiden Kompartimenten nachgehen kann [43, 90, 93].



**Abb. 2: Aufbau des Onkoproteins MDM2.**

Dargestellt ist der Aufbau des Onkoproteins MDM2 (*murine double minute 2 homolog*). Es besteht aus vier verschiedenen Domänen: N-terminale p53-Bindungsdomäne, zentrale saure Domäne, Zinkfingerdomäne und C-terminale RING-Finger-Domäne [43, 93]. Zudem besitzt MDM2 nukleäre Import- und Exportsignale. Abbildung mit Powerpoint erstellt, angelehnt an [43, 93].

Reguliert wird die Transkription des MDM2 über die Promotoren P1 und P2 [43, 90, 93, 94]. Der Promotor P1 befindet sich vor dem Exon 1 des MDM2 und agiert p53-unabhängig [95]. Er ist für die konstitutive und basale Expression der *messenger*-RNA (mRNA) von MDM2 verantwortlich [38, 94]. Der Promotor P2 hingegen befindet sich im Intron 1 und seine Aktivität ist am p53-responsiven Element durch p53 induzierbar [94]. Das P2-Transkript wird im Gegensatz zum P1-Transkript effektiver translatiert [95]. Folglich beschleunigt die induzierte Expression des MDM2 am P2-Promotor den Abbau des p53 [90]. Neben der Interaktion mit p53 tritt MDM2 mit verschiedenen anderen Proteinen in Wechselwirkung, wobei einige exemplarisch hier genannt werden:

Durch die Hemmung des Retinoblastom-Proteins (Rb) oder den Abbau des Inhibitors der cyclin-abhängigen Kinase p21 wird die Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus aufgehoben, was sich verstärkend auf die Zellproliferation auswirkt. Ein weiteres Zielprotein ist das Protein NUMB. Hier fördert MDM2 durch die Ubiquitinierung dessen Abbau, wodurch das Zellschicksal und die Zelldifferenzierung beeinflusst werden [38, 90, 93]. Des Weiteren interagiert MDM2 mit seinem Familienmitglied und Onkogen MDMX (*murine double minute X homolog*) [90, 93], welches später entdeckt wurde und Gegenstand im Kapitel 4.4.5 sein wird [96].

#### 1.4.2 Bedeutung in der Tumorigenese

Im Gegensatz zum p53 ist MDM2 in den Tumoren selten mutiert (< 7 %). Im Mammakarzinom liegt die Mutation etwas unter dem Durchschnitt (5,9 %) [97]. In den Tumoren liegt meistens eine Amplifikation (gezielte Vermehrung der DNA-Abschnitte) oder einer Überexpression (gesteigerte Proteinproduktion) des MDM2 vor [89, 97], die neben dem Mammakarzinom in den Weichteiltumoren, Lungenkarzinomen oder Gehirntumoren vorkommen [97]. Die Überexpression des MDM2 liegt in den einzelnen Mammakarzinomsubtypen durchschnittlich höher. Diese ist beim Luminal-B- (< 31 %) und HER2+-Typ (< 30 %) am höchsten zu finden. Beim TNBC beträgt die Überexpression unter 14 % [69, 98]. Die Prognose ist von der Tumorentität abhängig. Beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom gilt beispielsweise eine Überexpression als prognostisch günstiger Marker, während sie bei der akuten lymphatischen Leukämie und bei den Weichteilsarkomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [99]. Die erhöhte Expression des MDM2 stellt ebenfalls einen prognostisch schlechten Marker beim Mammakarzinom dar [100] und geht mit einer Reduktion der Überlebenszeit einher [100, 101]. In Malignomen, vor allem in Sarkomen, wurde gezeigt, dass die Überexpression des MDM2 p53 inaktiviert, sodass sie wie die p53-Mutation die Aktivität des p53 unterdrückt [97, 102]. Eine Überexpression des MDM2 kann neben seiner Inaktivierung des p53 zur p53-unabhängigen Tumorigenese beitragen [103]. Zudem geht eine Überexpression mit einer Chemo- und Strahlenresistenz in verschiedenen Malignomen einher [89].

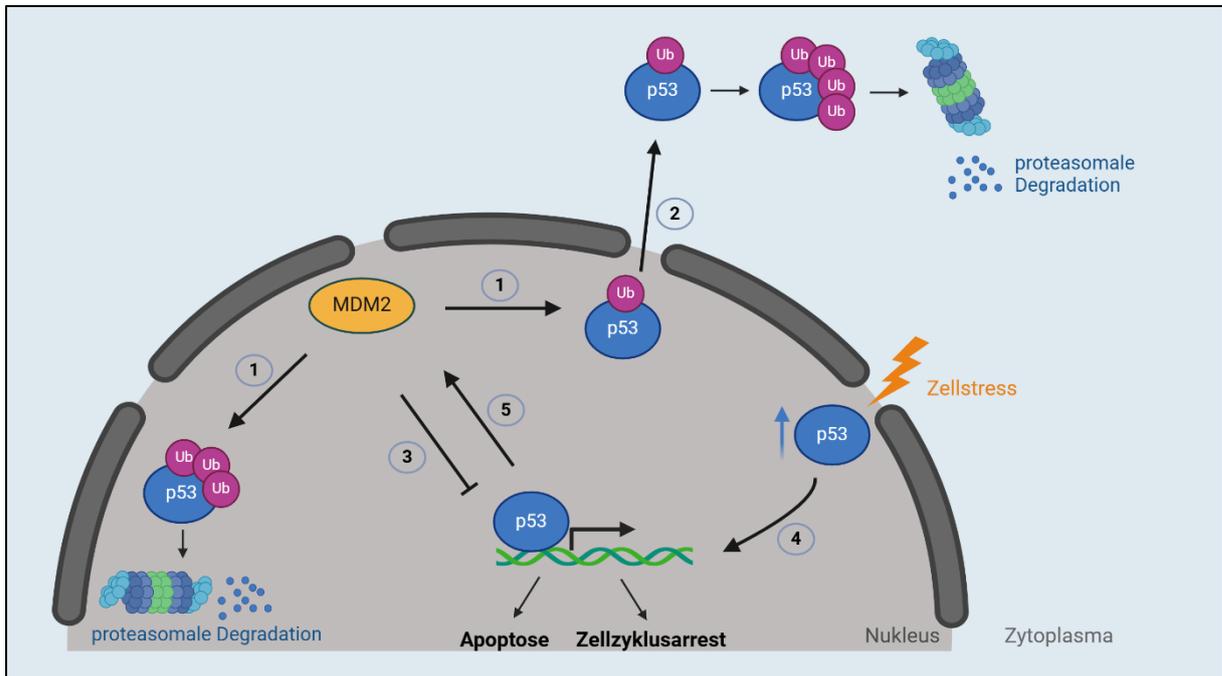
## 1.5 Die p53/MDM2-Interaktion

Die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen MDM2 und p53 bei der Regulation der Zellhomöostase wurde in mehreren Studien verdeutlicht. Ein Knockout des MDM2 führt zu einer embryonalen Letalität in den Mäusen [104-106], die nur mit einer gleichzeitigen p53-Deletion gerettet werden können [106]. Aus diesem Grund wird die Aktivität des p53 insbesondere durch seinen Gegenspieler MDM2 streng reguliert [38]. Für eine erfolgreiche Interaktion dienen sowohl die hydrophobe Tasche des MDM2 als auch die  $\alpha$ -helikale Konformation der Transaktivierungsdomäne von p53 als Interaktionsflächen [107]. Über eine regulatorische Rückkopplungsschleife (*autoregulatory feedback loop*) können beide Interaktoren sich gegenseitig regulieren, sodass ein Gleichgewicht zwischen den beiden Gegenspielern aufrechterhalten wird (Abb. 3) [108].

In Abwesenheit von Stress wird die p53-Konzentration in den Zellen gering gehalten [38], da hohe Konzentrationen die Apoptose induzieren [51, 64] und das normale Zellwachstum und die Entwicklung schädlich beeinflussen können [38]. Das Tumorsuppressorprotein p53 besitzt eine Halbwertszeit zwischen 5 und 40 Minuten [54, 59, 109, 110]. Verschiedene Stressfaktoren wie DNA-Schäden [55] führen zur Aktivierung und zur Erhöhung der Konzentration des p53 [38, 51, 111], sodass dieses die Signalwege seiner Zielgene inkl. MDM2 initiieren kann. So bindet p53 an den P2-Promotor des MDM2 [94, 112], sodass MDM2 vermehrt transkribiert wird [108]. Folglich unterbindet MDM2 über mehrere Wege die Funktion des p53 (Abb. 3). MDM2 interagiert direkt mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des p53, sodass dieses die Transkription seiner nachfolgenden Zielgene nicht mehr aktivieren kann. Dazu gehört auch die Transkription des MDM2 [108]. Darüber hinaus fördert MDM2 als E3-Ligase über Ubiquitinierung sowohl seine eigene proteasomale Degradation als auch die von p53 [113]. In Abhängigkeit von der Aktivität des MDM2 wird p53 entweder mono- oder polyubiquitiniert. Bei einer geringen Konzentration des MDM2 erfolgt eine Monoubiquitinierung des p53, bei einer hohen Konzentration eine Polyubiquitinierung [114]. MDM2 fördert den nukleären Export des monoubiquitinierten p53 [114]. Da eine proteasomale Degradation über eine Monoubiquitinierung nicht erfolgen kann [115], erfolgt die Polyubiquitinierung durch die Komplexbildung mit MDM2 und der E4-Ubiquitinligase p300/CBP (*creb binding protein*) im Zytoplasma [116, 117]. Anschließend wird p53 vom Proteasom abgebaut [118]. Das im Zellkern polyubiquitinierte p53 hingegen kann nicht aus dem Zellkern exportiert werden und wird stattdessen im Zellkern abgebaut [114]. Auf diesen verschiedenen Wegen wird p53 wieder in seine Ausgangskonzentration gebracht.

Eine Veränderung in einem der beiden Proteine p53 und MDM2 (s. Kap. 1.3.2 und 1.4.2), wie es in vielen Tumoren der Fall ist, führt nicht nur zu einer Dysregulation der Interaktion, sondern trägt auch zur malignen Transformation der Zellen und somit zur Tumorigenese bei [72, 103, 119]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung des mutierten p53

durch MDM2 weniger effizienter abläuft. Viel mehr sind andere E3-Ubiquitin-Ligasen dafür verantwortlich [120]. Jedoch ist das mutierte p53 nicht in der Lage, die Transkription seiner Zielgene wie des MDM2 zu aktivieren [51, 61, 68, 79].



**Abb. 3: Die Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 über das Onkoprotein MDM2.**

Die Abbildung zeigt die Interaktion zwischen MDM2 und p53. Beide Gegenspieler können sich gegenseitig kontrollieren [108]. Dabei kann MDM2 auf verschiedene Wege p53 kontrollieren. Es kann zum einen den proteasomalen Abbau von p53 fördern, indem es p53 ubiquitiniert (Ub) (1). Bei einer Polyubiquitinierung des p53 wird es im Zellkern abgebaut, während der nukleäre Export des monoubiquitinierten p53 durch MDM2 gefördert wird (2) [114]. Im Zytoplasma erfolgen die Polyubiquitinierung und der nachfolgende proteasomale Abbau [116, 117]. Darüber hinaus kann MDM2 p53 direkt hemmen (3) [108]. Bei Zellstress steigt die p53-Konzentration an, sodass die Transkriptionsaktivität des p53 gesteigert wird (4) [38, 51, 111]. MDM2 wird dabei vermehrt transkribiert (5), sodass es wiederum die p53-Konzentration steuern kann. Daraus ergibt sich die autoregulatorische Rückkopplungsschleife [108].

Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt [121], angelehnt an Miles *et al.* [111].

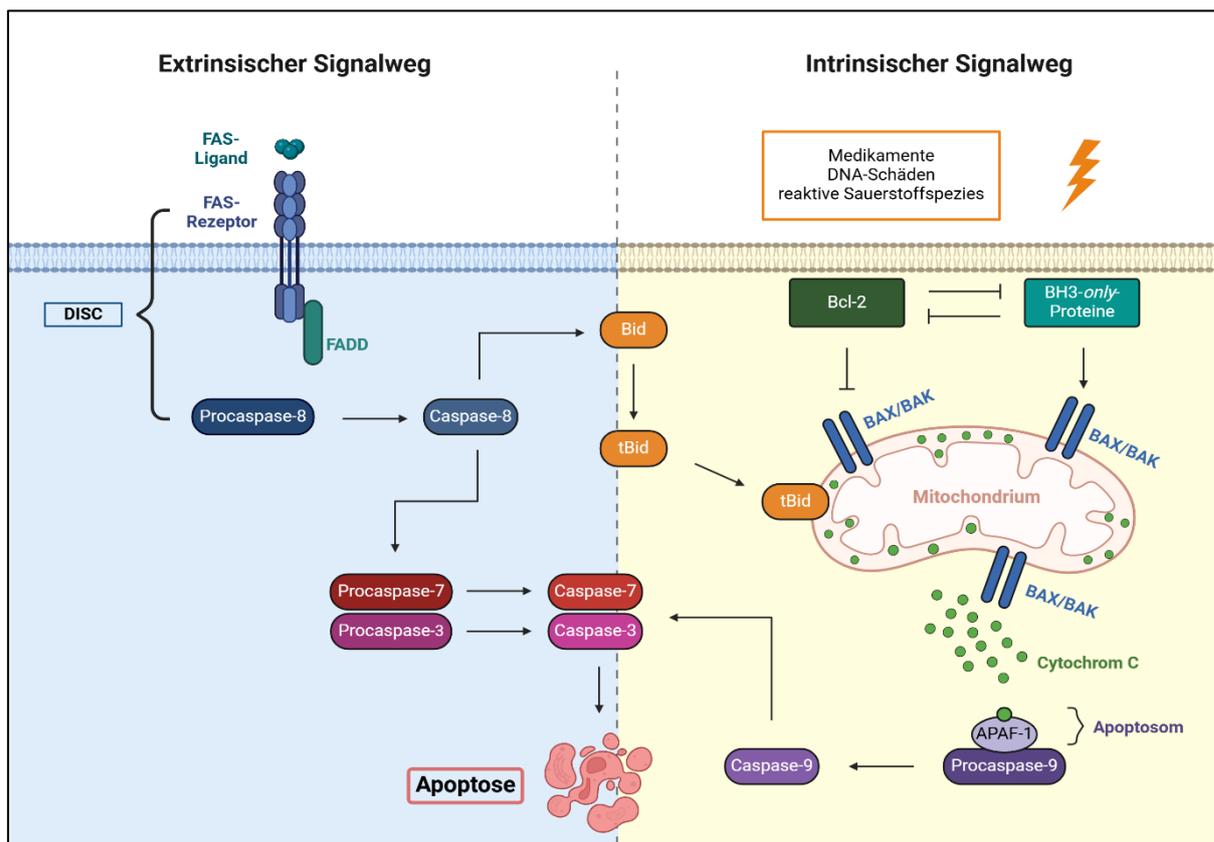
## 1.6 Die Apoptose

### 1.6.1 Ablauf der Apoptose

Unter der Apoptose versteht man eine Form des programmierten Zelltods. Bei der Apoptose sterben geschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen kontrolliert ab. Sie spielt in vielen physiologischen Prozessen wie bei der Entwicklung oder der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase eine wichtige Rolle. Dabei wird zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg der Apoptose unterschieden (Abb. 4) [122, 123].

Die Induktion des extrinsischen Signalwegs erfolgt durch die Bindung der Todesliganden wie zum Beispiel Tumornekrosefaktoren (TNF) oder Fas-Liganden an deren korrespondierenden Todesrezeptoren der Zelle. Die Todesrezeptoren bilden eine Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie [122-125]. Da der extrinsische Signalweg über den Fas-Liganden am meisten untersucht wurde [124], wird er im Folgenden als Modell herangezogen.

Über die Aktivierung des Fas-Rezeptors (auch als CD95 [*cluster of differentiation*] oder DR2 [*death receptor 2*] bezeichnet) durch die trimeren Fas-Liganden erfolgt dessen Trimerisierung [122, 124, 125]. Über die Todesdomäne (*death domain*), die intrazellulär ein Bestandteil der Todesrezeptoren ist, wird das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*) rekrutiert [122-125]. Neben der Todesdomäne besitzt FADD eine Todeseffektordomäne (*death effector domain*), über die die Rekrutierung mehrerer Procaspase-8-Moleküle erfolgt [122, 123]. Dabei entsteht ein Multiproteinkomplex, welcher auch als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichnet wird [122-125]. Am DISC erfolgt eine Dimerisierung von zwei Procaspase-8-Molekülen und deren autokatalytische Spaltung [122, 125]. Dadurch wird die Caspase-8 aktiviert, die wiederum die Effektorprocaspasen -3, -6 und -7 durch Spaltung aktiviert. Daraufhin wird die Apoptose induziert [122-125]. In einigen Zellen ist die Apoptoseinduktion über den extrinsischen Signalweg aufgrund der schwachen DISC-Bildung nicht ausreichend [126], sodass der intrinsische Signalweg zusätzlich aktiviert wird, indem Caspase-8 das BH3-only-Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) der Bcl-2-Familie zum *truncated* Bid (tBid) spaltet. Das Protein tBid leitet schließlich die intrinsische Apoptose ein [122, 124, 126, 127].



**Abb. 4: Ablauf der Apoptose.**

Die Abbildung stellt links den extrinsischen und rechts den intrinsischen Signalweg der Apoptose vereinfacht dar. Bei dem extrinsischen Signalweg binden Fas-Liganden als Trimere an ihren Fas-Rezeptor, woraufhin das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*) sich an die Todesdomäne der Rezeptoren bindet [122, 124, 125]. Als Nächstes erfolgt die Rekrutierung der Procaspase-8 [122, 123]. Dadurch entsteht der Multiproteinkomplex DISC (*death inducing signaling complex*). Anschließend erfolgt die Aktivierung der Caspase-8, welche die Effektorcaspasen -3 und -7 durch Spaltung wiederum aktiviert, sodass die Apoptose eingeleitet wird [122-125]. Ist die DISC-Bildung zu schwach [126], wird zusätzlich der intrinsische Signalweg über die Spaltung des BH3-only-Proteins Bid zum *truncated* Bid (tBid) durch Caspase-8 aktiviert [122,

124, 126, 127]. Der intrinsische Signalweg wird durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel DNA-Schäden ausgelöst [123, 125]. Folglich führt es zum Anstieg der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, die streng über die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert wird [122, 124, 125]. Bei Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax und Bak bilden diese an der äußeren Mitochondrienmembran Poren, sodass Cytochrom c freigesetzt wird [124, 125]. Cytochrom c bildet mit APAF-1 zusammen das Apoptosom, das daraufhin die Procaspase-9 rekrutiert. [122-124]. Daraufhin erfolgt die Aktivierung der Caspase-9, welche die Effektorcaspasen-3 und -7 durch Spaltung wiederum aktiviert, sodass die Apoptose eingeleitet wird [122, 124].

Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt [128], angelehnt an [129, 130].

Während der extrinsische Signalweg durch verschiedene Stimuli wie zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten, Makrophagen oder natürliche Killerzellen eingeleitet wird, wird der intrinsische Signalweg durch andere Stimuli wie reaktive Sauerstoffspezies, DNA-Schäden oder Medikamente induziert [123, 125]. Dadurch erfolgt eine Steigerung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, welche über die Interaktion zwischen den pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*) streng reguliert wird [122, 124, 125]. Basierend auf ihrem Aufbau und ihrer Funktion lassen sich die Proteine in drei Gruppen einteilen: In der ersten Gruppe befinden sich die antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), die vier *Bcl-2 homology*-(BH-)Domänen BH1 – BH4 aufweisen [124]. Sie unterdrücken die anderen beiden Gruppen und somit auch die Apoptose [124, 125]. In der zweiten Gruppe befinden sich die proapoptotischen Proteine wie Bax und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*), die nur die ersten drei BH-Domänen im Vergleich zu der ersten Gruppe aufweisen [124]. Sie werden auch als Effektorproteine bezeichnet und können durch ihre Oligomerisierung an der äußeren Mitochondrienmembran Poren bilden, sodass verschiedene Proteine ins Zytosol freigesetzt werden [124, 125]. In der dritten Gruppe befinden sich proapoptotische Proteine wie Noxa, PUMA, Bid und Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*), auch als BH3-only-Proteine genannt, da sie nur die BH3 als Domäne aufweisen [124]. Sie werden auch als Aktivatoren oder *sensitizers* bezeichnet und können entweder die zweite Gruppe direkt oder indirekt aktivieren oder die erste Gruppe inhibieren [124, 125]. Bei Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax im Zytosol transloziert dieses an die äußere Membran [125]. Hier erfolgt eine Oligomerisierung des Proteins. Dabei entstehen Poren in der äußeren Membran, sodass die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran ansteigt [124, 125]. Proteine wie Cytochrom c oder Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) werden aus dem mitochondrialen Zwischenmembranraum freigesetzt. Cytochrom c bindet an das Protein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und bildet mit diesem zusammen das Apoptosom, das daraufhin die Procaspase-9 rekrutiert [122-125]. Die Oligomerisierung der Procaspase-9 und die nachfolgende autokatalytische Spaltung führen zu der aktiven Form der Caspase-9 [122, 124]. Caspase-9 kann daraufhin die Effektorcaspasen-3 und -7 durch Spaltung aktivieren [122, 124, 125], sodass die Apoptose eingeleitet wird. Auch Smac kann die Apoptose induzieren oder verstärken, indem es mit den Proteinen der *inhibitor of apoptosis protein*-(IAP-)Familie interagiert, die die Caspasen-3 und -9 hemmen [122, 124, 125].

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, kann p53 auch die Apoptose induzieren [51]. Bei Aktivierung kann es sowohl den extrinsischen Signalweg über die erhöhte Expression des Fas-Rezeptors [131, 132] als auch den intrinsischen Signalweg durch Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax einleiten [52]. Zudem kann es als Transkriptionsfaktor die Expression der BH3-*only*-Proteine Noxa oder PUMA erhöhen [65, 66].

### 1.6.2 Induktion der Apoptose als therapeutischer Ansatz in Krebszellen

Eine Störung in der Apoptoseregulation führt zum unkontrollierten Zellwachstum und zur Ansammlung genetischer Defekte und trägt somit zur Tumorigenese bei. Krebszellen sind in der Lage, die Apoptose zu umgehen. Diese Fähigkeit gehört zu den essenziellen Merkmalen der Krebszellen (*hallmarks of cancer*) [62]. Die Ursache dafür beruht auf verschiedene Dysregulationsmechanismen der Apoptose [133]. Gleichzeitig ergeben sich daraus neue verschiedene therapeutische Ansätze zur Induktion der Apoptose. Im Review von Wong *et al.* lassen sich die Dysregulationsmechanismen in fünf Kategorien einteilen, woraus sich wiederum entsprechende Krebstherapieansätze ergeben [133]:

1. Gestörtes Gleichgewicht zwischen den proapoptotischen und den antiapoptotischen Proteinen [133].

Dabei ist nicht die Quantität der Expression der proapoptotischen oder antiapoptotischen Proteine essenziell, sondern das relative Verhältnis zueinander. Somit lässt sich die Dysregulation der Apoptose in Tumoren entweder auf eine reduzierte Expression der proapoptotischen Proteine oder auf eine verstärkte Expression der antiapoptotischen Proteine oder sogar auf eine Kombination von beiden zurückführen [133]. Entscheidend ist unter anderem das Verhältnis zwischen Bax und Bcl-2 („Bax/Bcl-2-Ratio“). Dieses Verhältnis bestimmt nicht nur das Überleben der Zelle, sondern auch die Sensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion durch externe Stimuli wie Hypoxie, Bestrahlung oder Chemotherapeutika in den Zellen [134, 135]. Oltvai *et al.* beobachteten erstmalig die Interaktion zwischen Bax und Bcl-2, dessen Wechselwirkung entscheidend für das Zellschicksal ist [134]. Dabei ist Bax nicht nur in der Lage, mit sich selbst zu dimerisieren, sondern kann mit Bcl-2 ein Heterodimer bilden. Eine Überexpression des Bax führt zur Homodimerisierung und zur beschleunigten Apoptose, während eine Überexpression des Bcl-2 durch die Dimerisierung mit Bax die Apoptose verhindert [134]. In einem weiteren Versuch von Oltvai *et al.* ließen sich die Folgen des veränderten Gleichgewichtes beobachten. Trotz des Interleukin-3-Entzugs lebten die stärker Bcl-2-exprimierten Zellklone der Interleukin-3-abhängigen hämatopoetischen Zelllinie FL5.12 um eine Woche länger als der Zellklon mit der geringeren Bcl-2-Expression [134]. Folglich charakterisiert die Bax/Bcl-2-Ratio die Sensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion durch externe Stimuli in den Zellen [134]. In einer anderen Arbeit von Raisova *et al.* wurde beobachtet,

dass Tumorzellen mit einer geringen Bax/Bcl-2-Ratio resistenter gegenüber apoptoseinduzierenden Stimuli waren, während Tumorzellen bei einer erhöhten Ratio eher in Apoptose gingen [136]. Basierend auf den Erkenntnissen ergibt sich das Ziel, weiterhin Wirkstoffe zu identifizieren und zu entwickeln, die das physiologische Bax/Bcl-2-Gleichgewicht wiederherstellen und/oder die Sensitivität gegenüber der Apoptose erhöhen können. Beispielsweise machten sich Akhtar *et al.* bei der Beurteilung des apoptoseinduzierenden Potenzials der natürlichen Aglykone, die in vielen Gemüsesorten zu finden sind, die Bestimmung der Bax/Bcl-2-Ratio zunutze [137].

Aktuell gehören jedoch die Bcl-2-Inhibitoren zu den Vorreitern bei der Entwicklung von apoptoseinduzierenden Substanzen [138]. Dazu gehört insbesondere das BH3-Mimetikum und gleichzeitig selektiver Bcl-2-Inhibitor Venetoclax, auch als ABT-199 bezeichnet [139, 140]. Durch die Inhibition des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 führt der Wirkstoff zur Aktivierung der proapoptotischen Proteine und somit zur Apoptoseinduktion in den Bcl-2-überexprimierten Tumoren [139, 141].

## 2. Defekte oder Mutationen im TP53 [133].

Wie schon in den vorherigen Kapiteln erwähnt, ist die Interaktion zwischen MDM2 und p53 bei der Zellhomöostase essenziell [38]. Eine Mutation des p53 oder eine Überexpression des MDM2 in den Tumoren führt zur Inaktivierung des p53, sodass unter anderem die Apoptose oder die DNA-Reparatur durch p53 nicht erfolgen kann [68, 97, 103]. Folglich können MDM2-Inhibitoren (s. Kap. 1.7.2) in Tumoren mit einem p53-Wildtyp eingesetzt werden, die p53 wieder aktivieren [142]. Auch die Wiederherstellung der p53-Wildtyp-Konformation in p53-mutierten Tumoren durch p53-reaktivierende antitumorale Substanzen wie Prima-1 (s. Kap. 4.4.4) stellt eine attraktive Therapiestrategie dar [143].

## 3. Erhöhte Expression der IAP-Familie in Tumoren [133].

IAP können physiologisch die Caspasen inhibieren oder zum Abbau fördern, sodass die Caspasenaktivität unterbunden wird. Bis heute wurden acht IAP wie zum Beispiel Survivin und XIAP (*X-linked IAP*) identifiziert [133]. In vielen Tumoren wurde beispielsweise eine Überexpression des IAP Survivin beobachtet, sodass es ein potenzieller pharmakologischer Angriffspunkt darstellt [133].

LY2181308 ist ein Survivin-Inhibitor und Antisense-Nukleotid, der präklinisch in verschiedenen Tumoren die Genexpression des Survivin hemmt [144]. Klinisch zeigte er jedoch in verschiedenen Tumoren wie im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom keinen Benefit [138, 145]. Weitere klinisch getestete IAP-Inhibitoren sind die *SMAC mimetics*, die das Protein SMAC aus dem intrinsischen Signalweg imitieren [138].

## 4. Reduzierte Funktion einer Caspase [133].

Devarajan *et al.* konnten keine oder wenig mRNA-Expression der Caspase-3 in den kommerziell erhältlichen RNA-Proben der Mamma-, Ovar- und Zervixkarzinome

bestimmen [146]. Auch in den meisten Fällen der untersuchten Mammakarzinom-Patientinnen lag keine Expression vor [146]. Darüber hinaus konnte in der Studie eine Verbesserung der Apoptosesensitivität in den Caspase-3-defizienten MCF-7-Brustkrebszellen durch Doxorubicin und andere apoptoseinduzierende Stimuli beobachtet werden, nachdem die Caspase-3-Expression wiederhergestellt wurde. Folglich zeigten diese Ergebnisse die Relevanz der Expression der Caspase-3 [146]. Eine reduzierte Aktivität von mehreren Caspasen ist ebenfalls möglich und könnte zur Tumorigenese beitragen [133]. Die Aktivität der Caspasen kann entweder über eine Caspase-basierte Gentherapie oder über Caspasenaktivatoren durch spezifische Peptide, die zu den *small molecules* gehören, verbessert werden [133].

#### 5. Gestörter Signalweg des Todesrezeptors [133].

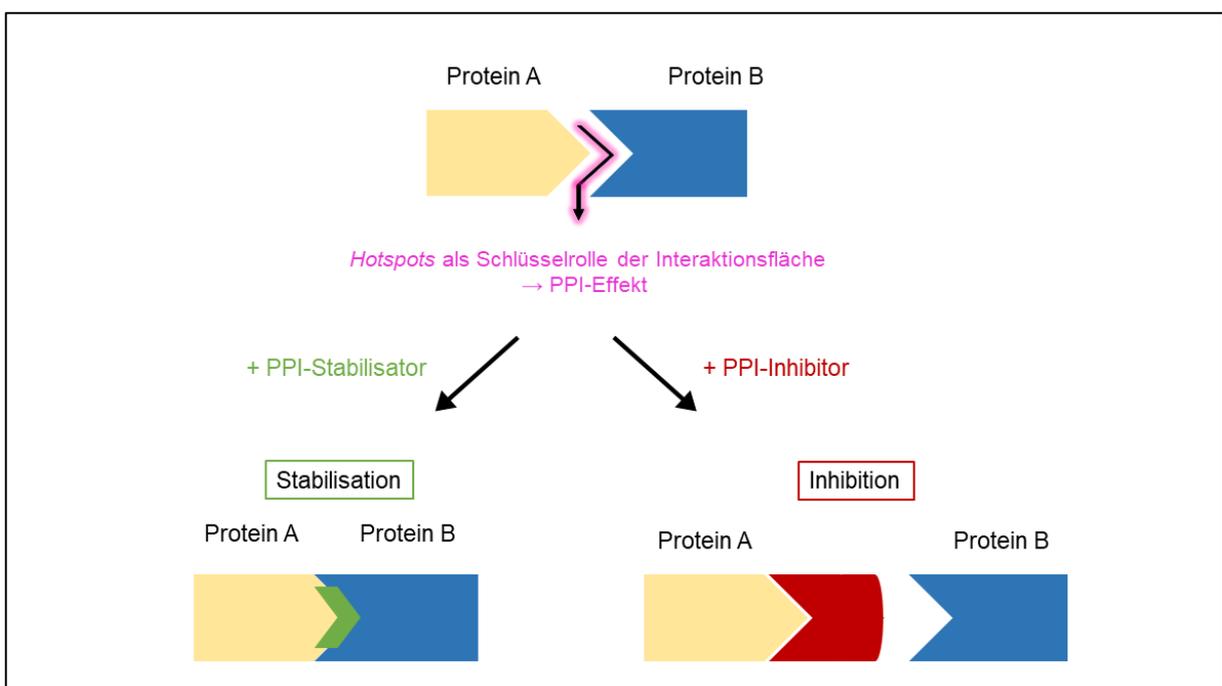
Zu den möglichen Ursachen dieses gestörten Signalwegs gehören die mangelnde Ausschüttung der Liganden der Todesrezeptoren, die herunterregulierte Expression oder Defekte der Todesrezeptoren an den Zelloberflächen und die Überexpression sogenannter Fängerrezeptoren (*decoy receptors*). Liganden können neben den korrespondierenden Rezeptoren auch an diese Fängerrezeptoren binden, die allerdings keine apoptoseinduzierenden Signalwege auslösen [133]. In vielen Tumoren befinden sich an der Zelloberfläche vermehrt *TNF-related apoptosis inducing ligand*-(TRAIL-)Rezeptoren [138], die ebenfalls zu der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören [125]. Durch die Erhöhung der Konzentration von TRAIL besteht eine therapeutische Möglichkeit, die TRAIL-Rezeptoren zu aktivieren [138]. TRAIL induziert in Krebszellen eine Apoptose, ohne die gesunden Zellen zu beeinträchtigen [125, 138]. Einer der dazu am aktuellsten untersuchten Wirkstoffe ist ONC201 (TIC10) [138]. ONC201 ist ein oral wirkender TRAIL-induzierender Wirkstoff mit einer folglich positiven Apoptoseinduktion [147] und wird zurzeit in einigen soliden und hämatologischen Tumoren klinisch getestet [138].

Darüber hinaus bestehen weitere Dysregulationsmechanismen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht erwähnt werden. Als weitere apoptoseinduzierende Substanzen dienen sowohl die Strahlentherapie als auch die Chemotherapie, die oft mit einer hohen Resistenzentwicklung einhergehen [148]. Da sie auch nicht gegen tumorspezifische Strukturen wirken, ist es wichtig, neue und genaue Zielstrukturen zu identifizieren und neue spezifische Therapiestrategien hinsichtlich der Apoptoseinduktion zu entwickeln oder zu optimieren.

## 1.7 Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren

### 1.7.1 Definition und Rolle in der therapeutischen Anwendung

Bei der Regulation und Beeinflussung der biologischen Prozesse in den Zellen spielen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, auch als Protein-Protein-Interaktionen (PPI) bezeichnet, eine essenzielle Rolle. Zu diesen Prozessen gehören beispielsweise die Signaltransduktionen, die Zellproliferation und die Apoptose [149]. Viele menschliche Erkrankungen lassen sich auf fehlerhafte PPI zurückführen [149, 150], sodass die Beeinflussung der fehlerhaften PPI und somit der nachfolgenden Prozesse durch sogenannte PPI-Modulatoren einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellt. Dabei imitieren PPI-Modulatoren spezifische und essenzielle Strukturen der Interaktionsfläche zwischen den Proteinen, die auch als *hotspots* bezeichnet werden [151], sodass die Interaktion folglich gehemmt oder stabilisiert wird (Abb. 5) [152].



**Abb. 5: Die Wirkungsweise der Protein-Protein-Interaktionsmodulatoren.**

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) können durch einen synthetischen PPI-Stabilisator gefördert oder durch einen synthetischen PPI-Inhibitor gehemmt werden [152]. Abbildung mit PowerPoint erstellt, angelehnt an Petta *et al.* [152].

PPI unterscheiden sich jedoch von den Protein-Ligand-Interaktionen, beispielsweise von den Enzymen und ihren Substraten [153]. Im Gegensatz zu diesen besitzen sie keine Bindungstaschen und weisen große und flache Interaktionsflächen auf [152-154], weshalb die Entwicklung der PPI-Modulatoren zur genauen Adressierung der Zielproteine eine große Herausforderung darstellt [149]. Zurzeit werden dennoch viele solcher Wirkstoffe entwickelt.

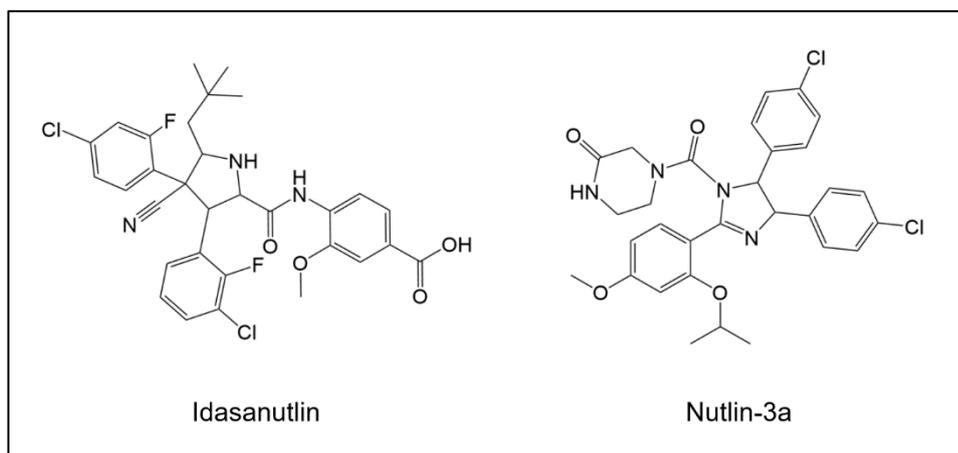
Zu den Zielproteinen aktueller PPI-Inhibitoren gehören insbesondere die Proteine der Apoptoseregulation [154]. Ein wichtiger PPI-Inhibitor, der bereits zur klinischen Anwendung von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA)

zugelassen wurde, ist der bereits genannte Wirkstoff Venetoclax [155, 156]. Venetoclax ist der erste zugelassene, selektive Bcl-2-Inhibitor und ein BH3-Mimetikum [139, 157]. Als verbesserter Nachfolger des Navitoclax (ABT-263) [139] wird er seit Kurzem in den hämatologischen Krankheitsbildern der akuten myeloischen Leukämie und der chronischen lymphatischen Leukämie als Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt [155]. Die Wirkung des Venetoclax besteht wie bei Navitoclax darin, das Protein Bcl-2 zu hemmen [139, 141], das in den erwähnten Krankheitsbildern überexprimiert ist (vgl. Kap. 1.6.2) [139, 157-160]. Durch die Inhibition des Bcl-2 führt es zur Aktivierung der proapoptotischen Proteine und zur Apoptoseinduktion in den Tumorzellen [141]. Aktuell wird Venetoclax in vielen Studien untersucht [138]. Präklinisch zeigte Venetoclax sogar in einer TNBC-Zelllinie antitumorale Aktivitäten [140]. Diese vielversprechenden Ergebnisse zeigen das Potenzial der PPI-Inhibitoren als therapeutischen Ansatz in malignen Tumoren.

### 1.7.2 MDM2-Inhibitoren und deren Bedeutung in der Tumorthherapie

Neben dem Eingriff in die Proteininteraktionen der Bcl-2-Familie durch PPI-Inhibitoren stellt die Inhibition der Interaktion zwischen MDM2 und p53 in den Tumorzellen einen attraktiven therapeutischen Angriffspunkt zur Beeinflussung der Apoptoseregulation dar. Ein Vorteil der MDM2-Inhibitoren liegt in den nicht genotoxischen Eigenschaften [142]. Da es in der Tumorthherapie wichtig ist, die genotoxischen Nebenwirkungen der Chemotherapeutika zu reduzieren [161], könnte die Kombinationstherapie mit den MDM2-Inhibitoren eine essenzielle Ergänzung der bisherigen therapeutischen Möglichkeiten darstellen. Der bis heute in der präklinischen Forschung am meisten untersuchte MDM2-Inhibitor ist Nutlin-3a, der von Vassilev *et al.* im Jahre 2004 entwickelt und nach dem Ursprungsort Nutley in den Vereinigten Staaten benannt wurde (Abb. 6). Nutlin-3a ist ein Derivat der cis-Imidazole und imitiert die Interaktionsoberfläche des p53 [162]. Zu den *hotspots* der Interaktionsoberfläche zählen die Aminosäuren Phenylalanin 19 (Phe<sup>19</sup>), Tryptophan 23 (Trp<sup>23</sup>) und Leucin 26 (Leu<sup>26</sup>), die Teile der  $\alpha$ -helikalen Konformation des p53 bilden [107]. Darüber wird die Interaktion zwischen p53 und MDM2 inhibiert und eine Apoptose über die Aktivierung des p53-Signalwegs induziert [162]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des p53 neben der Apoptose zum Zellzyklusarrest und zur Tumorstillung in den mit Osteosarkomzellen injizierten *Xenograft*-Mäusen führte. Dabei konnten *in vivo* weder ein Gewichtsverlust noch größere pathologische Auffälligkeiten beobachtet werden [162]. Aufgrund der ungünstigen pharmakologischen Eigenschaften von Nutlin-3a wurde der Wirkstoff nicht in klinischen Studien weiter validiert [163]. Aus diesem Grund wurden im Laufe der Zeit weitere MDM2-Inhibitoren entwickelt. Aktuell ist Idasanutlin (RG7388) als zweite Generation der klinischen MDM2-Inhibitoren [164] der in der Forschung am weitesten untersuchte MDM2-Inhibitor (Abb. 6). Bis heute laufen verschiedene Studien mit diesem

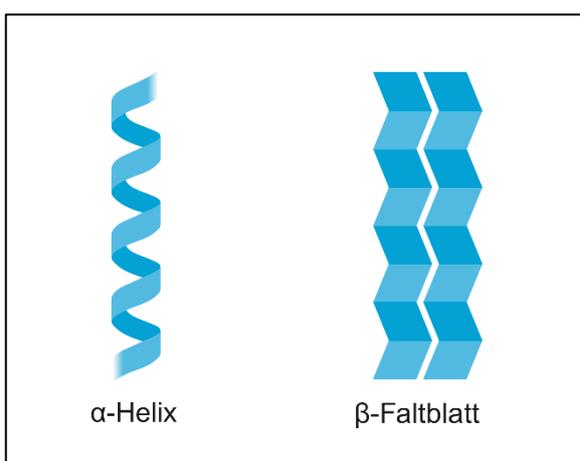
Inhibitor in unterschiedlichen Tumorentitäten, vor allem in hämatologischen und soliden Tumoren [142]. Idasanutlin erreichte erfolgreich die klinische Phase III und wurde mit dem Zytostatikum Cytarabin bei Patienten mit einer rezidivierenden oder refraktären akuten myeloischen Leukämie untersucht. Jedoch konnte kein Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der kompletten Remission beobachtet werden [165]. Eine Anwendung mit anderen Wirkstoffen oder in früheren klinischen Stadien wird diskutiert. Dieses Ergebnis zeigt dennoch die Notwendigkeit, weiterhin effizientere MDM2-Inhibitoren zu entwickeln. Zurzeit werden aktuell neun verschiedene MDM2-Inhibitoren in klinischen Studien evaluiert [61].



**Abb. 6: Strukturformel der MDM2-Inhibitoren Idasanutlin und Nutlin-3a.**  
Abbildung mit ChemDraw erstellt, in Anlehnung an [162, 164].

### 1.7.3 $\alpha$ -Helix-Mimetika

Proteine liegen in verschiedenen Strukturebenen vor. Dabei unterscheidet man zwischen einer Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Unter der Primärstruktur versteht man die



**Abb. 7: Beispielhafte Sekundärstrukturelemente.**

Die Abbildung zeigt eine  $\alpha$ -Helix-Struktur und eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur als beispielhafte Sekundärstrukturelemente.

Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt [166].

Reihenfolge der Aminosäuren (Aminosäuresequenz). Die Sekundärstruktur wird als lokale räumliche Anordnung der Aminosäuren aus der Polypeptidhauptkette bezeichnet und entsteht durch die Wechselwirkung der Aminosäurenreste der Hauptkette miteinander. Zu den wichtigsten Sekundärstrukturelementen gehören sowohl die  $\alpha$ -Helices als auch die  $\beta$ -Faltblätter (Abb. 7) [167]. Die Tertiärstruktur entsteht

durch die globale räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente. Die Quartärstruktur besteht aus mehreren Polypeptidketten, die einen Proteinkomplex bilden [167].

Im Jahre 1951 wurde erstmalig die  $\alpha$ -Helix als Sekundärstruktur von Pauling *et al.* beschrieben [168]. Mehr als 30 % der Proteine bestehen aus  $\alpha$ -Helices [154, 169]. Mehr als 60 % der PPI erfolgen über  $\alpha$ -Helix-Strukturen [154, 170], sodass der Eingriff in die PPI durch  $\alpha$ -Helix-Mimetika eine wichtige therapeutische Strategie in der antitumoralen Therapie darstellt. Unter  $\alpha$ -Helix-Mimetika versteht man kleine synthetische Moleküle, die die essenziellen Seitenketten der  $\alpha$ -Helix strukturell und funktionell imitieren können [149].

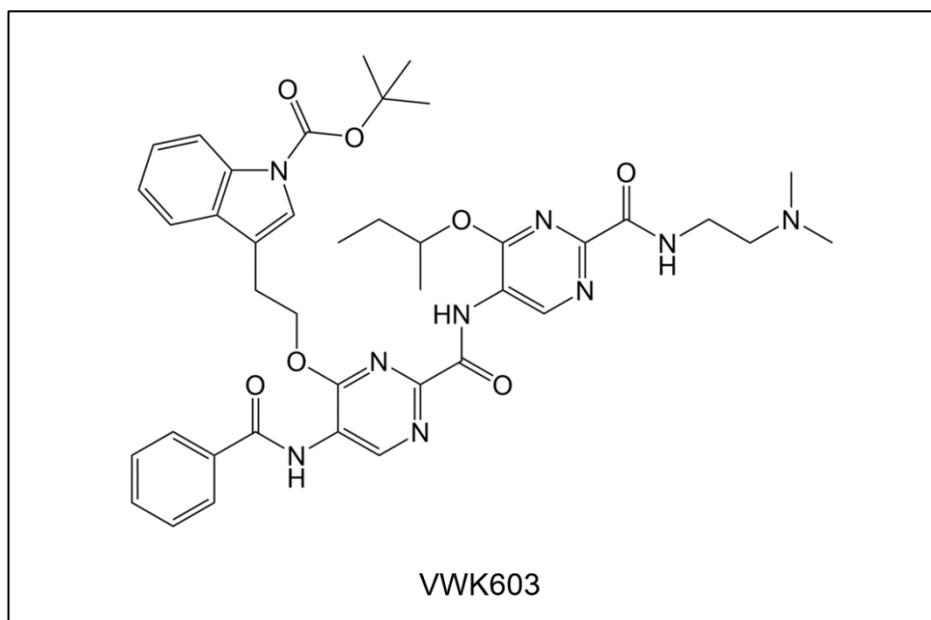
Bis heute wurde noch kein Vertreter dieser neuen Substanzklasse von der FDA zugelassen. Das in der klinischen Untersuchung hinsichtlich einer apoptoseinduzierenden Wirkung am weitesten fortgeschrittene  $\alpha$ -Helix-Mimetikum ist zurzeit das geklammerte  $\alpha$ -helikale Peptid ( *$\alpha$ -helical p53 stapled peptidomimetic*) und MDM2-MDMX-Inhibitor ALRN-6924. Dabei wird die  $\alpha$ -Helix, die die Transaktivierungsdomäne des p53 strukturell imitiert und eine essenzielle Rolle bei der Bindung an MDM2 und MDMX spielt, durch Klammern aus Kohlenwasserstoffbrücken stabilisiert [171]. Es ist das erste  $\alpha$ -Helix-Mimetikum, das zur klinischen Studie zugelassen wurde. Dabei wurde es bei Patienten mit Lymphomen oder malignen soliden Tumoren mit einem p53-Wildtyp getestet und zeigte antitumorale Aktivität und gute Verträglichkeit [171]. Weitere klinische Studien mit ALRN-6924 sind bereits abgeschlossen oder noch aktiv (NCT02909972 [172], NCT03654716 [173], NCT02264613 [174] und NCT04022876 [175]). Darunter befindet sich auch eine Studie mit Patientinnen mit fortgeschrittenem oder rezidivierendem hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom (NCT03725436) [176]. Beim TNBC findet sich bis zum heutigen Zeitpunkt keine klinische Studie mit MDM2-spezifischen  $\alpha$ -Helix-Mimetika.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das TNBC macht 10 bis 20 % aller Mammakarzinome aus [12-14]. Aktuell wird das TNBC neben der operativen Entfernung mit einer Kombinationstherapie aus Paclitaxel und Doxorubicin behandelt [6, 17]. Seit Neustem ergänzt der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab die bisherige Therapie [17]. Dennoch führen diese Behandlungen im Verlauf zu hohen Chemoresistenzen und somit zu hoher Rezidivrate, sodass neue zielgerichtete Therapieansätze erforderlich sind [177].

Es ist bekannt, dass MDM2-Inhibitoren in p53-Wildtyp-Tumoren eine Apoptose induzieren [142]. Gemäß einzelnen Studien konnte neuerdings gezeigt werden, dass MDM2-Inhibitoren in p53-mutierten malignen Tumoren, insbesondere auch in TNBC, eine Zunahme der Apoptoseinduzierbarkeit bewirken [161, 178-180]. Eine direkte Apoptoseinduktion von MDM2-Inhibitoren in TNBC ist bisher jedoch kaum untersucht.

In den vorläufigen Arbeiten der Arbeitsgruppe „Wirkstoffentwicklung“ der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Uniklinikum Düsseldorf wurde in Zellkulturmodellen des TNBC ein Screening einer hausinternen *Library* mit 2000 potenziellen Antitumor-Wirkstoffen, die von Herrn Professor Thomas Kurz aus der Pharmazeutischen Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Dabei ließ sich der Wirkstoff VWK603 als geeigneter Kandidat identifizieren [2]. VWK603 wurde erstmalig in der Dissertation von Vitalij Woloschin beschrieben. Der neuartige Wirkstoff lässt sich den  $\alpha$ -Helix-Mimetika zuordnen und wurde spezifisch für die Inhibition der MDM2-vermittelten Protein-Protein-Interaktion mit p53 entwickelt (Abb. 8) [181].  $\alpha$ -Helix-Mimetika und MDM2-Inhibitoren stellen einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar, wobei aufgrund der genannten Vorergebnisse dies auch beim TNBC möglich erscheint. Für VWK603 konnte dabei in den Vorarbeiten mit 10  $\mu$ M in MDA-MB-231-Zellen ein programmierter Zelltod induziert werden, woraufhin dieses Ergebnis als Basis zur weiteren Charakterisierung des Wirkstoffs beim TNBC dienen soll [2]. Daraus ergibt sich die Frage, ob der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor VWK603 tatsächlich spezifisch in TNBC eine Apoptose induziert. Da das TNBC bis zu 80 % der Fälle eine p53-Mutation aufweist [69] und MDM2-Inhibitoren neuerdings auch hier als effizienter Therapieansatz diskutiert werden [161, 179], könnte mit VWK603 die Etablierung eines MDM2-spezifischen  $\alpha$ -Helix-Mimetikums mit der Wirkung in p53-mutierten Tumoren die bisherigen Therapien ergänzen.



**Abb. 8: Strukturformel des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603.**  
Abbildung mit ChemDraw erstellt, angelehnt an [2, 181].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit die pharmakologische Charakterisierung des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603 als möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung des TNBC. Dabei werden mehrere Aspekte beleuchtet. In der ersten Fragestellung wird die Wirksamkeit des neuen potenziellen Wirkstoffs in verschiedenen TNBC-

Zellmodellen durch die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven validiert. Zur Charakterisierung der Wirksamkeit wird VWK603 mit dem bereits in der präklinischen Phase etablierten MDM2-Inhibitor Nutlin-3a verglichen. Anschließend wird die Wirksamkeit in Abhängigkeit vom p53-Status in p53-Knockout- und p53-Wildtyp-Kolonkarzinomzellen überprüft. Darüber hinaus wird der apoptoseinduzierende Effekt durch den neuen Wirkstoff mechanistisch näher untersucht. Dazu werden die Gene des proapoptotischen Proteins Bax und des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bestimmt und die Bax/Bcl-2-Ratio berechnet. Zur Bestimmung eines therapeutischen Fensters und zur Validierung erster möglicher Nebenwirkungen wird schließlich die Toxizität in nicht malignen Zelllinien untersucht [2].

Im Falle einer positiven Validierung der Antitumorwirkung des Wirkstoffs VWK603 in dieser Arbeit dienen die Ergebnisse der hier durchgeführten Studien als Grundlage für weitere Untersuchungen und Entwicklungen des Wirkstoffs. Hierüber können nachfolgend die Wirkstoffklasse der MDM2-Inhibitoren erweitert und schließlich die bisherigen Therapiemöglichkeiten des TNBC essenziell ergänzt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Merkmale	Hersteller
HCT116 p53 <sup>+/+</sup>	Zellen aus dem Kolon eines männlichen Patienten mit einem kolorektalen Karzinom [182]. p53-Status: Wildtyp [162].	Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Sanil Bhatia aus der Klinik der Kinderonkologie
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	Zellen aus dem Kolon eines männlichen Patienten mit einem kolorektalen Karzinom [182]. p53-Knockout in beiden Allelen.	und -hämatologie und klinischer Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.
MCF-10A	Nicht maligne Zellen aus der Brust einer 36-jährigen Patientin mit einer fibrozystischen Erkrankung [183]. Rezeptorstatus: negativer Östrogenrezeptor [184]. p53-Status: Wildtyp [184].	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-231	Zellen aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma [185]. Rezeptorstatus: <i>triple</i> -negativ [184]. p53-Status: mutiert (R280K) [186].	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-436	Zellen aus dem Pleuraerguss einer 43-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma [187]. Rezeptorstatus: <i>triple</i> -negativ [184]. p53-Status: mutiert (E204fsX45)* [186].	ATCC, Manassas, USA
MDA-MB-468	Zellen aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma [188]. Rezeptorstatus: <i>triple</i> -negativ [184]. p53-Status: (R273H) [186].	ATCC, Manassas, USA

NIH-3T3	Fibroblasten aus dem Embryo einer Schweizer Maus [189]. p53-Status: Wildtyp.	ATCC, Manassas, USA
---------	---	---------------------

\*fs = frameshift = Rasterschub; X = Stopcodon

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.2 Zusammensetzung der Medien

**Tabelle 3: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung.**

Medium	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium für <ul style="list-style-type: none"> <li>MDA-MB-231</li> <li>MDA-MB-436</li> <li>MDA-MB-468</li> <li>NIH-3T3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>500 ml RPMI 1640 mit Phenolrot</li> <li>1 % P/S</li> <li>10 % FCS</li> </ul>
Kultivierungsmedium für <ul style="list-style-type: none"> <li>HCT116 p53<sup>+/+</sup></li> <li>HCT116 p53<sup>-/-</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>500 ml McCoy 5a Medium</li> <li>10 % FCS</li> <li>2 mM L-Glutamin</li> <li>1 % P/S</li> </ul>
Kultivierungsmedium für <ul style="list-style-type: none"> <li>MCF-10A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>500 ml DMEM/F-12</li> <li>5 % Pferdeserum</li> <li>1 % P/S</li> <li>20 ng/ml EGF</li> <li>0,5 mg/ml Hydrocortison</li> <li>10 µg/ml Insulin</li> <li>100 ng/ml Cholera toxin</li> </ul>
Assaymedium für alle Zelllinien außer MCF-10A	<ul style="list-style-type: none"> <li>500 ml RRMI 1640 advanced</li> <li>0,01 mg/ml Phenolrot</li> <li>1 % P/S</li> <li>2 mM L-Glutamin</li> <li>100 nM Dexamethason</li> </ul>
Assaymedium für die Zelllinie MCF-10A	<ul style="list-style-type: none"> <li>500 ml DMEM/F-12</li> <li>2 % Pferdeserum</li> <li>1 % P/S</li> <li>0,5 µg/ml Hydrocortison</li> <li>10 µg/ml Insulin</li> <li>100 ng/ml Cholera toxin</li> </ul>

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.3 Wirkstoffe

Tabelle 4: Verwendete Wirkstoffe.

<b>Wirkstoff</b>	<b>Hersteller</b>
Nutlin-3a	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA
Paclitaxel (Infusionslösung: 6 mg/ml)	EVER Pharma, Unterach, Österreich
VWK603	Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Arbeitskreis Professor Thomas Kurz

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.4 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Ethanol 100% zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
L-Glutamin 200 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
McCoy 5a Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phenolrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640 mit Phenolrot und L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 advanced	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA, 1x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.5 Laborgeräte

Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Absaugvorrichtung für Zellkultur	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank HERACELL 150i	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Einkanal- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektronische Mehrkanalpipetten „Viaflo“	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
LightCycler 480 II System	Roche, Basel, Schweiz
NanoDrop Spektralphotometer 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plattenleser TECAN Spark	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Pipettierhilfe „Accurpette“	VWR International, Radnor, USA
Präzisionswaage	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	VWR International, Radnor, USA
Tischzentrifuge „Mini Star“	VWR International, Radnor, USA
Vortex	VWR International, Radnor, USA
Wasserbad 1083	LAUDA-GFL, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zählkammer „Neubauer Improved“	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
CELLSTAR 6-well-Zellkulturplatte	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR 96-well-Zellkulturplatte	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> (T-75-Flasche)	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> (T-175-Flasche)	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich

CELLSTAR Falcon Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR Falcon Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Costar Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, USA
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FrameStar 384-well-Platte	4titude (Azenta Life Sciences), Burlington, USA
Gefrierbehälter „Mr. Frosty“	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kunstseidenfolie, luftdurchlässig, steril	VWR International, Radnor, USA
Kryokonservierungsröhrchen 2 ml	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten 384-well-Platte	Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
PCR-Gefäße cDNA	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Reagenzreservoirs 25 ml	VWR International, Radnor, USA
TipOne Pipettenspitzen mit Filter	STARLAB International, Hamburg, Deutschland

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

### 2.1.7 Kits

**Tabelle 8: Verwendete Kits.**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, USA
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
ReliaPrep RNA Miniprep System	Promega Corporation, Madison, USA
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA

Teile der Tabelleninhalte basieren auf [1, 2].

## 2.1.8 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer.

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
Bax	CTTGGATCCAGCCCAACA	AGCAAAGTGGTGCTCAAGG
Bcl-2	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	AGTACCTGAACCGGCACCT
GAPDH	TGCACCACCTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAC
HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Die Primer wurden vom Hersteller Metabion AG in Planegg (Deutschland) bezogen.

## 2.1.9 Software

Tabelle 10: Verwendete Software.

Software	Hersteller
BioRender	<a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>
ChemDraw Professional	PerkinElmer, Waltham, USA
GraphPad Prism 8	Graphpad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel 2017	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung wurden das entsprechende Kultivierungsmedium und seine Komponenten (s. Zusammensetzung im Kap. 2.1.2) für die jeweilige Zelllinie vorbereitet. Das Kryoröhrchen mit der entsprechenden Zelllinie wurde aus einem Behälter mit Flüssigstickstoff geholt und gründlich mit Ethanol desinfiziert. Als Nächstes wurde das Röhrchen rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin wurden 10 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der im Zentrifugenröhrchen enthaltenen Zellsuspension für 5 min bei 300 g. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Daraufhin wurden 12 ml Kultivierungsmedium zum Zellpellet hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine T-75-Zellkulturflasche und erst später nach einer Konfluenz von 80 % in eine T-175-Zellkulturflasche überführt. Abschließend wurde die Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (Kohlenstoffdioxid) inkubiert.

### 2.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Passagierung von Zellen erfolgte in Abhängigkeit von der Zellkonfluenz und dem Wachstumsverhalten bis zu zweimal pro Woche. Dafür wurde erst einmal das Kultivierungsmedium mit einer Pasteurpipette entfernt. Daraufhin wurden die Zellen mit 10 ml DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution*) gewaschen und nach Entfernung des DPBS mit 2 ml Trypsin-EDTA (Trypsinierung) versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 37 °C zur Ablösung der adhären Zellen vom Flaschenboden. Zum Stoppen der Trypsinierung wurden 10 ml Kultivierungsmedium hinzugegeben. Abhängig von der Konfluenz und dem Wachstumsverhalten der Zelllinien erfolgte eine Teilung der Zellsuspension in einem Verhältnis zwischen 1:3 und 1:6. Zur Kultivierung wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue T-175-Zellkulturflasche überführt und mit Zellkulturmedium bis zu einem Endvolumen von 25 ml aufgefüllt. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen zur Vorbereitung eines Versuches überführt oder verworfen.

### 2.2.1.3 Zählen der Zellen

Aus dem Zentrifugenröhrchen wurden 15 µl Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau in einer 1:2 Verdünnung gemischt. Das Trypanblau dient zur Unterscheidung zwischen den lebenden und toten Zellen. Dabei werden tote Zellen blau angefärbt. Aus der mit dem Trypanblau gefärbten Zellsuspension wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer hinzugegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der lebenden Zellen in den vier Eckquadraten bestimmt. Die gesamte Zellzahl für die geerntete Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen ergibt sich aus der folgenden Formel (Abb. 9):

$$\frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Volumen der gesamten Zellsuspension (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl der gezählten großen Eckquadrate}}$$

Abb. 9: Formel zur Berechnung der gesamten Zellzahl unter Anwendung einer Neubauer-Zählkammer.

Für die angestrebte Zelldichte wurde das benötigte Volumen des Kultivierungsmediums mittels Dreisatzes berechnet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der im Zentrifugenröhrchen enthaltenen Zellsuspension für 5 min bei 300 g. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Daraufhin wurde das für die angestrebte Zelldichte berechnete Volumen des Kultivierungsmediums zum Zellpellet hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension mit der angestrebten Zelldichte konnte somit für weitere Vorgänge verwendet werden.

#### 2.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Zur Kryokonservierung wurde das Einfriermedium zunächst vorbereitet. Das Einfriermedium bestand aus 50 % des entsprechenden Kultivierungsmediums, 40 % FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid). Die Zellen wurden, wie im Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, von der Zellkulturflasche abgelöst und in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der im Zentrifugenröhrchen enthaltenen Zellsuspension für 5 min bei 300 g. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Für die Kryokonservierung wurde eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml angestrebt. Als Nächstes wurde das für die Zelldichte berechnete Volumen des Einfriermediums zum Zellpellet hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Aliquotierung der Zellsuspension mit jeweils 1 ml in die Kryoröhrchen. Die Kryoröhrchen wurden für 24 Stunden bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß eingefroren. Abschließend wurden die kryokonservierten Zellen in einem Behälter mit Flüssigstickstoff gelagert.

#### 2.2.2 Zellviabilitätstestung

##### 2.2.2.1 Lösen und Verdünnen der MDM2-adressierenden Inhibitoren

Zur Behandlung der Zellen mit den MDM2-adressierenden Inhibitoren wurden die Substanzen vorbereitet. Sowohl VWK603 als auch Nutlin-3a lagen in Pulverform vor und wurden in DMSO gelöst [1, 2]. Die Endkonzentration betrug 10 mM [1, 2]. Die Lösungen wurden in einigen Reaktionsgefäßen aufgeteilt und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Für jeden Versuch wurde ein neues Aliquot aufgetaut und verwendet.

##### 2.2.2.2 Aussaat der Zellen zur Zellviabilitätstestung

Für die Zellviabilitätstestung wurde eine Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml benötigt [1, 2]. Die Zellen wurden, wie in den Kapiteln 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, dafür geerntet und vorbereitet. Zur Aussaat wurden 40  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in jedes *Well* einer 384-*well*-Mikrotiterplatte hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen in der Mikrotiterplatte im Brutschrank bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  [1, 2].

##### 2.2.2.3 Behandlung der Zellen mit den MDM2-adressierenden Inhibitoren

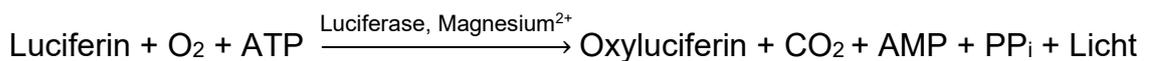
Das für die Zelllinien (außer MCF-10A-Zelllinie; hier spezielles Differenzierungs- und Assaymedium s. unten) verwendete Assaymedium ist ein vom Hersteller serumfrei hergestelltes Medium ohne FCS-Supplementierung, das jedoch zusätzlich neben weiteren

Komponenten eine chemisch definierte Menge an Insulin (10 mg/l), Transferrin (7,5 mg/l) und lipidreichem Kälberserumalbumin (400 mg/l) enthält [190, 191]. Dieses wurde ausgewählt, um die Wirkung der Substanzen besser zu evaluieren, da die im Serum bzw. im FCS in variierenden Konzentrationen erhaltenen Wachstumsfaktoren und Proteine zellbiologische Eigenschaften der (Tumor-)Zellen [192, 193] wie z.B. das Wachstum oder auch die Apoptosesensitivität unterschiedlich beeinflussen können [194, 195]. Für eine erfolgreiche Zellkultivierung mit serumfreiem Medium ist insbesondere die Zugabe von Insulin essenziell [196, 197]. Dies wurde auch für Brustkrebszellen inklusive TNBC-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 gezeigt, indem die Zellen mit Insulin supplementierten RPMI 1640 Medium kultiviert wurden [198]. In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe „Wirkstoffentwicklung“ der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitätsklinikum Düsseldorf konnte bei Anwendung des oben beschriebenen Assaymediums kein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität gegenüber mit FCS inkubierten Zellen beobachtet werden [unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe]. Zur Toxizitätstestung in den MCF-10A-Zellen wurde anstelle des MCF-10A-Kultivierungsmediums (s. Kap. 2.1.2) das entsprechende Assaymedium verwendet, welches speziell für diese Zellen entwickelt wurde und dessen Zusammensetzung aus dem Protokoll von Debnath *et al.* zu entnehmen ist [199]. Hierbei wurde die Konzentration des Pferdeserums von 5 auf 2 % reduziert [1, 2, 199].

Für die Testung der MDM2-adressierenden Inhibitoren wurden zunächst 180 µl des vorbereiteten Assaymediums in jedes *Well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte vorgelegt. In die *Wells* der Spalte 2 der 96-*well*-Mikrotiterplatte wurden statt 180 µl 360 µl pipettiert. In diesen *Wells* wurden jeweils 2,88 µl (finale Konzentration: 80 µM) der beiden MDM2-adressierenden Inhibitoren oder eine der beiden Kontrollsubstanzen DMSO oder Paclitaxel hinzugegeben und vermischt. Anschließend erfolgte die Herstellung einer halbierenden Verdünnungsreihe von der Spalte 2 bis zur Spalte 10 der 96-*well*-Mikrotiterplatte. Die 384-*well*-Mikrotiterplatte aus dem Kapitel 2.2.2.2 wurde nach 24 Stunden aus dem Brutschrank genommen. Das Kulturmedium wurde anschließend entfernt. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von 40 µl des mit der jeweiligen Substanz versetzten Assaymediums aus der 96-*well*-Mikrotiterplatte zu den Zellen. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Substanz lagen zwischen 0,31 µM und 80 µM. Jede Substanzkonzentration wurde mindestens in vier Replikaten getestet. Nach Zugabe der Substanzen wurde die 384-*well*-Mikrotiterplatte statt mit dem zugehörigen Deckel mit einer sterilen luftdurchlässigen Kunstseidenfolie bedeckt und für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert [1, 2]. Diese Folie diente zum gleichmäßigen Gasaustausch und zur Verminderung von Platten-/Randdefekten. Anschließend wurde die Behandlung mit den MDM2-adressierenden Inhibitoren noch einmal wiederholt, wobei das alte Assaymedium erst einmal entfernt wurde [1, 2].

#### 2.2.2.4 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay

Zur Messung der Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit den Substanzen wurde das Viabilitätstest-Kit *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* verwendet. In diesem Assay wird der ATP-Gehalt (ATP = Adenosintriphosphat) der noch lebenden Zellen gemessen. Lebende Zellen werden bei der Zugabe des Testreagenz aus dem Kit lysiert und der gesamte ATP-Gehalt wird freigesetzt. Das Luciferin wird dann durch das beigefügte Enzym Luciferase unter Verwendung von ATP und Sauerstoff in Oxyluciferin umgewandelt. Dadurch wird auch Licht erzeugt, das als Lumineszenzsignal mit einem Plattenleser quantitativ detektiert wird. Die Abbildung 10 fasst das Reaktionsschema des CellTiter-Glo Assays zusammen.



**Abb. 10: Reaktionsschema des *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assays*.**

Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat

Das Test-Kit enthält Luciferin als Pulverform und einen Puffer. Vor der Anwendung des Testreagenz werden 10 ml Puffer in das Fläschchen mit dem enthaltenen Luciferin hinzugegeben und vermischt.

Für die Zellviabilitätstestung wurden 2 ml von dem Testreagenz genommen und im gleichen Verhältnis mit dem jeweiligen Kultivierungsmedium der untersuchten Zelllinie verdünnt. Die behandelte Platte wurde nach der zweimaligen 72-stündigen Behandlung aus dem Brutschrank genommen. Das Assaymedium wurde daraufhin entfernt. In jedes *Well* wurden 10 µl des vorbereiteten Mediums mit dem Testreagenz hinzugegeben. Daraufhin wurde die Platte auf den Schüttler unter Lichtschutz für 15 min bei Raumtemperatur (RT) gestellt. Anschließend erfolgte die Messung der Lumineszenzsignale in der Platte mithilfe eines Plattenlesers.

#### 2.2.2.5 Auswertung der Zellviabilitätstestung

Zur Auswertung wurden die Werte des Lumineszenzsignals für jede Substanzkonzentration vom Mittelwert der Leerwerte abgezogen. Daraufhin wurden die Werte der Substanzkonzentration zu den Kontrollwerten im Verhältnis gesetzt und normiert. Die Kontrollwerte wurden zuvor ebenfalls vom Mittelwert der Leerwerte abgezogen. Unter den Kontrollwerten versteht man die gemessenen Werte in den *Wells*, in denen keine Behandlung der Zellen mit einer Substanz erfolgte. Das Überleben der Zellen in diesen *Wells* wird als 100 % definiert. Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgten anschließend anhand einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit vier Parametern im Programm GraphPad Prism 8. Unter dem IC<sub>50</sub>-Wert versteht man die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) eines Inhibitors, bei der ein biologischer Prozess um 50 %

gehemmt wird. Die Bestimmung der  $IC_{50}$  gibt einen objektiven Vergleich der Wirkstärke (*potency*) zwischen den Wirkstoffen an. In dieser Arbeit gab die  $IC_{50}$  die Konzentration an, bei der die Hälfte der Zellzahl durch den Wirkstoff reduziert wurde (Zellviabilitätsreduktion).

### 2.2.3 Molekularbiologie

#### 2.2.3.1 Aussaat der Zellen zur Analyse der Apoptoseinduzierbarkeit

Zur Analyse der Apoptoseinduzierbarkeit als mögliche Ursache der reduzierten Zellviabilität wurde die Zelllinie MDA-MB-231 mit einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml verwendet [2]. Zur Aussaat wurden 2 ml der Zellsuspension in jedes *Well* der beiden 6-*well*-Platten hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Platte bei 37 °C und 5 %  $CO_2$ .

#### 2.2.3.2 Behandlung der Zellen mit VWK603

Zur Vorbereitung der Substanzzugabe zu den Tumorzellen wurden in drei 15-ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 7 ml Assaymedium hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurden in ein Zentrifugenröhrchen 0,88  $\mu$ l (Endkonzentration: 1,25  $\mu$ M), 0,44  $\mu$ l (Endkonzentration: 0,63  $\mu$ M) der Stammkonzentration von VWK603 oder 0,88  $\mu$ l DMSO (negative Kontrolle) pipettiert. Daraufhin wurden die Zentrifugenröhrchen gut geschüttelt. Die 6-*well*-Platten wurden nach 24 Stunden aus dem Brutschrank genommen. Das Kulturmedium wurde anschließend entfernt. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von 2 ml des mit der jeweiligen Substanzkonzentration versetzten Assaymediums aus den Zentrifugenröhrchen zu den Zellen. Jede Substanzkonzentration wurde in drei Replikaten getestet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platte für 72 Stunden im Brutschrank [2].

#### 2.2.3.3 mRNA-Isolation

Zur quantitativen Analyse der Genexpression der apoptoserelevanten Gene wurde eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR/qRT-PCR, *quantitative real-time polymerase chain reaction*) durchgeführt. Dazu wurden sowohl eine mRNA als auch eine komplementäre DNA (cDNA) aus den Zellen der 6-*well*-Platten benötigt. Die 6-*well*-Platten wurden nach 72-stündiger Behandlung aus dem Brutschrank genommen und auf Eis gelegt. Das Assaymedium wurde abgenommen und die Zellen wurden dann zweimal mit DPBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die mRNA-Isolation mit dem Kit *ReliaPrep RNA Miniprep System* von Promega nach dem Herstellerprotokoll [200]. Nach Entfernung der DPBS wurden in jedes *Well* 250  $\mu$ l des Lysepuffers mit 1-Thioglycerol hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgenommen und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert.

Daraufhin erfolgten die Zugabe von 85 µl Isopropanol und eine Durchmischung der Zellsuspension für 5 s. Das Lysat wurde jeweils in eine Säule überführt und für 30 s mit 14000 g bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde danach verworfen. In die Säulen wurden 500 µl RNA-Waschlösung hinzugegeben. Als Nächstes erfolgte eine erneute Zentrifugation der Säulen mit 14000 g für 30 s bei RT. Anschließend wurden 30 µl des Inkubationsmix, der aus 3 µl DNA-I-Enzym, 24 µl *Yellow Core Buffer* und 3 µl Manganchlorid bestand, jeweils auf die Membran der Säulen aufgetragen. Es erfolgte dann eine Inkubation der Säulen für 15 min bei RT. Nach der Inkubation wurden 200 µl Säulen-Waschlösung hinzugegeben und für 15 s bei 14000 g bei RT zentrifugiert. Als Nächstes wurde ein erneuter Waschvorgang mit 500 µl RNA-Waschlösung mit anschließender Zentrifugation mit 14000 g für 30 s bei RT durchgeführt. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulen wurden jeweils mit 300 µl RNA-Waschlösung gewaschen. Als Nächstes erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 g für 2 min bei RT. Die Säulen wurden jeweils auf ein vom Hersteller beigefügtes neues Reaktionsgefäß gesetzt. Auf die Membran der Säulen wurden jeweils 30 µl nukleasefreies Wasser aufgetragen. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 g bei RT für 1 min [200]. Die Reaktionsgefäße mit der isolierten mRNA wurden rasch auf Eis bei 4 °C gestellt. Im Anschluss der mRNA-Isolation erfolgte die photometrische Bestimmung der mRNA-Konzentration und Reinheit mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop. Dabei wurde die Extinktion bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm in 1 µl mRNA der Proben gemessen. Als Leerwert dienten 1 µl nukleasefreies Wasser. Proben mit einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 bei einem Absorptionsverhältnis 260 nm / 280 nm gelten als rein. Mithilfe der Konzentrationsbestimmung wurde dann die mRNA der Proben auf 1000 ng/µl und 7 µl Endvolumen mit nukleasefreiem Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß eingestellt. Die isolierte mRNA wurde abschließend bei -80 °C gelagert oder für die cDNA-Synthese verwendet.

#### 2.2.3.4 cDNA-Synthese

Während der cDNA-Synthese wird die mRNA in die cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Thermo Fisher Scientific [201]. Für den ersten Schritt wurde der erste Mastermix pro Reaktionsansatz (pro Probe), wie in der Tabelle 11 beschrieben, vorbereitet:

**Tabelle 11: Erster Mastermix des Kits *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*.**

<b>Reagenz</b>	<b>Pro Reaktionsansatz [µl]</b>
Desoxynukleosidtriphosphate (10 mM)	1
Randomisierte Hexamer-Primer (50 ng/µl)	2
Endvolumen	3

Der Mastermix wurde zu den 7 µl mRNA der jeweiligen Probe aus dem Kapitel 2.2.3.3 hinzugefügt. Als Nächstes erfolgten eine fünfminütige Inkubation der Proben im Thermocycler bei 65 °C und eine anschließende Kühlung der Proben für mindestens 1 min [201]. Anschließend erfolgte, wie in der Tabelle 12 beschrieben, die Vorbereitung des zweiten Mastermix:

**Tabelle 12: Zweiter Mastermix des Kits *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*.**

<b>Reagenz</b>	<b>Pro Reaktionsansatz [µl]</b>
10x-Reverse-Transkription-Puffer	2
Manganchlorid (25 mM)	4
Dithiothreitol (0,1 M)	2
RNase OUT (40 U/µl)	1
Endvolumen	9

Zu jeder Probe wurden dann 9 µl des zweiten Mastermix hinzugegeben und bei RT für 2 min inkubiert. Als Nächstes wurden 0,25 µl des Enzyms Superscript II Reverse Transkriptase in jede Probe hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin im Thermocycler inkubiert. Dort erfolgte zunächst eine Inkubation für 50 min bei 42 °C und anschließend für 15 min bei 70 °C [201]. In der Zeit wurde die mRNA in die cDNA umgeschrieben. Abschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und auf Eis bei 4 °C gelegt. Im Anschluss der cDNA-Synthese erfolgte die photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop. Dabei wurde die Extinktion bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm in 1 µl cDNA der Proben gemessen. Als Leerwert dienen 1 µl nukleasefreies Wasser. Proben mit einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 bei einem Absorptionsverhältnis 260 nm / 280 nm gelten als rein. Mithilfe der Konzentrationsbestimmung wurde dann die cDNA der Proben auf 10000 ng/µl und 100 µl Endvolumen mit nukleasefreiem Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß eingestellt. Sowohl die synthetisierte cDNA als auch die verdünnte cDNA-Konzentration wurden abschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der qRT-PCR handelt sich um eine Vervielfältigung und Quantifizierung eines gesuchten DNA-Abschnitts. Dafür wird ein Echtzeit-PCR-Gerät, hier Lightcycler 480 von Roche, verwendet, das aus einem Thermocycler und einem Fluorimeter besteht. Vor der Durchführung der qRT-PCR wird ein Mastermix zu den Proben hinzugegeben. Der gesuchte DNA-Abschnitt der Proben wird über die genspezifischen Primer festgelegt. Während der qRT-PCR-Reaktion erfolgt zunächst die Amplifizierung der DNA. Als Nächstes lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green aus dem Mastermix in die neu gebildete doppelsträngige

DNA an. Durch die Anlagerung steigt die Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffs an. Sie wird über den Fluorimeter gemessen und beträgt proportional zur DNA-Konzentration.

Vor der Durchführung der qRT-PCR wurden die Primer mit einer Stammkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  mit nukleasefreiem Wasser in einer Verdünnung von 1:10 versetzt. Anschließend erfolgte die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes pro Gen ist aus der untenstehenden Tabelle 13 zu entnehmen. Für den Reaktionsansatz wurde der *Lightcycler 480 SYBR Green I Master* von Roche verwendet.

Tabelle 13: qRT-PCR-Reaktionsansatz pro Gen.

Reagenz	Volumen
SYBR Green I Master	2,5 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Primer <i>forward</i>	0,25 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Primer <i>reverse</i>	0,25 $\mu\text{l}$
Nukleasefreies Wasser	1 $\mu\text{l}$
Endvolumen	4 $\mu\text{l}$

Im *Lightcycler 480 SYBR Green I Master* befinden sich Desoxynukleosidtriphosphate, Taq-DNA-Polymerase, Manganchlorid, Reaktionspuffer und SYBR Green I. Für jede Probe wurden drei Replikate durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 1  $\mu\text{l}$  nukleasefreies Wasser statt 1  $\mu\text{l}$  DNA verwendet, sodass sich insgesamt 21 Reaktionen und somit 84  $\mu\text{l}$  Mastermix pro untersuchtes Gen ergaben. Daraufhin wurden 4  $\mu\text{l}$  des hergestellten Mastermix in jedes *Well* einer 384-*well*-PCR-Platte pipettiert. Als Nächstes wurden 1  $\mu\text{l}$  cDNA der jeweiligen Proben oder 1  $\mu\text{l}$  nukleasefreies Wasser zu den 4  $\mu\text{l}$  Mastermix hinzugegeben. Die PCR-Platte wurde anschließend mit einer Klebeschutzfolie beklebt und kurz zentrifugiert. Die qRT-PCR erfolgte nach dem Standardprogramm in der Tabelle 14.

Tabelle 14: Standardprogramm für qRT-PCR.

Programmschritte	Temperatur	Dauer
1. Präinkubation	95 °C	5 min
2. Amplifikation	95 °C	10 s
	60 °C	10 s
	72 °C	20 s
Der 2. Schritt wurde in 45 Zyklen wiederholt.		
3. Schmelzkurve	95 °C	5 s
	60 °C	1 s
4. Kühlung	40 °C	30 s

Im Anschluss erfolgte die Auswertung der qRT-PCR anhand der Delta-Delta-Ct-Methode ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode) [202, 203]. Bei der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wird die Genexpression des Zielgens auf ein Referenzgen normalisiert, wobei die *housekeeping* Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) als Referenzgene in diesem Versuch dienten. Dabei werden folgende Rechnungsschritte der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode durchgeführt:

Im ersten Schritt wird das Zielgen auf das Referenzgen normalisiert (Abb. 11).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Abb. 11: Formel des ersten Schritts bei der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

Im nächsten Schritt wird das Zielgen in der behandelten Gruppe auf die Kontrollgruppe normalisiert (Abb. 12).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{behandelt}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Abb. 12: Formel des zweiten Schritts bei der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

Im letzten Schritt wird das relative Expressionslevel berechnet (Abb. 13). Dabei entspricht ein Wert kleiner als 1 einer Reduktion und größer als 1 einem Anstieg der Genexpression.

$$\text{Relatives Genexpressionslevel} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Abb. 13: Formel des dritten Schritts bei der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

#### 2.2.4 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe von GraphPad Prism 8. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test für zwei Gruppen überprüft. Die Überprüfung der Signifikanz für mehrere Gruppen erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test oder Tukey-Test als Posthoc-Test. Signifikanzen wurden als \* ( $p < 0,05$ ) = signifikant, \*\* ( $p < 0,01$ ) = sehr signifikant, \*\*\* ( $p < 0,001$ ) = hoch signifikant und \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) = hoch signifikant angegeben. Bei mehrfach wiederholten Versuchen (mit n unabhängigen Versuchen) gaben die Fehlerbalken die Standardabweichung (SD) des Mittelwertes aus allen Versuchen an.

### 3 Ergebnisse

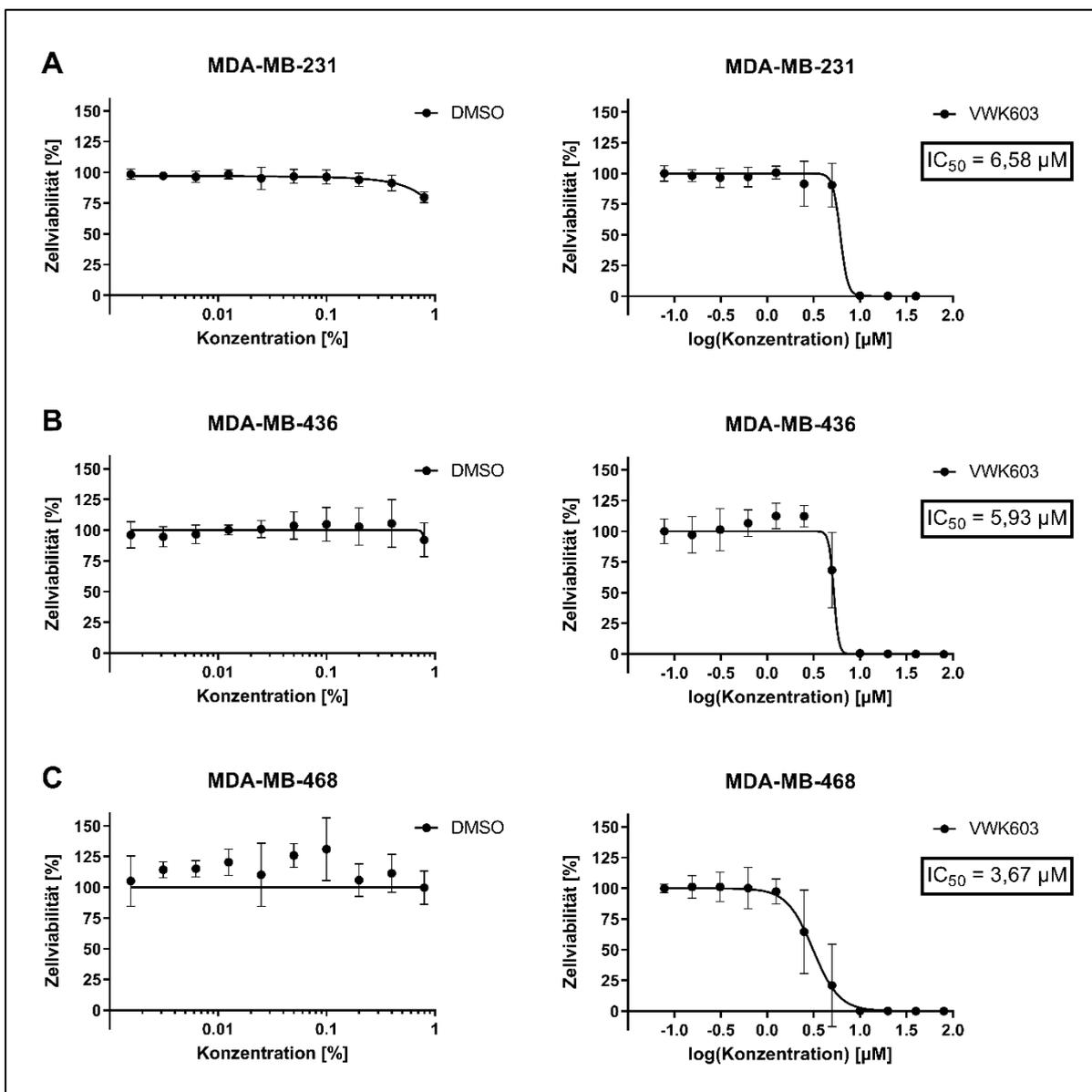
#### 3.1 Untersuchung der Wirksamkeit von VWK603 in p53-mutierten TNBC-Zellen

Zur Beurteilung der pharmakologischen Wirkstärke eines Inhibitors gehört die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts. Der  $IC_{50}$ -Wert wird als mittlere Konzentration eines Inhibitors ( $IC_{50}$ ) definiert, die zu einer halbmaximalen Hemmung führt. Die  $IC_{50}$  lassen sich aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen Substanzen berechnen, mit denen man die Wirksamkeit untereinander objektiv vergleichen kann.

Hinsichtlich der Fragestellung, ob der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor in weiteren p53-mutierten TNBC-Zellen die Zellviabilität reduziert, wurde in diesem Versuch VWK603 in einer Verdünnungsreihe zwischen 0,31  $\mu$ M und 80  $\mu$ M zu den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 als repräsentative TNBC-Modelle hinzugegeben [2]. Als negative Kontrolle diente die Lösemittelkontrolle DMSO [1]. Es erfolgte eine zweimalige 72-stündige Inkubation mit den Substanzen. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels des CellTiter-Glo Assays gemessen. Anhand von GraphPad Prism wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven und die dazugehörigen  $IC_{50}$ -Werte berechnet [1, 2].

Die Abbildung 14 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven von VWK603 und DMSO in den einzelnen TNBC-Zelllinien. Für DMSO sind auf der x-Achse die Konzentration logarithmisch in Prozent und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen. Für VWK603 sind auf der x-Achse die Konzentration als logarithmische Konzentration linear in der Einheit Mikromol und auf der y-Achse die Wirkung (hier ebenfalls die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen. Es wurde in den TNBC-Zelllinien eine  $IC_{50}$  von VWK603 zwischen 3,67  $\mu$ M und 6,58  $\mu$ M ermittelt. In den MDA-MB-231-Zellen wurde dabei eine  $IC_{50}$  von  $6,58 \pm 1,53 \mu$ M, in den MDA-MB-436-Zellen eine  $IC_{50}$  von  $5,93 \pm 1,86 \mu$ M und in den MDA-MB-468-Zellen eine  $IC_{50}$  von  $3,67 \pm 1,62 \mu$ M bestimmt [2]. Bei der Zugabe von DMSO als negative Lösemittelkontrolle ergab sich keine signifikante Reduktion der Zellviabilität und damit keinen  $IC_{50}$ -Wert in allen TNBC-Zelllinien [1]. Zusammenfassend reduzierte die neue Substanz WK603 konzentrationsabhängig signifikant die Zellviabilität [2].

Die Tabelle 15 fasst die  $IC_{50}$ -Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen in der jeweiligen Zelllinie zusammen. Da keine  $IC_{50}$  für DMSO bestimmt werden konnten [1], wurde DMSO aus Gründen der Übersichtlichkeit in der dargestellten Tabelle nicht aufgelistet.



**Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603 und DMSO in drei TNBC-Zelllinien.**

Zur Ermittlung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden verschiedene TNBC-Zelllinien zweimal für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen VWK603 oder DMSO [Lösungsmittelkontrolle] inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte erfolgte anhand von GraphPad Prism. Abgebildet sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die TNBC-Zelllinien MDA-MB-231 (A), MDA-MB-436 (B) und MDA-MB-468 (C). Dargestellt ist der Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens vier Replikaten ( $n = 3$ ) [1, 2]. (A, B, C jeweils linke Diagramme: DMSO [Lösungsmittelkontrolle]; rechte Diagramme: VWK603.)

Teile der Abbildung (linke Hälfte) sind unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International-Lizenz lizenziert, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium oder Format erlaubt [204]. Es wurden Elemente der publizierten Abbildung verwendet und modifiziert [1]. Erstellung mittels GraphPad Prism.

Teile der Abbildung (rechte Hälfte) wurden ebenfalls mit GraphPad Prism erstellt, mit Modifikationen nach [2] und mit entsprechender Genehmigung.

Tabelle 15: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der Substanz VWK603 in drei TNBC-Zelllinien.

Zelllinie	VWK603 IC <sub>50</sub> ± SD [µM]
MDA-MB-231	6,58 ± 1,53
MDA-MB-436	5,93 ± 1,86
MDA-MB-468	3,67 ± 1,62

Die Tabelle fasst die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanz VWK603 in den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 zusammen. Angegeben sind die IC<sub>50</sub>-Werte in Mikromolar [µM] als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD).

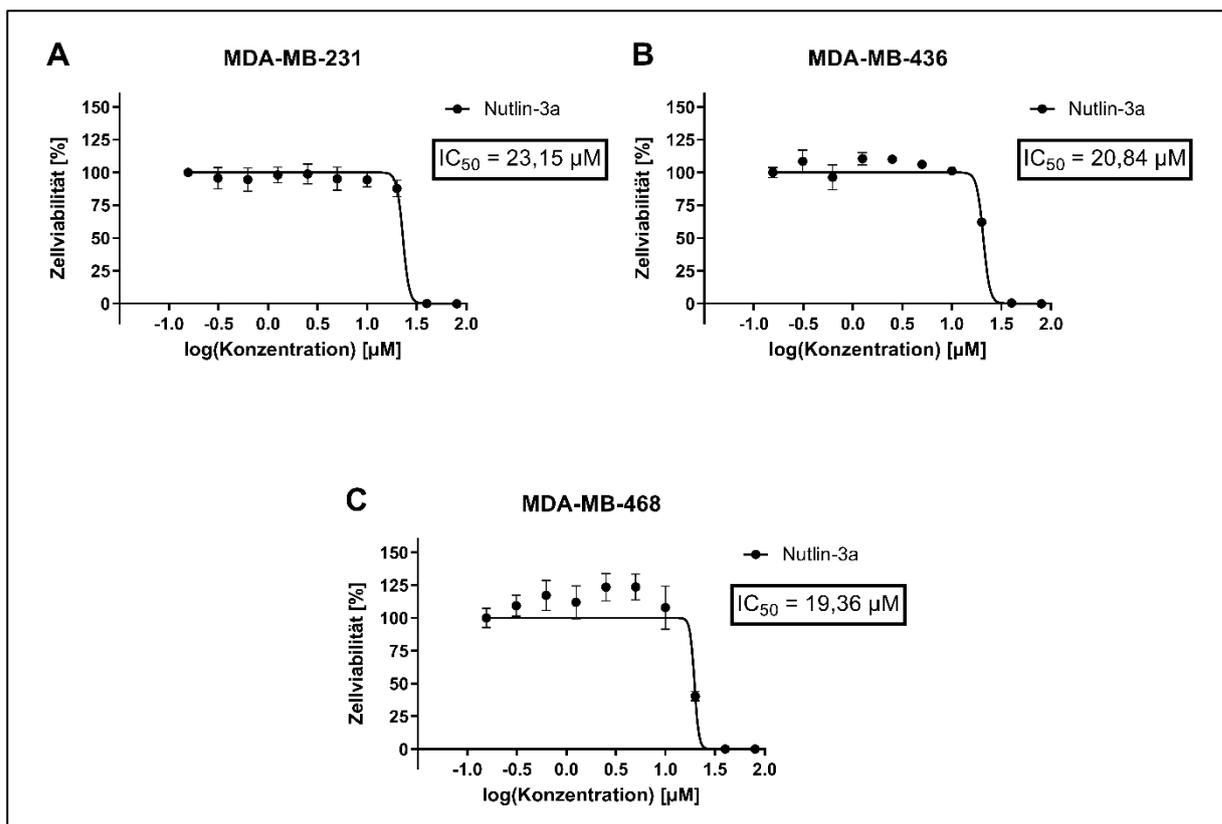
Eigene Darstellung der Tabelle in Anlehnung an [2].

### 3.2 Vergleich der Wirksamkeit von VWK603 mit Nutlin-3a

Zum Vergleich der Wirksamkeit wurde der MDM2-Inhibitor Nutlin-3a als Vergleichssubstanz herangezogen. Nutlin-3a gehört zu den Nutlinen und wurde im Jahre 2004 von Vassilev *et al.* von der Firma Roche entwickelt. Er gehört zu den ersten und bekanntesten MDM2-Inhibitoren [142, 162] und wurde bereits in TNBC-Zelllinienmodellen in anderen Studien untersucht [161, 179].

In diesem Versuch wurde Nutlin-3a zu den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 hinzugegeben. Es erfolgte auch hier eine zweimalige 72-stündige Inkubation mit den Konzentrationen zwischen 0,31 µM und 80 µM. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels des CellTiter-Glo Assays gemessen. Anhand von GraphPad Prism wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven und die dazugehörigen IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt [2].

Die Abbildung 15 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven von Nutlin-3a in den einzelnen TNBC-Zelllinien. Auf der x-Achse sind die Konzentration als logarithmische Konzentration linear in der Einheit Mikromol und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen. Es wurde in den TNBC-Zelllinien eine IC<sub>50</sub> für Nutlin-3a zwischen 19,36 µM und 23,15 µM ermittelt. In den MDA-MB-231-Zellen wurde eine IC<sub>50</sub> von 23,15 ± 1,00 µM, in den MDA-MB-436-Zellen eine IC<sub>50</sub> von 20,84 ± 0,49 µM und in den MDA-MB-468-Zellen eine IC<sub>50</sub> von 19,36 ± 0,48 µM berechnet [2]. Auch in diesen Versuchen reduzierte Nutlin-3a konzentrationsabhängig signifikant die Zellviabilität [2]. Die Tabelle 16 gibt die IC<sub>50</sub> der Substanz Nutlin-3a in allen drei untersuchten TNBC-Zelllinien an.



**Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Analysen von Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien.**

Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden verschiedene TNBC-Zelllinien zweimal für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz Nutlin-3a inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte anhand von GraphPad Prism. Abgebildet sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die TNBC-Zelllinien MDA-MB-231 (A), MDA-MB-436 (B) und MDA-MB-468 (C). Dargestellt ist der Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens vier Replikaten (n = 3) [2]. Abbildung mit GraphPad Prism erstellt, modifiziert nach [2] mit entsprechender Genehmigung.

**Tabelle 16: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der Substanz Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien.**

Zelllinie	Nutlin-3a IC <sub>50</sub> ± SD [µM]
MDA-MB-231	23,15 ± 1,00
MDA-MB-436	20,84 ± 0,49
MDA-MB-468	19,36 ± 0,48

Die Tabelle fasst die IC<sub>50</sub>-Werte für die Substanz Nutlin-3a in den TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 zusammen. Angegeben sind die IC<sub>50</sub>-Werte in Mikromolar [µM] als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD).

Eigene Darstellung der Tabelle in Anlehnung an [2].

Zum Vergleich der IC<sub>50</sub> von VWK603 mit der IC<sub>50</sub> von Nutlin-3a ergaben sich folgende Ergebnisse:

Die IC<sub>50</sub> von Nutlin-3a lag in den MDA-MB-231-Zellen um das 3,52-Fache höher als bei VWK603. Bei den MDA-MB-436-Zellen wurde mit 3,51 ein zu den MDA-MB-231-Zellen vergleichbarer Faktor von Nutlin-3a gegenüber VWK603 festgestellt, während der Faktor in den MDA-MB-468-Zellen mit 5,28 höher lag [2]. Beim Vergleich der IC<sub>50</sub> der beiden MDM2-adressierenden Inhibitoren mittels des zweiseitigen ungepaarten t-Tests ergab sich ein hoch

signifikanter Konzentrationsunterschied in der Zellviabilitätsreduktion in allen drei TNBC-Zelllinien ( $p < 0,001$ ). Somit reduzierte VWK603 mit geringerer Konzentration signifikant stärker die Zellviabilität als Nutlin-3a in allen drei TNBC-Zelllinien (Tabelle 17) [2].

Tabelle 17: Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte und Vergleich der Substanzen VWK603 und Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien.

Zelllinie	VWK603 $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Nutlin-3a $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Signifikanz (p-Wert)
MDA-MB-231	6,58 $\pm$ 1,53	23,15 $\pm$ 1,00	< 0,0001
MDA-MB-436	5,93 $\pm$ 1,86	20,84 $\pm$ 0,49	< 0,0001
MDA-MB-468	3,67 $\pm$ 1,62	19,36 $\pm$ 0,48	< 0,0001

Die Tabelle stellt die  $IC_{50}$ -Werte für die Substanzen VWK603 und Nutlin-3a in den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 dar. Angegeben sind die  $IC_{50}$ -Werte in Mikromolar [ $\mu M$ ] mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zur Überprüfung, ob sich die  $IC_{50}$ -Werte der beiden Substanzen signifikant voneinander unterscheiden, wurden diese in der jeweiligen Zelllinie mittels des zweiseitigen ungepaarten t-Tests miteinander verglichen [2]. Eigene Darstellung der Tabelle in Anlehnung an [2].

### 3.3 Untersuchung der Wirkung in p53-defizienten Zellen

Da für die MDM2-adressierenden Inhibitoren VWK603 und Nutlin-3a eine deutliche Herabsetzung der Zellviabilität in p53-mutierten Zellen gezeigt werden konnte, sollte weiterhin die Wirkung in Abhängigkeit vom p53-Status untersucht werden. Dabei wurden im folgenden Versuch die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 mit einem p53-Wildtyp ( $p53^{+/+}$ ) und HCT116 mit einem p53-Knockout ( $p53^{-/-}$ ) verwendet [1, 2]. Zum Vergleich der Wirksamkeit wurde neben dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3a Paclitaxel als eine weitere apoptoseinduzierende Substanz herangezogen [1, 2]. Paclitaxel wird gemäß der Leitlinie in der Therapie des TNBC eingesetzt und ist ein Bestandteil der Kombinationstherapie mit den Anthrazyklinen [6, 17].

In diesem Versuch wurden die beiden Zelllinien zweimal für 72 Stunden mit den verschiedenen Substanzen mit den Konzentrationen zwischen 0,31  $\mu M$  und 80  $\mu M$  inkubiert [1, 2]. Als negative Kontrolle diente auch hier die Lösemittelkontrolle DMSO. Anschließend erfolgte die Messung der Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays. Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen Substanzen in den Zelllinien und die daraus berechneten  $IC_{50}$  wurden anhand von GraphPad Prism ermittelt [1, 2].

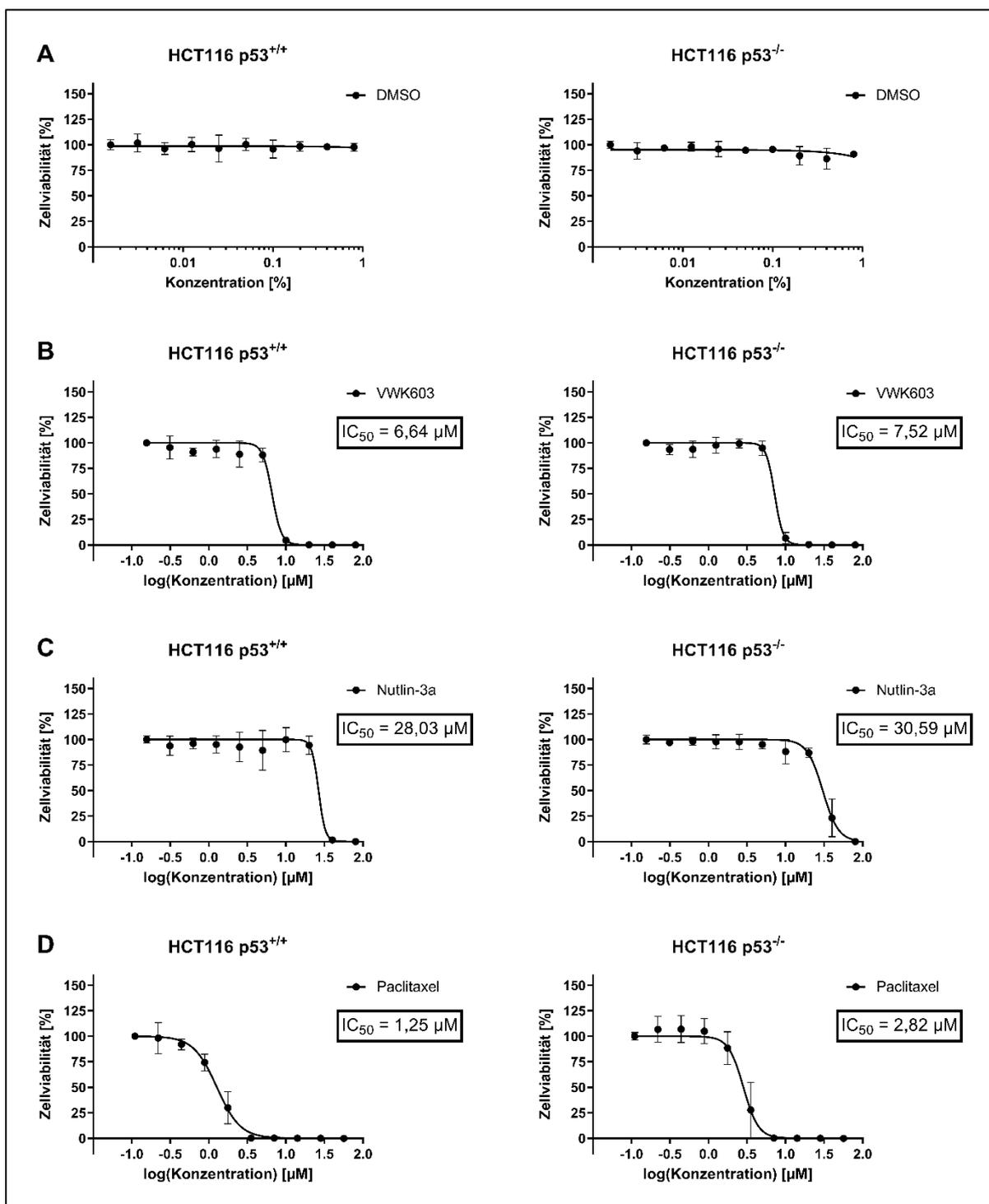
Die Abbildung 16 stellt die Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Substanzen in den Kolonkarzinomzelllinien dar. Für DMSO sind auf der x-Achse die Konzentration in Prozent und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) in Prozent aufgetragen. Für die Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel sind auf der x-Achse die Konzentration als logarithmische Konzentration in der Einheit Mikromol und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) in Prozent aufgetragen. Für DMSO konnte für keine der getesteten Konzentrationen in den beiden Zelllinien eine signifikante Veränderung der Zellviabilität gemessen werden. Bei den

getesteten Wirkstoffen wurde in den beiden Zelllinien für Paclitaxel der geringste  $IC_{50}$ -Wert bestimmt, während die  $IC_{50}$  von Nutlin-3a am höchsten lag.

Im Einzelnen ergaben sich für die Zelllinie HCT116 p53<sup>+/+</sup> eine  $IC_{50}$  von  $1,25 \pm 0,20 \mu\text{M}$  für Paclitaxel und eine  $IC_{50}$  von  $6,64 \pm 0,50 \mu\text{M}$  für VWK603. Für Nutlin-3a wurde in dieser Zelllinie eine  $IC_{50}$  von  $28,03 \pm 6,66 \mu\text{M}$  bestimmt [1, 2]. Verglichen mit Paclitaxel und VWK603 lag sie um die Faktoren 22,42 und 4,22 höher [2]. Beim Vergleich zwischen der  $IC_{50}$  von Paclitaxel und VWK603 bestand ein 5,31-facher Konzentrationsunterschied.

Für die Zelllinie HCT116 p53<sup>-/-</sup> wurden  $IC_{50}$ -Werte im ähnlichen Konzentrationsbereich ermittelt. Bei Paclitaxel betrug hier die  $IC_{50}$   $2,82 \pm 0,80 \mu\text{M}$  und für VWK603  $7,52 \pm 1,00 \mu\text{M}$  [1, 2]. Die  $IC_{50}$  von Nutlin-3a lag mit einem Wert von  $30,59 \pm 4,86 \mu\text{M}$  [1, 2] um die Faktoren 10,85 und 4,07 höher als die von Paclitaxel und VWK603 [2]. Beim Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von Paclitaxel und VWK603 bestand ein 2,67-facher Konzentrationsunterschied.

Die Tabelle 18 fasst die  $IC_{50}$ -Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen in der jeweiligen Zelllinie zusammen. Für die Berechnung eines signifikanten Unterschieds der jeweiligen Wirkstoff- $IC_{50}$ -Werte zwischen den beiden Zelllinien wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit dem anschließenden Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt. Zusammenfassend wurde in beiden Kolonkarzinomzelllinien eine konzentrationsabhängige Zellviabilitätsreduktion durch alle getesteten Substanzen beobachtet [1, 2], wobei die  $IC_{50}$ -Werte für Nutlin-3a und VWK603 in der Zelllinie HCT116 p53<sup>-/-</sup> geringfügig höher als in der Zelllinie HCT116 p53<sup>+/+</sup> lagen und der Unterschied bei Paclitaxel um den Faktor von ca. 2,26 hierbei etwas höher ausfiel. Die statistische Analyse ergab jedoch für diese Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien kein signifikantes Ergebnis. Es ergab sich somit kein signifikanter Unterschied der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit vom p53-Status [1, 2].



**Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603, Nutlin-3a, Paclitaxel und DMSO in den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout.**

Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die Zelllinien HCT116 p53<sup>+/+</sup> und HCT116 p53<sup>-/-</sup> zweimal für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen DMSO [Lösungsmittelkontrolle] (A), VWK603 (B), Nutlin-3a (C) oder Paclitaxel (D) inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte anhand von GraphPad Prism. Dargestellt ist der Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils vier Replikaten (n = 3) [1, 2]. (A, B, C, D jeweils linke Diagramme: HCT116 p53<sup>+/+</sup>; rechte Diagramme: HCT116 p53<sup>-/-</sup>.)

Teile der Abbildung (untere Hälfte) sind unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International-Lizenz lizenziert, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium oder Format erlaubt [204]. Es wurden Elemente der publizierten Abbildung verwendet und modifiziert [1]. Erstellung mittels GraphPad Prism.

Teile der Abbildung (obere Hälfte) wurden ebenfalls mit GraphPad Prism erstellt. Teil (B) der Abbildung wurde nach [2] mit entsprechender Genehmigung modifiziert.

**Tabelle 18: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel in den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout und Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen zwischen den beiden Zelllinien.**

	HCT116 p53 <sup>+/+</sup>	HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	Signifikanz beim Vergleich der IC <sub>50</sub> zwischen den beiden Zelllinien
VWK603 IC <sub>50</sub> ± SD [µM]	6,64 ± 0,50	7,52 ± 1,00	ns
Nutlin-3a IC <sub>50</sub> ± SD [µM]	28,03 ± 6,66	30,59 ± 4,86	ns
Paclitaxel IC <sub>50</sub> ± SD [µM]	1,25 ± 0,20	2,82 ± 0,80	ns

Die Tabelle fasst die IC<sub>50</sub>-Werte für die Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel in der Zelllinie HCT116 mit einem p53-Wildtyp (p53<sup>+/+</sup>) oder einem p53-Knockout (p53<sup>-/-</sup>) zusammen. Angegeben sind die IC<sub>50</sub>-Werte in Mikromolar [µM] als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD) [1, 2]. Im Anschluss wurden die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der einzelnen Substanzen zwischen den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp (p53<sup>+/+</sup>) und p53-Knockout (p53<sup>-/-</sup>) miteinander verglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied der jeweiligen Substanzen in Abhängigkeit vom p53-Status vorliegt. Zur Überprüfung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt. ns: nicht signifikant. [1, 2].

Eigene Darstellung der Tabelle in Anlehnung an [1, 2].

Zur Beurteilung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Substanzen in der jeweiligen Zelllinie vorliegt, wurde ebenfalls eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem anschließenden Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt [2].

Beim Vergleich zwischen der IC<sub>50</sub> der Substanzen VWK603 und Nutlin-3a lag ein hoch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ) jeweils in beiden Zelllinien vor [2]. Weiterhin wurde auch ein hoch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ) zwischen der IC<sub>50</sub> von Paclitaxel und Nutlin-3a in beiden Zelllinien erreicht. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen VWK603 und Paclitaxel lag in der Zelllinie HCT116 p53<sup>+/+</sup> vor ( $p < 0,05$ ) [2]. Die Tabelle 19 fasst die Ergebnisse dieser Fragestellung zusammen.

**Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse beim Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel in der jeweiligen Zelllinie HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout.**

Vergleich der Wirkstoffgruppen	Signifikanz bei HCT116 p53 <sup>+/+</sup> (p-Wert)	Signifikanz bei HCT116 p53 <sup>-/-</sup> (p-Wert)
VWK603 vs. Nutlin-3a	< 0,0001	< 0,0001
VWK603 vs. Paclitaxel	< 0,05	ns
Nutlin-3a vs. Paclitaxel	< 0,0001	< 0,0001

Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der einzelnen Substanzen in den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp (p53<sup>+/+</sup>) und p53-Knockout (p53<sup>-/-</sup>) wurden miteinander verglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Substanzen in der jeweiligen Zelllinie besteht. Zur Überprüfung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test durchgeführt. ns: nicht signifikant. [2].

Modifizierte Tabelle nach [2] mit entsprechender Genehmigung.

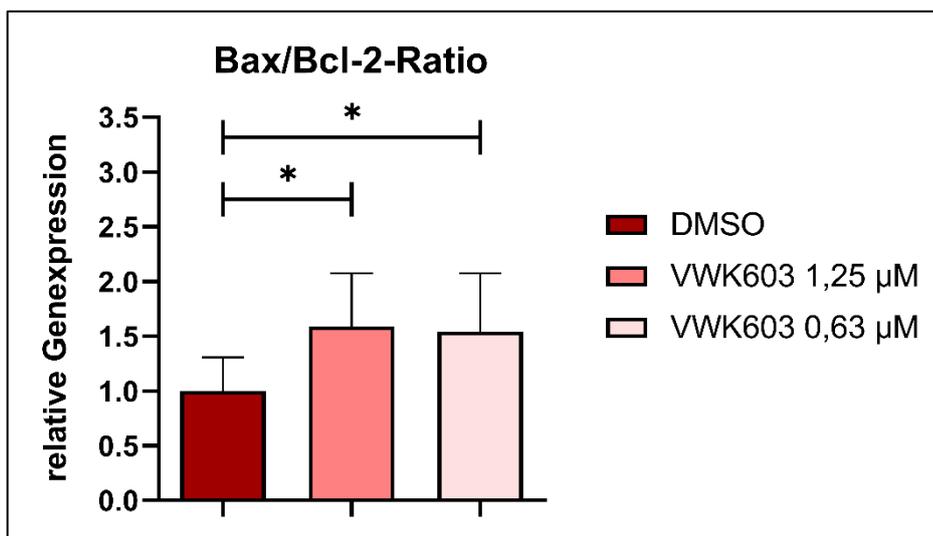
### 3.4 Charakterisierung des Einflusses auf die zelluläre Apoptoseinduzierbarkeit

Es ist bekannt, dass MDM2-Inhibitoren eine Apoptose induzieren [142]. Dabei spielen die Proteine Bax und Bcl-2 in der Apoptose eine wichtige Rolle. Eine Erhöhung des proapoptotischen Bax führt zur Verbesserung der Sensitivität auf die apoptoseinduzierenden Stimuli und Verbesserung der Reduktion des Tumorwachstums beim Mammakarzinom [205], während eine Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl-2 zur Verbesserung der Wirksamkeit der Chemotherapeutika führt [206]. Die Bax/Bcl-2-Ratio beeinflusst die Apoptosesensitivität der Zellen [134, 136, 207]. Somit zeigt eine erhöhte Bax/Bcl-2-Ratio, dass die Zellen sensitiver auf apoptoseinduzierende Stimuli reagieren [134, 136, 207, 208].

Zur Untersuchung, ob VWK603 in nicht toxischen Konzentrationen die Apoptoseinduzierbarkeit erhöht, wurde in diesem Versuch VWK603 in nicht toxischen Konzentrationen von 1,25  $\mu\text{M}$  und 0,63  $\mu\text{M}$  zu den MDA-MB-231-Zellen gegeben. Als negative Kontrolle diente die Lösemittelkontrolle DMSO. Es erfolgte eine einmalige 72-stündige Inkubation mit jeweils einer der beiden Substanzen. Nach der mRNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte die Bestimmung der apoptoserelevanten Gene Bax und Bcl-2 mittels qRT-PCR. Die Bax/Bcl-2-Ratio ergibt sich aus dem Verhältnis der Genexpression der beiden Gene zueinander. Anschließend erfolgte eine Normierung auf die Lösemittelkontrolle DMSO mit 1 [2].

Die Abbildung 17 stellt das Ergebnis dar. Auf der y-Achse ist die Bax/Bcl-2-Ratio angegeben. Zum Vergleich, ob die Bax/Bcl-2-Ratio durch VWK603 signifikant verändert wird, wurden die Ratios mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test durchgeführt [2].

VWK603 erhöhte die Bax/Bcl-2-Ratio mit einer Konzentration von 0,63  $\mu\text{M}$  um das 1,54-Fache im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Mittelwert:  $1,54 \pm 0,53$ ). Mit einer Konzentration von 1,25  $\mu\text{M}$  wurde eine vergleichbare Bax/Bcl-2-Ratio (Mittelwert:  $1,59 \pm 0,49$ ) erreicht. Es ließ sich insgesamt eine signifikante Erhöhung der Bax/Bcl-2-Ratio durch VWK603 in den beiden nicht toxischen Konzentrationen beobachten [2]. Die Tabelle 20 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 17: VWK603 erhöht die Bax/Bcl-2-Ratio in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen.**

MDA-MB-231-Zellen wurden entweder mit 0,63 µM VWK603, 1,25 µM VWK603 oder DMSO [Lösemittelkontrolle] für 72 Stunden inkubiert. Nach der mRNA-Isolation und cDNA-Synthese der Proben erfolgte mittels qRT-PCR die Bestimmung der Genexpression der Gene Bax und Bcl-2. Die Bestimmung der Bax/Bcl-2-Ratio erfolgte durch die Berechnung des Verhältnisses der Gene [2]. Die Abbildung zeigt die Bax/Bcl-2-Ratio der jeweiligen Substanz. Dargestellt ist die Bax/Bcl-2-Ratio als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test. \*: p < 0,05. [2].

Abbildung mit GraphPad Prism erstellt, modifiziert nach [2] mit entsprechender Genehmigung.

**Tabelle 20: Zusammenfassung der Bax/Bcl-2-Ratio von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen.**

Substanz	Bax/Bcl-2-Ratio	Signifikanz gegenüber DMSO (p-Wert)
DMSO	1,00 ± 0,31	-
VWK603 0,63 µM	1,54 ± 0,53	< 0,05
VWK603 1,25 µM	1,59 ± 0,49	< 0,05

Die Tabelle fasst die Bax/Bcl-2-Ratios in der Zelllinie MDA-MB-231 zusammen. Angegeben sind die Bax/Bcl-2-Ratios als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test [2].

Die relative Genexpression der einzelnen Gene Bax und Bcl-2 wurde aus dem Versuch ebenfalls bestimmt und auf die *housekeeping* Gene GAPDH oder HPRT1 normalisiert. Es zeigten sich keine signifikanten veränderten Genexpressionen in den MDA-MB-231-Zellen mit beiden Konzentrationen VWK603 gegenüber DMSO (Abb. 18, Tabellen 21 und 22).

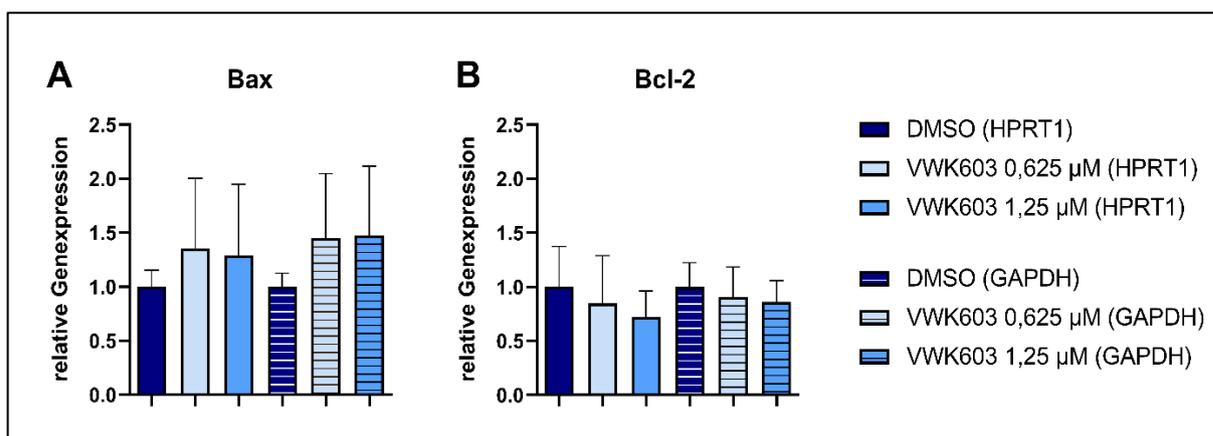


Abb. 18: Darstellung der relativen Genexpression der Apoptosegene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in der Zelllinie MDA-MB-231.

MDA-MB-231-Zellen wurden entweder mit 0,63  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  VWK603 oder DMSO [Lösungsmittelkontrolle] für 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte mittels qRT-PCR die Messung der Expression der Gene Bax (A) und Bcl-2 (B) nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese. Dargestellt ist die auf die *housekeeping* Gene HPRT1 und GAPDH normalisierte relative Genexpression der jeweiligen apoptoserelevanten Gene als Mittelwert mit den Standardabweichungen (SD) aus drei unabhängigen Versuchen ( $n = 3$ ). Die statistische Auswertung erfolgte durch die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test.

Tabelle 21: Zusammenfassung der relativen Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen (normalisiert auf GAPDH).

Substanz	Bax (GAPDH)	Signifikanz	
		Bax (DMSO vs. VWK603)	Bcl-2 (DMSO vs. VWK603)
DMSO	1,00 $\pm$ 0,13	-	1,00 $\pm$ 0,23
VWK603 0,63 $\mu\text{M}$	1,45 $\pm$ 0,60	ns	0,91 $\pm$ 0,28
VWK603 1,25 $\mu\text{M}$	1,47 $\pm$ 0,64	ns	0,86 $\pm$ 0,20

Die Tabelle fasst die relative Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 bei Behandlung mit VWK603 oder DMSO [Lösungsmittelkontrolle] zusammen. Dargestellt ist die auf das *housekeeping* Gen GAPDH normalisierte relative Genexpression des jeweiligen Gens als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen für die Zelllinie MDA-MB-231. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test. ns: nicht signifikant.

Tabelle 22: Zusammenfassung der relativen Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen (normalisiert auf HPRT1).

Substanz	Bax (HPRT1)	Signifikanz	
		Bax (DMSO vs. VWK603)	Bcl-2 (DMSO vs. VWK603)
DMSO	1,00 $\pm$ 0,15	-	1,00 $\pm$ 0,37
VWK603 0,63 $\mu\text{M}$	1,35 $\pm$ 0,65	ns	0,85 $\pm$ 0,44
VWK603 1,25 $\mu\text{M}$	1,29 $\pm$ 0,66	ns	0,72 $\pm$ 0,24

Die Tabelle fasst die relative Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 bei Behandlung mit VWK603 oder DMSO [Lösungsmittelkontrolle] zusammen. Dargestellt ist die auf das *housekeeping* Gen HPRT1 normalisierte relative Genexpression des jeweiligen Gens als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen für die Zelllinie MDA-MB-231. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test. ns: nicht signifikant.

### 3.5 Toxizitätstestung in nicht malignen Zellen

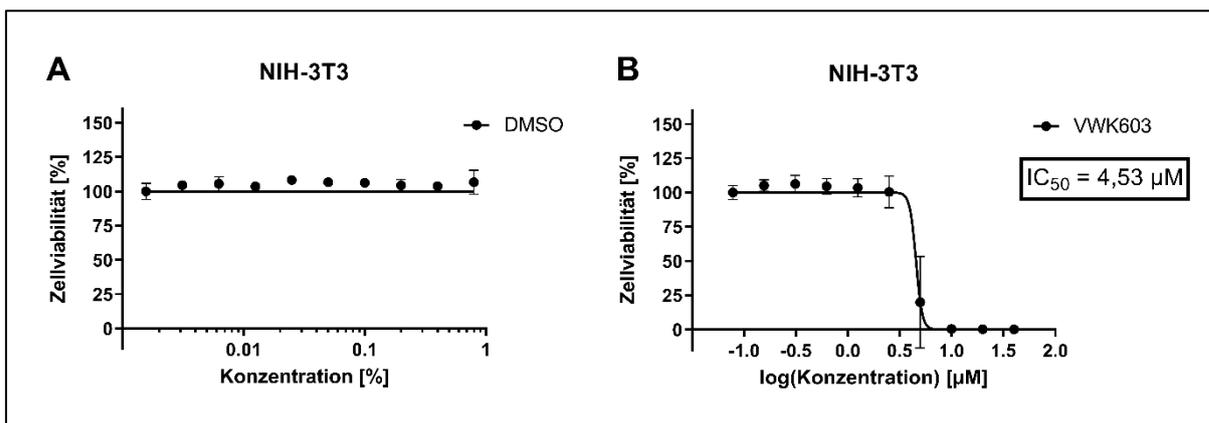
Zur *in-vitro*-Bestimmung eines möglichen therapeutischen Fensters und zur Ermittlung von potenziellen Nebenwirkungen können verschiedene Zelllinien als Modelle herangezogen werden. In der Vergangenheit konnten für MDM2-Inhibitoren verschiedene Nebenwirkungen sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien gezeigt werden. Zu den typischen Nebenwirkungen gehören Übelkeit, Diarrhoen, Myelosuppression und unterschiedliche Infektionen [142].

In diesem Versuch wurden MCF-10A-Zellen als Modell für nicht maligne Brustepithelzellen untersucht. Darüber hinaus wurden NIH-3T3-Fibroblasten herangezogen, die häufig im Rahmen toxischer Studien als *in-vitro*-Modell gesunder Zellen genutzt werden [209]. Der Versuchsaufbau erfolgte vergleichbar zu den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Versuchen.

Zuerst wurde die Untersuchung in den NIH-3T3-Fibroblasten durchgeführt. Dabei wurden diese entweder mit VWK603 oder DMSO (Lösemittelkontrolle) behandelt. Es erfolgte auch hier wie bei den TNBC-Zellen eine zweimalige 72-stündige Inkubation mit den Konzentrationen zwischen 0,31  $\mu\text{M}$  und 80  $\mu\text{M}$ . Die Zellviabilität wurde anschließend mittels des CellTiter-Glo Assays gemessen. Anhand von GraphPad Prism wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven und die dazugehörigen  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt.

Die Abbildung 19 stellt die Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Substanzen VWK603 und DMSO in den NIH-3T3-Fibroblasten dar. Für DMSO sind auf der x-Achse die Konzentration logarithmisch in Prozent und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen. Für VWK603 sind auf der x-Achse die Konzentration als logarithmische Konzentration linear in der Einheit Mikromol und auf der y-Achse die Wirkung (hier ebenfalls die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen.

Bei den NIH-3T3-Fibroblasten wurde für VWK603 eine  $\text{IC}_{50}$  von  $4,53 \pm 1,31 \mu\text{M}$  ermittelt (Abb. 19, Tabelle 23). Hingegen konnte keine  $\text{IC}_{50}$  bei der Zugabe der Lösemittelkontrolle von DMSO bestimmt werden.



**Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603 und DMSO in NIH-3T3-Fibroblasten.**

Zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte wurden NIH-3T3-Fibroblasten zweimal für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen DMSO [Lösungsmittelkontrolle] (A) oder VWK603 (B) inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte anhand von GraphPad Prism. Dargestellt ist der Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens vier Replikaten ( $n = 3$ ).

**Tabelle 23:  $IC_{50}$ -Wert der Substanz VWK603 in der Zelllinie NIH-3T3.**

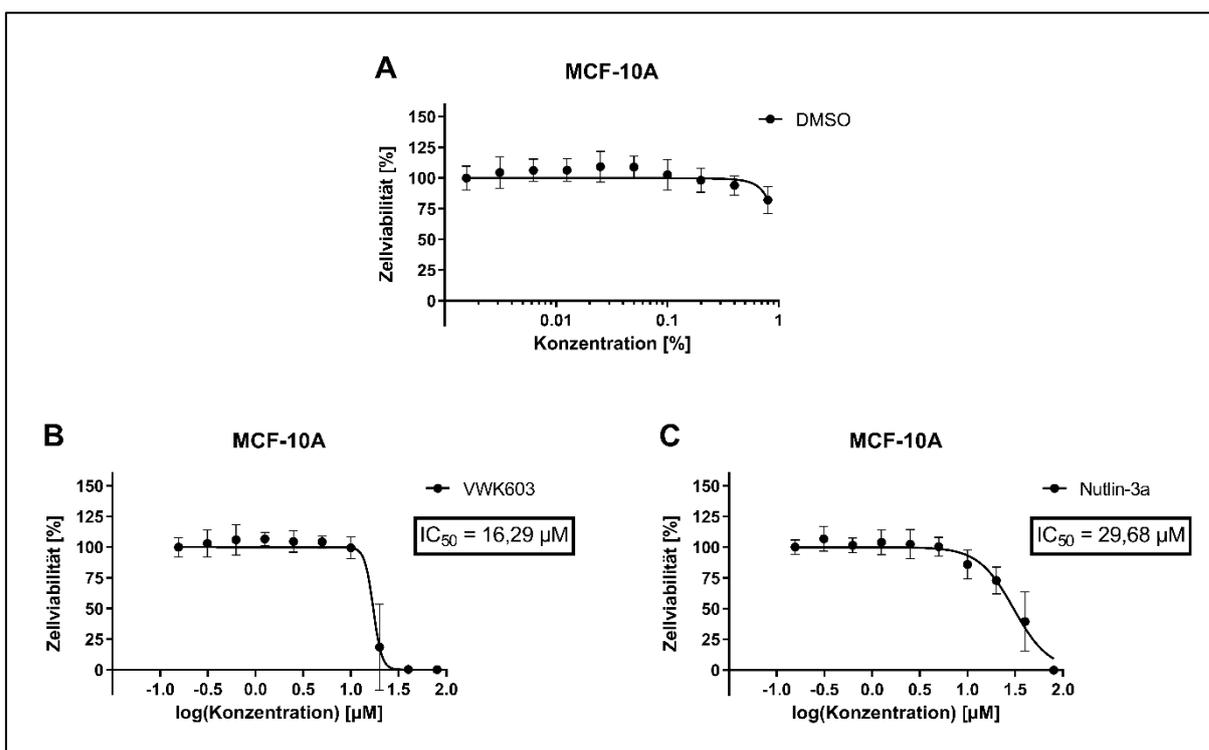
Zelllinie	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]
NIH-3T3	4,53 $\pm$ 1,31

Die Tabelle stellt den  $IC_{50}$ -Wert für die Substanz VWK603 in der Zelllinie NIH-3T3 dar. Angegeben ist der  $IC_{50}$ -Wert in Mikromolar [ $\mu M$ ] als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD).

Im folgenden Versuch mit den MCF-10A-Zellen wurde zusätzlich Nutlin-3a als Vergleichssubstanz verwendet. Der Versuchsablauf erfolgte vergleichbar zu dem der NIH-3T3-Fibroblasten.

Die Abbildung 20 stellt die Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Substanzen VWK603, Nutlin-3a und DMSO (Lösungsmittelkontrolle) in den MCF-10A-Zellen dar. Für DMSO sind auf der x-Achse die Konzentration logarithmisch in Prozent und auf der y-Achse die Wirkung (hier die Zellviabilität) linear in Prozent dargestellt. Für VWK603 und Nutlin-3a sind auf der x-Achse die Konzentration als logarithmische Konzentration linear in der Einheit Mikromol und auf der y-Achse die Wirkung (hier ebenfalls die Zellviabilität) linear in Prozent aufgetragen. Bei der Zugabe der Lösungsmittelkontrolle von DMSO konnte keine  $IC_{50}$  in den MCF-10A-Zellen bestimmt werden. Für VWK603 betrug die  $IC_{50}$   $16,29 \pm 4,65 \mu M$  [2]. Aus dem Versuch mit der Vergleichssubstanz Nutlin-3a in den Zellen ergab sich um eine 1,82-fach höhere  $IC_{50}$  von  $29,68 \pm 2,98 \mu M$  [1, 2].

Zum Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte der beiden MDM2-adressierenden Inhibitoren miteinander wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt. Dabei ergab sich ein hoch signifikanter Konzentrationsunterschied bei der Zellviabilitätsreduktion ( $p < 0,0001$ ) in der MCF-10A-Zelllinie (Tabelle 24) [2].



**Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603, Nutlin-3a und DMSO in MCF-10A-Zellen.**

Zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte wurden MCF-10A-Zellen zweimal für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen DMSO [Lösungsmittelkontrolle] (A), VWK603 (B) oder Nutlin-3a (C) inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des CellTiter-Glo Assays bestimmt. Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte anhand von GraphPad Prism. Dargestellt ist der Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens vier Replikaten ( $n = 3$ ) [1, 2].

Teil (B) der Abbildung wurde mit GraphPad Prism erstellt, mit Modifikationen nach [2] und mit entsprechender Genehmigung. Teil (C) der Abbildung ist unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International-Lizenz lizenziert, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Reproduktion in jedem Medium oder Format erlaubt [204]. Es wurden Elemente der publizierten Abbildung verwendet und modifiziert [1]. Erstellung mittels GraphPad Prism.

**Tabelle 24: Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte und Vergleich der Substanzen VWK603 und Nutlin-3a in der Zelllinie MCF-10A.**

Zelllinie	VWK603 $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Nutlin-3a $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Signifikanz (p-Wert)
MCF-10A	16,29 $\pm$ 4,65	29,68 $\pm$ 2,98	< 0,0001

Die Tabelle stellt die  $IC_{50}$ -Werte für die Substanzen VWK603 [2] und Nutlin-3a [1, 2] in den MCF-10A-Zellen dar. Angegeben sind die  $IC_{50}$ -Werte in Mikromolar [ $\mu M$ ] mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zur Überprüfung, ob sich die  $IC_{50}$ -Werte der beiden Substanzen signifikant voneinander unterscheiden, wurden die Werte mittels des zweiseitigen ungepaarten t-Tests verglichen [2].

Eigene Darstellung der Tabelle in Anlehnung an [1, 2].

Zur Unterscheidung, ob ein signifikanter Dosisunterschied zwischen gesunden und karzinösen Zellen bei Behandlung von VWK603 vorliegt, wurde die  $IC_{50}$  der MCF-10A-Zelllinie mit den  $IC_{50}$  der TNBC-Zelllinien mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test miteinander verglichen. Auch für Nutlin-3a als Vergleichssubstanz wurde der Fragestellung nachgegangen, ob ein signifikanter Dosisunterschied gegenüber TNBC-Zellen besteht [2].

Die Konzentrationsdosis von VWK603 unterschied sich insgesamt hoch signifikant zwischen den gesunden und karzinösen Zellen (Tabelle 25). Dabei wurden in den MCF-10A-Zellen

gegenüber den MDA-MB-231-Zellen ein 2,48-fach höherer, gegenüber den MDA-MB-436-Zellen ein 2,75-fach höherer und gegenüber den MDA-MB-468-Zellen ein 4,44-fach höherer  $IC_{50}$ -Wert ermittelt [2]. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 25 aufgelistet. Für Nutlin-3a konnte ebenfalls ein hoch signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen gesunden und karzinösen Brustzellen beobachtet werden, der jedoch geringer ausfiel (Tabelle 26) [2]. Dabei wurden in den MCF-10A-Zellen gegenüber den MDA-MB-231-Zellen ein 1,28-fach höherer, gegenüber den MDA-MB-436-Zellen ein 1,42-fach höherer und gegenüber den MDA-MB-468-Zellen ein 1,53-fach höherer  $IC_{50}$ -Wert ermittelt [2].

**Tabelle 25: Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte und Vergleich der Substanz VWK603 zwischen gesunden und karzinösen Brustzellen.**

Vergleich der Zelllinien	VWK603 $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Signifikanz gegenüber MCF-10A (p-Wert)
MCF-10A	16,29 $\pm$ 4,65	-
vs. MDA-MB-231	6,58 $\pm$ 1,53	< 0,0001
vs. MDA-MB-436	5,93 $\pm$ 1,86	< 0,0001
vs. MDA-MB-468	3,67 $\pm$ 1,62	< 0,0001

Die Tabelle stellt die  $IC_{50}$ -Werte für die Substanz VWK603 in den Zelllinien MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 dar. Angegeben sind die  $IC_{50}$ -Werte in  $\mu M$  mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zur Überprüfung, ob die Substanz VWK603 in den nicht malignen Brustzellen MCF-10A gegenüber den TNBC-Zelllinien signifikant eine erhöhte  $IC_{50}$  aufweist, wurde der  $IC_{50}$ -Wert der Zelllinie MCF-10A mit den  $IC_{50}$ -Werten der TNBC-Zelllinien mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test verglichen [2]. Eigene Darstellung der Tabelle mit Daten aus [2].

**Tabelle 26: Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte und Vergleich der Substanz Nutlin-3a zwischen gesunden und karzinösen Brustzellen.**

Vergleich der Zelllinien	Nutlin-3a $IC_{50} \pm SD$ [ $\mu M$ ]	Signifikanz gegenüber MCF-10A (p-Wert)
MCF-10A	29,68 $\pm$ 2,98	-
vs. MDA-MB-231	23,15 $\pm$ 1,00	< 0,0001
vs. MDA-MB-436	20,84 $\pm$ 0,49	< 0,0001
vs. MDA-MB-468	19,36 $\pm$ 0,48	< 0,0001

Die Tabelle stellt die  $IC_{50}$ -Werte für die Substanz Nutlin-3a in den Zelllinien MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 dar. Angegeben sind die  $IC_{50}$ -Werte in  $\mu M$  mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zur Überprüfung, ob die Substanz Nutlin-3a in den nicht malignen Brustzellen MCF-10A gegenüber den TNBC-Zelllinien signifikant eine erhöhte  $IC_{50}$  aufweist, wurde der  $IC_{50}$ -Wert der Zelllinie MCF-10A mit den  $IC_{50}$ -Werten der TNBC-Zelllinien mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-Test als Post-hoc-Test verglichen [2]. Eigene Darstellung der Tabelle mit Daten aus [1, 2].

## 4 Diskussion

### 4.1 Übersicht

In der folgenden Diskussion werden die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse im Hinblick auf die grundlegende Aufgabenstellung der pharmakologischen Charakterisierung des neuartigen MDM2-spezifischen  $\alpha$ -Helix-Mimetikums VWK603 in Zellkulturmodellen zur zielgerichteten Therapie des *triple*-negativen Mammakarzinoms hin analysiert und im medizinisch-wissenschaftlichen Kontext diskutiert. Dabei gliedert sich die Diskussion in fünf Teile:

- I. Im ersten Abschnitt (Kap. 4.2) wird die in der Arbeit ermittelte pharmakologische Wirksamkeit von VWK603 in den gewählten TNBC-Zelllinien betrachtet.
- II. Im zweiten Kapitel (Kap. 4.3) wird detailliert auf den grundlegenden Mechanismus der in Kapitel 4.2 diskutierten Antitumorwirkung eingegangen.
- III. Im dritten Abschnitt der Diskussion (Kap. 4.4) wird das Potenzial von VWK603 in einer zukünftigen medizinischen Verwendung als spezifischer Wirkstoff zur zielgerichteten Therapie des TNBC erörtert.
- IV. Im Kapitel „Limitationen und Ausblick“ (Kap. 4.5) wird zum einen auf die Grenzen der wissenschaftlichen Aussagekraft der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eingegangen. Zum anderen werden die zukünftigen Schritte zur erfolgreichen Weiterführung des Projektes dargestellt.
- V. Im letzten Abschnitt (Kap. 4.6) werden in einer Schlussfolgerung die wesentlichen Erkenntnisse der Diskussion zusammengefasst.

### 4.2 Untersuchung der pharmakologischen Wirksamkeit von VWK603 in TNBC-Zellen und Vergleich zu Nutlin-3a

Das TNBC macht 10 bis 20 % aller Mammakarzinome aus [12-14]. Als TNBC werden Mammakarzinome definiert, die immunhistochemisch keine bis kaum Hormonrezeptoren und HER2-Rezeptoren aufweisen [6, 13, 15]. Gemäß den Leitlinien besteht die Therapie aus einer Kombination von zwei Chemotherapeutika, aus Taxanen und Anthrazyklinen [6, 17]. Seit Anfang 2023 ist der Einsatz des PD-1-Inhibitors Pembrolizumab in Kombination mit den Chemotherapeutika möglich [17]. Es werden jedoch weiterhin dringend neue Therapieansätze gesucht, um die Prognosen des TNBC zu verbessern. Eine Möglichkeit stellt der therapeutische Ansatz mit MDM2-Inhibitoren dar [27]. Die Anwendung eines MDM2-Inhibitors führt zur Inhibition der Interaktion zwischen MDM2 und p53 in p53-Wildtyp-Tumoren, sodass p53 folglich die Apoptose induziert [142]. In den vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe „Wirkstoffentwicklung“ der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitätsklinikum

Düsseldorf wurde ein neuartiges Verfahren für ein *drug screening* auf apoptoseinduzierende Substanzen entwickelt und in einem Wirkstoffscreening in MDA-MB-231-Zellen der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor VWK603 identifiziert. Dieser induzierte in dem Screening bei 10  $\mu\text{M}$  in den MDA-MB-231-Zellen einen programmierten Zelltod [2]. Die Ergebnisse dieser Vorarbeiten dienten in der hier durchgeführten Arbeit als Basis zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung des Wirkstoffs.

Hinsichtlich der Fragestellung, ob der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor in p53-mutierten TNBC-Zellen die Zellviabilität reduziert, wurden in dieser Arbeit zur Bestimmung der pharmakologischen Wirksamkeit von VWK603 Dosis-Wirkungs-Kurven mit den zugehörigen  $\text{IC}_{50}$ -Werten in den drei TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468 erstellt. Hierbei zeigten die Ergebnisse, dass VWK603 eine vergleichbare  $\text{IC}_{50}$  zwischen 3,67  $\mu\text{M}$  und 6,58  $\mu\text{M}$  in allen drei TNBC-Zelllinien erzielte. Darüber hinaus wurde der bereits in der präklinischen Phase etablierte MDM2-Inhibitor Nutlin-3a als Referenz herangezogen. Hierbei reduzierte VWK603 signifikant in einer mindestens 3,5-fach geringeren Konzentration die Zellviabilität als Nutlin-3a (s. Tabelle 17) [2]. Basierend auf den Ergebnissen aus den Kapiteln 3.1 und 3.2 kann somit geschlossen werden, dass VWK603 zum einen die Zellviabilität in TNBC-Zellen effizient reduziert und zum anderen hierbei eine höhere pharmakologische Potenz (Wirkstärke) als Nutlin-3a besitzt [2].

Insgesamt lassen sich in der Literatur insbesondere hinsichtlich einer tumorzelltoxischen Wirkung nur sehr vereinzelte Studien von MDM2-Inhibitoren in TNBC-Zellen finden. Für Nutlin-3a untersuchten lediglich Fan *et al.* im Rahmen von synergistischen Studien zu Chemotherapeutika die Wirkung des MDM2-Inhibitors allein auf die Zellviabilität von MDA-MB-231-Zellen. Dabei beschreibt Fan mit 25,36  $\mu\text{M}$  eine zu den in dieser Arbeit vergleichbare  $\text{IC}_{50}$  [179]. Auch in der Arbeit von Tonsing-Carter *et al.* wurden TNBC-Zellen mit Nutlin-3a behandelt. Hier wurde aber nicht die Zellviabilität, sondern lediglich die Auswirkung auf die Zellproliferation untersucht und kein Einfluss auf die Zellviabilität gefunden. Die  $\text{IC}_{50}$  von 23,80  $\mu\text{M}$  für die Zelllinie MDA-MB-468 und die etwas höher liegende  $\text{IC}_{50}$  von 40,20  $\mu\text{M}$  für die Zelllinie MDA-MB-231 für die Zellproliferation lagen dabei in einer vergleichbaren Größenordnung wie die in dieser Arbeit für die Zellviabilität bestimmten Werte [161].

Beide Versuche von Fan *et al.* und Tonsing-Carter *et al.* unterscheiden sich gegenüber den in dieser Arbeit durchgeführten Studien allerdings sowohl in der Anwendung des Mediums als auch in der Inkubationszeit. Dabei wurden bei Tonsing-Carter *et al.* die Zellen für fünf Tage einmalig mit Nutlin-3a im Kultivierungsmedium behandelt [161], welches FCS enthielt und somit aufgrund der enthaltenen Wachstumsfaktoren [192, 193] das Wachstum des TNBC wahrscheinlich beeinflusste. Auch in den meisten Zellviabilitätsassays wurde das Kultivierungsmedium mit FCS verwendet bzw. es erfolgte in den Versuchsbeschreibungen keine Angabe eines serumreduzierten oder eines serumfreien Mediums ohne zusätzliche

FCS-Supplementierung (vgl. Arbeiten von [180, 210, 211]). In der Arbeit von Fan *et al.* wurde ebenfalls kein anderes Medium beim Zellviabilitätsassay erwähnt, sodass man bei dem von dieser Arbeitsgruppe erwähnten Medium von einer FCS-Supplementierung ausgehen kann [179]. In der hier durchgeführten Arbeit wurde jedoch bewusst ein für die serumfreie Kultivierung hergestelltes Medium verwendet, um die Wirkung von VWK603 auf die Tumorzellen ohne den Einfluss der in den verschiedenen Seren wie FCS unterschiedlich konzentrierten, stimulierenden Wachstumsfaktoren [192, 193] robust zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um ein Medium mit vom Hersteller ausgewählten chemisch definierten Komponenten [190], die für eine erfolgreiche Kultivierung essenziell sind (s. Kap. 2.2.2.3). In den nachfolgenden Diskussionen wird das in dieser Arbeit verwendete Medium (Assaymedium) nur noch als serumfreies Medium bezeichnet.

Trotz dieser methodischen Unterschiede lassen sich die  $IC_{50}$ -Werte der beiden untersuchten MDM2-adressierenden Inhibitoren VWK603 und Nutlin-3a neben denen von Fan *et al.* auch mit den Werten der meisten in der weiteren Literatur charakterisierten MDM2-Inhibitoren vergleichen. Dabei ist in vielen Studien der MDM2-Inhibitoren inklusive Nutlin-3a und deren weiterentwickelten Derivate Idasanutlin und RG7112 (überwiegend in Tumorzellen mit p53-Wildtyp) ebenfalls eine Wirkung im hoch nanomolaren bzw. im niedrig mikromolaren Konzentrationsbereich auf die Zellviabilität beschrieben [162-164, 180, 212, 213] (s. unten). Gemäß den hier aufgeführten Vergleichen mit den in der Literatur angegebenen Werten erscheint der in dieser Arbeit ermittelte Referenzwert für die  $IC_{50}$  des Nutlin-3a als valide und unterstreicht die für VWK603 gegenüber Nutlin-3a festgestellte erhöhte pharmakologische Potenz.

Trotz der gegenüber Nutlin-3a stärkeren pharmakologischen Wirkung liegen die für VWK603 ermittelten  $IC_{50}$ -Werte noch im (niedrigen) mikromolaren Bereich. Im Bereich der heutigen Entwicklung klinischer Wirkstoffe werden jedoch  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich angestrebt [212]. Aus diesem Grund sollte für VWK603 in Zukunft zur Verbesserung des therapeutischen Effekts eine Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften angestrebt werden. Dies ist auch für nachfolgende Derivate von Nutlin-3a, wie bereits oben erwähnt, bei p53-Wildtyp-Tumoren durchgeführt worden [163, 164]. So zeigten die in den klinischen Studien eingesetzten MDM2-Inhibitoren Idasanutlin und RG7112 eine zellviabilitätsreduzierende Wirkung *in vitro* bereits im nanomolaren Bereich bei verschiedenen p53-Wildtyp-Tumoren ( $IC_{50}$ : 30 – 400 nM) [164]. In der Studie von Tovar *et al.* lag die  $IC_{50}$  für einige p53-Wildtyp-Tumoren nach der Behandlung mit RG7112 im niedrig mikromolaren Bereich (< 2,20  $\mu$ M) [163]. Interessanterweise konnte ebenfalls eine Zellviabilitätsreduktion in Tumoren mit p53-Mutationen beobachtet werden, wobei die durchschnittliche  $IC_{50}$  dort jedoch um das mindestens 14-Fache erhöht im mikromolaren Bereich (5,70 – 20,30  $\mu$ M) lag [163, 164]. In p53-mutierten TNBC-Zellen konnte mit natürlichen oder synthetisch hergestellten MDM2-Inhibitoren eine Zellviabilitätsreduktion mit einer  $IC_{50}$  ebenfalls im mikromolaren

Konzentrationsbereich gezeigt werden [180, 210, 214, 215]. Fan *et al.* zeigten in p53-mutierten TNBC-Zellen sogar eine Zellviabilitätsreduktion mit ihrem nicht klinischen Inhibitor erstmalig im nanomolaren Bereich ( $IC_{50}$ : 33,16 – 41,49 nM) [179]. Diese Arbeiten legen dar, dass eine antitumorale Wirkung durch MDM2-Inhibitoren im nanomolaren Bereich erzielt werden kann, wobei dieses pharmakologische Ziel auch in p53-mutierten TNBC-Zellen erreichbar scheint.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass der neu identifizierte Wirkstoff VWK603 effizient in p53-mutierten TNBC-Zellen die Zellviabilität reduziert [2]. Zwar erreicht VWK603 hierbei mit seiner pharmakologischen Wirkung *in vitro* im mikromolaren Bereich nicht die heutzutage für klinische Wirkstoffe angestrebte pharmakologische Potenz, könnte aber als neuartiges  $\alpha$ -Helix-Mimetikum das Spektrum der MDM2-Inhibitoren und der therapeutischen Behandlung erweitern. Dies lässt sich damit begründen, dass zum einen auch die bisher eingesetzten klinischen MDM2-Inhibitoren bei p53-mutierten Tumoren keine Wirkung im nanomolaren Bereich zeigen (vgl. Studien von [61, 163, 164]) und zum anderen aufgrund neuer möglicher Resistenzbildungen in Tumoren die Identifizierung weiterer MDM2-spezifischer Inhibitoren bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien eine wichtige Rolle spielt [61]. Darüber hinaus sollte durch zukünftige medizinalchemische Leitstrukturoptimierungen eine deutliche Wirkung von VWK603 im nanomolaren Bereich realisiert werden können.

### 4.3 Charakterisierung des Wirkmechanismus von VWK603

#### 4.3.1 Induktion des Zelltodes durch Apoptose

In dieser Arbeit ließ sich in verschiedenen TNBC-Zellkulturmodellen eine potente Reduktion der Zellviabilität durch VWK603 beobachten (Kap. 3.1) [2]. Zur Untersuchung der Ursache des Zelltods und zur Evaluierung einer möglichen Apoptoseinduktion durch VWK603 über die MDM2-Inhibition wurden die für die Apoptose über den intrinsischen Signalweg relevanten Proteine Bax und Bcl-2 herangezogen [2]. Dabei wurden die Zellen mit nicht toxischen Konzentrationen behandelt [2], um an vitalen Zellen eine mögliche erhöhte Apoptoseinduzierbarkeit bzw. verbesserte Empfindlichkeit gegenüber apoptoseinduzierenden Stimuli durch VWK603 zu bestimmen. Bargou *et al.* zeigten, dass eine Überexpression des proapoptotischen Proteins Bax zur Verbesserung der Sensitivität der Brustkrebszellen auf verschiedene apoptotische Stimuli führte [205]. Bezüglich des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass eine Inhibition des Bcl-2 die Apoptoseinduzierbarkeit in Kombination mit Chemotherapeutika in den TNBC-Zelllinien steigerte [140, 216, 217]. Allerdings wurde in einer Studie auch eine Überexpression von Bcl-2 als unabhängiger Biomarker für eine günstige Prognose bei allen Mammakarzinomsubtypen im Frühstadium beobachtet [218]. Offensichtlich ist jedoch nicht die Expressionshöhe der

einzelnen Proteine Bax und Bcl-2 für die valide Beurteilung einer Apoptoseinduzierbarkeit entscheidend. Das legen die Arbeiten von Oltvai *et al.* dar, in denen gezielt die Interaktion zwischen den Proteinen Bax und Bcl-2 untersucht wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Interaktion zwischen Bax und Bcl-2 essenziell für die Induzierbarkeit des Zelltods war [134]. Es wurde dabei gezeigt, dass vielmehr das Verhältnis von Bax und Bcl-2 zueinander eine größere Bedeutungsrelevanz über die Empfindlichkeit gegenüber den apoptoseinduzierenden Stimuli als der Wert der absoluten Expression der einzelnen Proteine besitzt [135] und somit dem Bax/Bcl-2-Verhältnis eine wichtigere Bedeutung bei der Einleitung der Apoptose insbesondere über den intrinsischen Signalweg zukommt [215, 219]. Eine erhöhte Bax/Bcl-2-Ratio zeigte hierbei eine erhöhte Sensitivität [134]. Klinisch verbesserte sie bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie die Chemosensitivität, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben [220].

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich zunächst keine signifikante alleinige Veränderung der Proteine Bax bzw. Bcl-2 durch VWK603 beobachten. Erst im Zusammenhang durch die Bildung der Ratio konnte eine signifikant erhöhte Apoptoseinduzierbarkeit gezeigt werden. Die Ratio lag für die beiden nicht toxischen Konzentrationen bei 1,54 ( $\pm 0,53$ ) und 1,59 ( $\pm 0,49$ ) [2]. Da, wie oben beschrieben, die Bax/Bcl-2-Ratio gegenüber der absoluten Expression der einzelnen Gene als wichtiger Parameter der zellulären Apoptoseinduzierbarkeit charakterisiert ist [135], zeigt dies, dass VWK603 signifikant die Apoptoseinduzierbarkeit von TNBC-Zellen erhöht und hierbei wahrscheinlich der intrinsische bzw. mitochondriale Weg maßgeblich ist [2].

Die in dieser Arbeit ermittelte Bax/Bcl-2-Ratio für VWK603 ist dabei mit einigen in der Literatur ermittelten Werten von MDM2-Inhibitoren vergleichbar:

Für Nutlin-3a konnte in einer leukämischen p53-Wildtyp-Zelllinie eine Verbesserung der Bax/Bcl-2-Ratio um das 2,13-Fache gezeigt werden [221]. Wang *et al.* beobachteten sogar unabhängig vom p53-Status eine verbesserte Bax/Bcl-2-Ratio in den hepatozellulären Karzinomzellen [222]. Die Apoptoseinduktion erfolgte durch die Aktivierung der Caspase 3 und 9 [222]. In MDA-MB-231-Zellen konnte in einer Studie von Sp *et al.* für 6-Gingerol, ein aktives Phenol mit mutmaßlichen MDM2-inhibitorischen Aktivitäten, eine fünffache Zunahme der Bax/Bcl-2-Ratio im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden [215]. Obwohl die Ergebnisse von Wang *et al.* und Sp *et al.* aufgrund der verschiedenen Versuchsdesigns (Western Blot/qRT-PCR, Behandlungsdauer etc.) nicht direkt miteinander vergleichbar sind, zeigten die aufgeführten Studien dennoch das antitumorale Potenzial der MDM2-Inhibitoren für verschiedene Malignome über eine Sensitivierung gegenüber einer Apoptose, teilweise auch unabhängig vom p53-Status.

Für die Bax/Bcl-2-Ratios sind keine fest definierten *Cut-off*-Grenzen in der Literatur zu finden. In einer Studie stellten Raisova *et al.* fest, dass eine Bax/Bcl-2-Ratio kleiner als 1 charakteristisch für resistente Melanomzellen war, während eine Ratio größer als 1 eine

erhöhte Sensitivität gegenüber der Fas-induzierten Apoptose zeigte [136]. Weitere Arbeiten mit unterschiedlichen apoptoseinduzierenden Stimuli in verschiedenen Malignomen zeigten eine Ratio zwischen ca. 1,50 – 8,00 [136, 215, 219, 223-225].

Für VWK603 liegt der in dieser Arbeit ermittelte Wert der Bax/Bcl-2-Ratio zwischen 1,54 und 1,59 [2] dabei deutlich im Bereich der in der genannten Literatur positiven und mit einer erhöhten Apoptoseinduzierbarkeit assoziierten Ratio von über 1. Darüber hinaus ist die Bax/Bcl-2-Ratio-Erhöhung von VWK603 auch mit anderen MDM2-Inhibitoren inklusive Nutlin-3a in der Literatur vergleichbar [215, 221] (s. oben). Diese Daten belegen, dass die für VWK603 ermittelten Werte für die Bax/Bcl-2-Ratio mit einer erhöhten Sensitivierung gegenüber Apoptoseinduktion vereinbar sind. Sie unterstützen die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass die in Kapitel 3.1 dargestellte Zellviabilitätsreduktion von TNBC-Zellen durch eine für MDM2-Inhibitoren beschriebene Apoptoseinduktion verursacht wird [2].

Zur weiteren Validierung der Aktivierung apoptotischer Signalwege durch VWK603 müssten im Anschluss an diese Arbeit analoge Versuche zu weiteren apoptotischen Proteinen angestrebt werden.

#### 4.3.2 p53-unabhängige Wirkung von VWK603

Mehrere Studien zeigten, dass die meisten MDM2-Inhibitoren ein intaktes p53 voraussetzen [61, 142]. Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.1 – 3.3 zeigten hingegen, dass VWK603 und Nutlin-3a trotz der die physiologische Funktion inaktivierenden p53-Mutation bzw. trotz einer fehlenden p53-Expression in den Zellen die Zellviabilität reduzierten [1, 2]. Zur Überprüfung der Wirksamkeit von VWK603 in Abhängigkeit von funktionellem p53 wurden Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout herangezogen. Überraschenderweise unterschied sich bei der Behandlung mit VWK603 die  $IC_{50}$  nicht signifikant zwischen den HCT116-Zellen mit einem p53-Wildtyp ( $IC_{50} = 6,64 \pm 0,50 \mu M$ ) und den HCT116-Zellen mit einem p53-Knockout ( $IC_{50} = 7,52 \pm 1,00 \mu M$ ) [2]. Bei der Behandlung mit Nutlin-3a lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied vor. Diese Ergebnisse deuten auf eine gleichwertige und von funktionellem p53 unabhängige pharmakologische Potenz hin [1, 2]. Sie widersprechen somit den anderen Arbeiten, die bisher eine erhöhte Selektivität der MDM2-Inhibitoren gegenüber den p53-Wildtyp-Tumoren zeigten [163, 164]. Sowohl Lau *et al.* als auch Dudgeon *et al.* zeigten einen mindestens siebenfachen Konzentrationsunterschied zwischen den beiden HCT116-Zelllinien bei der Behandlung mit Nutlin-3a [178, 226].

Ein möglicher Grund für diese von der hier durchgeführten Arbeit abweichenden Ergebnisse könnte im unterschiedlichen experimentellen Design zu finden sein, insbesondere der im Gegensatz zur Literatur serumfreien Inkubation in dieser Arbeit (s. Kap. 4.2). Möglicherweise induzieren im Serum bzw. im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren eine verstärkte p53-

Expression [109, 227, 228], was die Sensitivität gegenüber MDM2-Inhibitoren erhöhen und somit in den HCT116-p53<sup>+/+</sup>-Zellen eine stärkere Apoptoseinduktion bewirken könnte.

Eine weitere Erklärung für den in dieser Arbeit im Gegensatz zur Literatur nicht beobachteten Wirkungsunterschied der MDM2-adressierenden Inhibitoren in HCT116-p53<sup>+/+</sup>- gegenüber HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen könnte in dem Erwerb einer Resistenz der HCT116-p53<sup>+/+</sup>-Zellen gegenüber den eingesetzten MDM2-adressierenden Inhibitoren während der Behandlung begründet sein. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Resistenz gegenüber Nutlin-3a in den p53-Wildtyp-Osteosarkomzellen mit zunehmendem Zyklus einer dreitägigen Behandlung mit Nutlin-3a anstieg [229]. Bei einer Langzeitbehandlung waren die Osteosarkomzellen nicht mehr in der Lage, den Zellzyklusarrest oder die Apoptose einzuleiten [229]. Sie wiesen sogar *de novo* p53-Mutationen auf [229], die in weiteren Tumorzellen mit einem p53-Wildtyp verschiedener Tumorentitäten zu finden waren [230]. Zudem trug eine Langzeitbehandlung mit Nutlin-3a sogar zur erhöhten Resistenz gegenüber sämtlichen Chemotherapeutika in den Zellen bei, die selbst später nach langer Abwesenheit von Nutlin-3a bestehen blieb [230]. Deshalb wäre es möglich, dass die p53-Wildtyp-Kolonkarzinomzellen HCT116-p53<sup>+/+</sup> bei der Behandlung mit VWK603 eine p53-Mutation erwarben. Zum Ausschluss dieser Theorie sollte zukünftig eine Sequenzierung der TNBC-Zellen nach Behandlung mit VWK603 erwogen werden.

Ein weiterer Resistenzmechanismus gegen MDM2-Inhibitoren ist die Überexpression von MDM2, die möglicherweise in den HCT116-p53<sup>+/+</sup>-Zellen unter VWK603-Behandlung induziert wurde und als möglicher Regulationsmechanismus von p53 bei MDM2-Inhibition beschrieben ist (vgl. Kap. 1.5) [162, 231, 232]. Dieses ließe sich zukünftig durch Expressionsanalysen von MDM2 in den behandelten Zellen beispielsweise über Western-Blot-Analysen ausschließen.

In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Studien, die keinen Unterschied der Wirkung von VWK603 und Nutlin-3a in HCT116-p53<sup>+/+</sup>- und HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen darstellten und somit eine Wirkung unabhängig von p53 nahelegen [1, 2], zeigen auch die Ergebnisse von Lau *et al.*, dass Nutlin-3a, wenn auch mit geringerer pharmakologischer Potenz, p53-unabhängig wirken kann [178]. Eine p53-unabhängige Wirkung von MDM2-spezifischen Wirkstoffen legen auch Studien mit dem MDM2-Inhibitor SP-141 und Lineariifolianoid A nahe, die die Expression des MDM2 reduzieren und unabhängig vom p53-Status konzentrationsabhängig eine Apoptose in Brustkrebszellen induzieren [180, 210]. Auch Adams *et al.* zeigten in ihrer aktuellen Studie eine p53-unabhängige Apoptoseinduktion durch die neu entwickelte MDM2-PROTAC YX-02-030 (s. nächstes Kapitel 4.3.3) [233].

Auch wenn in vielen Studien im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen in HCT116-p53<sup>+/+</sup>- und HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen eine gewisse Selektivität der MDM2-Inhibitoren gegenüber den p53-Wildtyp-Tumoren beschrieben wird [163, 164, 234, 235], lässt sich schließlich aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen festhalten, dass sowohl

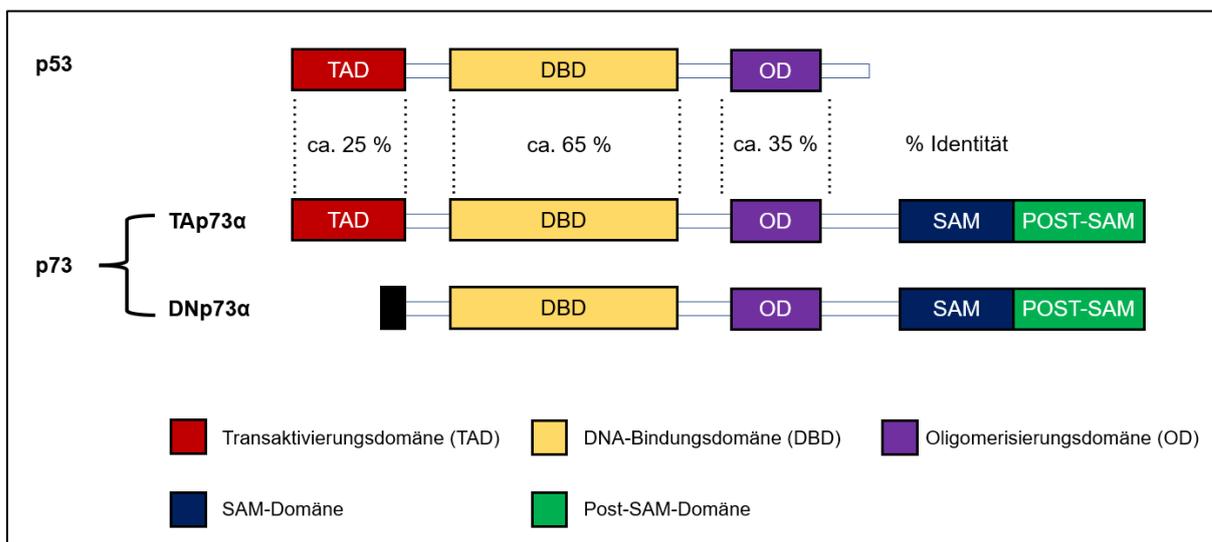
VWK603 als auch Nutlin-3a in Analogie zu den oben erwähnten Studien für MDM2-Inhibitoren auch p53-unabhängig die Zellviabilität reduzieren können [1, 2].

#### 4.3.3 Adressierung der MDM2/p73-Interaktion als möglicher p53-unabhängiger Mechanismus

Die Frage, warum VWK603 und Nutlin-3a in den HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen trotz Abwesenheit von p53 eine zellviabilitätsreduzierende Wirkung aufzeigten und auch in einigen Studien für MDM2-Inhibitoren eine p53-unabhängige Apoptoseinduktion beschrieben ist, lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass MDM2-Inhibitoren unabhängig von p53 über andere Mechanismen wirken können. Eine Wirkung der beiden MDM2-adressierenden Inhibitoren ohne Beteiligung von p53 würde erklären, warum in dieser Arbeit auch in den TNBC-Zellen mit einer die physiologische Funktion inaktivierenden p53-Mutation eine deutliche Wirkung beobachtet wurde (s. Kap. 3.1 – 3.3) [1, 2].

Eine mögliche Theorie lässt sich durch die Induktion der Apoptose über das Protein p73 erklären [1, 2, 178]. Das Protein p73 gehört neben dem Protein p63 zu der p53-Familie der Transkriptionsfaktoren [236, 237]. Dabei weisen p53 und p73 identische Strukturen in den drei funktionellen Proteindomänen auf (Abb. 21): ca. 62 – 65 % in der DNA-Bindungs- [236, 238, 239], ca. 35 – 38 % in der Oligomerisierungs- und ca. 25 – 29 % in der Transaktivierungsdomäne [236, 239]. Aufgrund seiner hohen homologischen Ähnlichkeiten zu p53 bestehen überlappende Funktionen bezüglich der Induktion des Zellzyklusarrests und der Apoptose [240-243]. Jedoch spielt p73 funktionell eine relevante Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung, die sich somit von den Funktionen des p53 abgrenzen. Dazu gehört insbesondere die Neurogenese [243, 244]. Interessanterweise weist das Gen TP73 im Vergleich zu TP53 in Tumoren eine deutlich geringere Mutationsrate auf (< 1 %) [236, 245, 246].

Aktiviert wird p73 wie p53 ebenfalls über DNA-Schäden [247, 248]. Aufgrund des zu p53 ähnlichen Aufbaus kann p73 somit p53-Zielgene wie p21, Puma und Bax aktivieren [236, 241, 249]. Es kann ebenfalls mit MDM2 interagieren [250-254]. Die genaue Bindungsstelle des p73 am MDM2 wird jedoch kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten begründeten, dass p73 und p53 aufgrund derselben *hotspots*-Regionen an derselben Position des MDM2 binden müssten [250-253]. Stindt *et al.* vermuteten hingegen, dass die beiden Proteine jeweils eine unterschiedliche Bindungsstelle am MDM2 besitzen müssten [254]. Im Gegensatz zu p53 wird p73 nicht von MDM2 abgebaut [250, 253, 255].



**Abb. 21: Vergleich des Aufbaus von p53 und p73.**

Abgebildet ist der Aufbau des p53 und der zwei Isoformen des p73. Die Isoformen unterscheiden sich am N-terminalen Ende. Dabei fehlt der Isoform DNp73 die Transaktivierungsdomäne. Durch das alternative Spleißen entstehen weitere Isoformen, die sich im C-terminalen Ende unterscheiden. Diese werden nach dem griechischen Alphabet benannt. Exemplarisch wurden die Isoformen von  $\alpha$  gezeigt. Sie besitzt im Vergleich zu den anderen Isoformen eine *sterile alpha motif*-(SAM-)Domäne und eine Post-SAM-Domäne. Die Isoform TAp73 und das Protein p53 weisen teilweise identische Strukturen auf [239]. Eigene Abbildung mit PowerPoint erstellt, angelehnt an Yang *et al.* [239].

Die Rolle von p73 in der Tumorphysiologie ist bisher nicht vollständig verstanden. Ein kompletter Knockout des Gens TP73 in Mäusen führte zwar zu immunregulatorischen, neurologischen und pheromonischen Störungen, aber nicht zur spontanen Tumorentstehung. An dieser Stelle unterscheiden sich p73 und p53 hinsichtlich der Bedeutsamkeit bei der Tumorigenese [244]. Dennoch könnte inaktiviertes p73 synergistisch prokanzerogen wirken. So kann p73 durch das mutierte Tumorprotein p53 im Rahmen dessen *gain of function* inaktiviert werden [256, 257], was die Chemoresistenz erhöht [258, 259]. Der pharmakologische Eingriff in die Interaktion und Aktivierung von p73 stellt hierbei eine mögliche therapeutische Strategie dar [259]. Dies kann beispielsweise durch die kurzen eingreifenden Peptide (*short interfering peptide*) oder das *small molecule* RETRA (*reactivation of transcriptional reporter activity*) realisiert werden, die daraufhin zu einer Reaktivierung des p73 führen. In den Studien konnten bereits antitumorale Effekte präklinisch beobachtet werden [260, 261].

Darüber hinaus kann die Zugabe von Chemotherapeutika wie Cisplatin, Taxane und Doxorubicin die Konzentration des p73 in verschiedenen malignen Tumoren erhöhen [258, 262]. In einer anderen Arbeit konnte beobachtet werden, dass p73 nicht nur durch Nutlin-3 stabilisiert wurde, sondern es konnte eine Verbesserung der Apoptoseinduktion durch die Interruption der MDM2/p73-Interaktion beobachtet werden [178]. Aus diesen Gründen stellt die Aktivierung bzw. die Erhöhung des p73 eine attraktive Therapiestrategie dar. Ebenfalls konnte die Rolle des p73 als therapeutische Zielstruktur im Mammakarzinom gezeigt werden. Beispielsweise übernahm p73 in Adriamycin behandelten p53-defizienten Mammakarzinomzellen die Funktionen des p53 [263]. Andere Studien zeigen, dass p73 sogar

ein mögliches therapeutisches Target beim TNBC darstellen könnte [264-266]. Während der Verfassung der vorliegenden Dissertation veröffentlichten Adams *et al.* eine umfangreiche Studie über eine neuartige MDM2-PROTAC (*proteolysis targeting chimera*), die p53-unabhängig eine Apoptose über eine Reaktivierung des p73 in verschiedenen TNBC-Zelllinien induziert. Der Wirkmechanismus dieser PROTAC besteht darin, dass MDM2 mittels der durch die PROTAC rekrutierten Ligase degradiert wird. Interessanterweise zeigt dieser neue Wirkstoff hinsichtlich der pharmakologischen Potenz in den TNBC-Zelllinien vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte (4,00 – 5,50 µM) mit denen des VWK603 [233].

Diese Daten weisen darauf hin, dass p73 bei der Anwendung von VWK603 ebenfalls eine wichtige Rolle spielen und VWK603 eine Apoptose über die Reaktivierung des p73 induzieren könnte (Abb. 22) [2].

Allerdings legen einige Studien für p73 auch eine prokanzerogene Wirkung dar. Beispielsweise ließ sich eine erhöhte Expression des p73 auf der Protein- oder mRNA-Ebene in verschiedenen Tumoren beobachten [267]. Beim Mammakarzinom lagen widersprüchliche Ergebnisse vor, ob eine Überexpression des p73 mit einer geringeren oder höheren Malignität einherging [268, 269]. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten damit begründet sein, dass in vielen Studien nur die Expression des p73 in seiner Gesamtheit und nicht in seinen spezifischen Isoformen untersucht wurde [252], was für eine vollständige Charakterisierung der möglichen antionkogenen Rolle von p73 essentiell sein könnte. Im Folgenden wird aus diesem Grund auf die unterschiedlichen Isoformen des Proteins p73 näher eingegangen. Aus der p73-Gensequenz lassen sich verschiedene p73-Varianten exprimieren, wobei sich die zwei Isoformen TAp73 und DNp73 bezüglich ihrer Funktionen gegenüberstehen [239, 267]. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen liegt darin, dass die TA-Isoform eine intakte Transaktivierungsdomäne aufweist, während die N-terminal verkürzte DN-Isoform keine besitzt (Abb. 21) [239, 267, 270]. Zudem entstehen durch alternatives Spleißen weitere Varianten innerhalb dieser „Isoformklassen“, die sich am C-terminalen Ende unterscheiden und nach dem griechischen Alphabet bezeichnet werden [239].

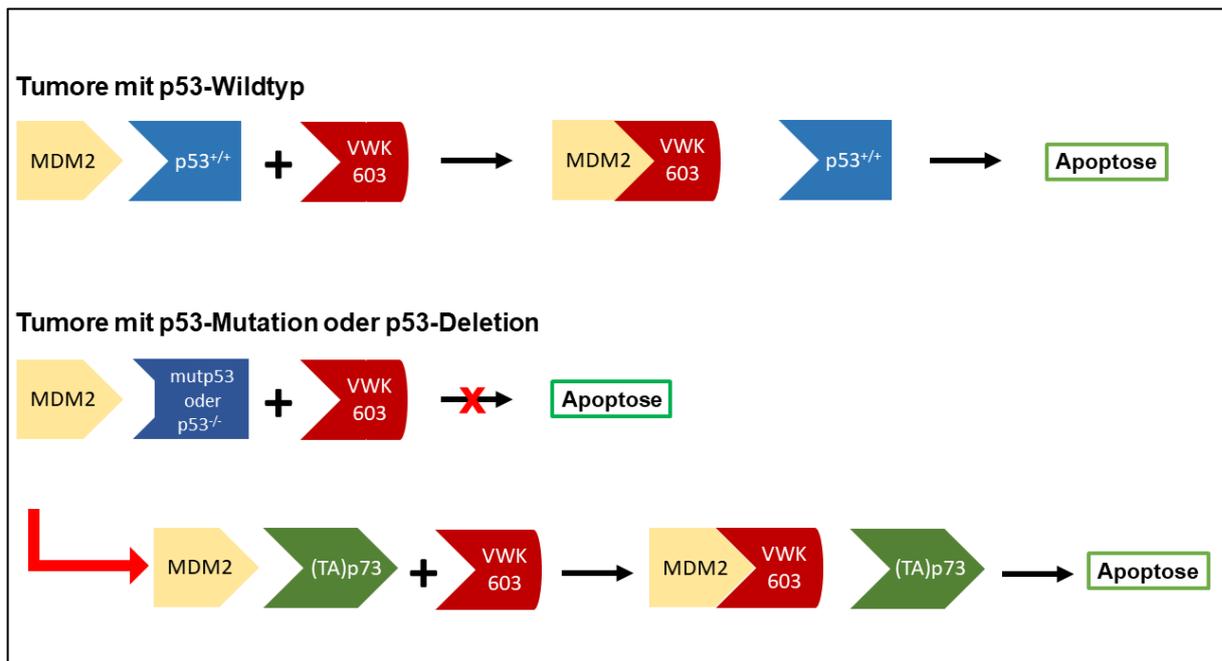
- Die Isoform TAp73 weist apoptotische Funktionen und Antitumorwirkungen wie p53 auf [242, 263]. Vergleichbar zum Knockout von p53 führte ein Knockout der TAp73-Isoformen neben der Infertilität, der neurologischen Entwicklungs- und Differenzierungsstörung ebenfalls zu spontan gebildeten und karzinogeninduzierten Tumoren, insbesondere zu Lungenkarzinomen [271]. Eine erhöhte Apoptosesensitivität wurde in p53-defizienten Neuroblastomzellen in Kombination von Nutlin-3a und Doxorubicin durch die Inhibition zwischen TAp73 und MDM2 beobachtet [272]. Eine signifikante Antitumorwirkung in MDA-MB-468-Zellen konnte in einer Arbeit auch für einen neuartigen Inhibitor namens LEM2 gezeigt werden, der spezifisch die Interaktion zwischen MDM2 und TAp73 hemmte und zusätzlich die

Interaktion zwischen TAp73 und dem mutierten p53 inhibierte. Die  $IC_{50}$  lagen etwas unterhalb des VWK603 zwischen 1 und 3  $\mu$ M [273]. In anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen TAp73, MDM2 und dem MDM2-Homolog MDMX gezeigt werden. Es konnte dargestellt werden, dass sowohl MDM2 als auch MDMX, ebenfalls ein Mitglied der MDM-Familie und auch als MDM4, HDM4 oder HDMX bezeichnet (s. Kap. 1.4.1) [96, 98], die Transkriptionsaktivität des TAp73 unterdrückten [274, 275]. Protoporphyrin IX, ein natürlicher Metabolit der  $\delta$ -Aminolävulinsäure sowie Prodrug und Photosensitizer in der photodynamischen Therapie gegen Krebs, induzierte in einer Studie über eine Reaktivierung des TAp73 durch die Inhibition der beiden Interaktionen TAp73/MDM2 und TAp73/MDMX eine p53-unabhängige Apoptose in p53-defizienten Tumorzellen [274]. Interessanterweise zeigte eine Studie, dass in den verschiedenen Mammakarzinomzelllinien, unter anderem in MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468, die Expression der Isoform TAp73 fehlte [276]. In der Arbeit von Tonsing-Carter *et al.* konnte jedoch dargelegt werden, dass Nutlin-3a in Kombination mit Carboplatin die Expression des TAp73 in TNBC erhöhte [161]. Die Aktivierung des TAp73 durch MDM2-Inhibitoren könnte somit auch in TNBC-Zellen relevant sein. Diese Daten weisen darauf hin, dass VWK603 über eine Inhibition der MDM2/TAp73-Interaktion ebenfalls in p53-mutierten TNBC-Zellen bzw. p53-defizienten HCT116-Zellen p53-unabhängig die in dieser Arbeit beschriebene Zellviabilitätsreduktion induzieren könnte [2].

- Für die Isoform DNp73 konnte wiederum in Studien ein onkogenes Potenzial dargestellt werden, wobei DNp73 die transaktivierenden Proteine wie p53 und TAp73 hemmen kann [270]. In einer Studie wurde eine erhöhte Expression von DNp73 in Mammakarzinomen nachgewiesen, die mit einer geringeren Tumorzelldifferenzierung einherging und somit mit einer schlechteren Prognose korrelieren könnte [277]. Tumorzellen mit einem Knockout des DNp73 zeigten sich hingegen sensibler gegenüber Chemotherapeutika und einer Apoptoseinduktion [278]. Eine Interaktion mit MDM2 bzw. eine DNp73-spezifische Wirkung eines MDM2-Inhibitors ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Zusammenfassend zeigen diese umfangreichen Ergebnisse zu beiden p73-Isoformen TAp73 und DNp73 auf, wie komplex die Interaktionen der Proteine sind und vor welchen Herausforderungen die Entwicklung neuer Medikamente gegen zielgerichtete Strukturen dieser Proteine bzw. ihrer Interaktionspartner somit steht. Deshalb ist es wichtig, die Forschung über die Rolle des p73 in der Tumorigenese voranzutreiben und in zukünftigen Studien die Funktion von p73 bei der Entschlüsselung des Mechanismus von MDM2-spezifischen Inhibitoren wie VWK603 in p53-mutierten Tumoren genauer zu definieren. Die Abbildung 22 fasst einen möglichen Wirkmechanismus von VWK603 in p53-mutierten

bzw. -defizienten Tumoren über p73 graphisch zusammen, wobei hierbei wahrscheinlich der p73-Isoform TAp73 die entscheidende apoptoseinduzierende Funktion zukommt.



**Abb. 22: Mögliche Wirkmechanismen des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603.**

Dargestellt sind die Wirkmechanismen des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603 in Tumoren mit einem p53-Wildtyp (p53<sup>+/+</sup>), p53-Mutation (mutp53) oder p53-Deletion (p53<sup>-/-</sup>). In Tumoren mit einem p53-Wildtyp könnte VWK603 die Interaktion zwischen MDM2 und p53<sup>+/+</sup> inhibieren, sodass die Apoptose folglich eingeleitet wird. In einigen Arbeiten wurde die Inhibition zwischen MDM2 und p73 bzw. der Isoform TAp73 durch die Referenzsubstanz Nutlin-3a in Tumoren mit einer p53-Mutation oder p53-Deletion beobachtet, die eine Apoptose folglich induzierte [161, 178, 272]. Demzufolge wird in dieser Arbeit angenommen, dass VWK603 ebenfalls die Interaktion zwischen MDM2 und (TA)p73 inhibieren könnte [2]. Abbildung mit PowerPoint erstellt.

#### 4.3.4 Mögliche nicht direkt die Protein-Protein-Interaktionen des MDM2 adressierende Wirkmechanismen von VWK603

In vielen Studien beeinflussen die MDM2-Inhibitoren die MDM2/p53-Interaktion [142]. Es bestehen jedoch noch weitere Wirkmechanismen, die nicht die Protein-Protein-Interaktionen des MDM2 adressieren, aber spezifisch den p53-MDM2-Signalweg beeinflussen könnten und für einzelne MDM2-Inhibitoren beschrieben sind [279].

Im Review von Qin *et al.* wurden die Substanzen mit einem Einfluss auf den p53-MDM2-Signalweg zusätzlich zu den direkt die Protein-Protein-Interaktionen des MDM2 adressierenden Wirkmechanismen in vier weitere Wirkmechanismen klassifiziert [279]:

1. Inhibition der MDM2-Expression oder Herunterregulation der MDM2-Proteinstabilität,
2. Inhibition der Expression oder Herunterregulation der Proteinstabilität des mutierten p53,
3. Inhibition der E3-Ligase-Aktivität des MDM2, 4. Reaktivierung der p53-Eigenschaften bei mutiertem p53.

Die letzte Kategorie beschreibt dabei einen neuartigen Therapieansatz, der gezielt die Transformation des p53-mutierten Proteins zu seiner physiologischen Konformation bewirkt [279] und von VWK603 mit spezifischer Bindung an MDM2 wahrscheinlich nicht

adressiert wird. Diese zukunftsweisende Technologie wird in Kapitel 4.4.4 noch einmal im Rahmen einer möglichen synergistischen Anwendung mit VVK603 näher thematisiert.

Zu der ersten und zweiten Kategorie gehört beispielsweise Platycodin D [279]. Kong *et al.* zeigten, dass dieses Naturprodukt als potenzieller MDM2-Inhibitor mit einer  $IC_{50}$  von  $7,77 \mu\text{M}$  die Zellviabilität in der Zelllinie MDA-MB-231 reduzierte, indem nicht nur die Expression des MDM2 und MDMX auf der Proteinebene zurückging, sondern auch die des mutierten p53 [214]. Wie die Herabregulation des mutierten p53 induziert wird und ob die Reduktion der MDM2/MDMX-Expression und Platycodin D/MDM2/MDMX-Interaktion indirekt eine Rolle spielen, ist dabei noch nicht geklärt. Zur dritten Kategorie zählt beispielsweise die Substanz Lissoclidine B, die die MDM2-E3-Ligaseaktivität inhibiert [279] und bisher nur in Osteosarkom- und Kolonkarzinomzellen untersucht wurde [280].

Die nachfolgende Tabelle 27 fasst noch einmal die möglichen Mechanismen der therapeutischen Adressierung des p53-MDM2-Signalwegs zusammen. Diese Theorien über die möglichen unterschiedlichen Mechanismen, wie MDM2-Inhibitoren auch unabhängig von einer direkten Adressierung der Protein-Protein-Interaktionen des MDM2 den p53-MDM2-Signalweg beeinflussen können, zeigen, dass für VVK603 wahrscheinlich weitere Versuche notwendig sind, um die Wirkmechanismen vollständig zu entschlüsseln.

**Tabelle 27: Wirkmechanismen der Substanzen mit einem Einfluss auf den p53-MDM2-Signalweg.**

<b>Mechanismus</b>	<b>Beispiele</b>
1. Inhibition der Expression oder Herunterregulation der Proteinstabilität des MDM2	Platycodin D, SP-141, YX-02-030, Lineariifolianoid A
2. Inhibition der Expression oder Herunterregulation der Proteinstabilität des mutierten p53	Platycodin D
3. Inhibition der E3-Ligase-Aktivität des MDM2	Lissoclidine B
4. Reaktivierung der p53-Eigenschaften bei mutiertem p53	Prima-1, Prima-1 <sup>MET</sup> (APR-246), RITA
5. Inhibition der p53/MDM2-Interaktion	Nutlin-3a, Idasanutlin, RG7112, RITA

Verschiedene Wirkmechanismen von exemplarischen synthetischen und natürlichen Substanzen, die den p53-MDM2-Signalweg beeinflussen. Zur Erstellung der Tabelle dienten verschiedene Arbeiten [162-164, 180, 211, 233, 280-284] und die Übersichtsarbeit von Qin *et al.* [279] als Grundlage.

## 4.4 VWK603 als möglicher Wirkstoff in der zukünftigen Krebstherapie

### 4.4.1 Einführung

Für VWK603 konnte in dieser Arbeit in unterschiedlichen TNBC-Zellkulturmodellen eine signifikante Antitumorwirkung dargestellt werden [2]. Basierend auf diesen Daten soll unter Berücksichtigung potenzieller Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen sowie möglicher klinischer Anwendungsformen im Folgenden diskutiert werden, inwieweit nach entsprechender Weiterentwicklung und präklinischer Validierung ein zukünftiger Einsatz in der Krebstherapie, insbesondere des TNBC, realistisch erscheint.

### 4.4.2 Toxizitätsbestimmung von VWK603 in nicht malignen Zellmodellen und Abschätzung potenzieller Nebenwirkungen im menschlichen Organismus

Ein wesentlicher Aspekt von Wirkstoffen, der einen Einsatz beim Menschen limitiert, sind die neben den gewünschten Wirkungen im menschlichen Organismus hervorgerufenen Nebenwirkungen. Für MDM2-Inhibitoren sind hierbei diverse Nebenwirkungen bekannt. Dazu gehören Fatigue, gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhoen oder Übelkeit und hämatologische Veränderungen wie Neutropenie oder Thrombozytopenie [142].

Zur Untersuchung von ersten toxischen Nebenwirkungen durch VWK603 wurde in dieser Arbeit zunächst die Zelllinie NIH-3T3 herangezogen. Dabei wurde für VWK603 eine  $IC_{50}$  von  $4,53 \pm 1,31 \mu\text{M}$  erzielt. In der Arbeit von Vassilev *et al.* wurden für Nutlin-3a in NIH-3T3-Fibroblasten eine etwas geringere  $IC_{50}$  ( $1,30 \mu\text{M}$ ) ermittelt [162]. An dieser Stelle muss wiederholt betont werden, dass die  $IC_{50}$ -Werte aus diesen Arbeiten aufgrund der verschiedenen Versuchsdesigns nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Dennoch zeigen diese Daten eine ähnliche Toxizität von VWK603 und Nutlin-3a in NIH-3T3-Fibroblasten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VWK603 im Vergleich zu Nutlin-3a bei höherer Potenz in TNBC-Zellen weniger Toxizität in gesunden Zellen aufweist. Dabei lässt sich die auch bei VWK603 noch geringer ausfallende  $IC_{50}$  in den Fibroblasten gegenüber den TNBC-Zellen vermutlich durch die generelle erhöhte Sensibilität auf toxische Substanzen von NIH-3T3-Fibroblasten zurückführen [209].

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Zelllinie MCF-10A für weitere toxische Studien herangezogen. Dabei wurde für VWK603 eine höhere  $IC_{50}$  von  $16,29 \pm 4,65 \mu\text{M}$  erzielt. Die  $IC_{50}$  lag signifikant höher als die in den TNBC-Zellen, was eine geringere Toxizität von VWK603 in nicht malignen Brustepithelzellen darstellt [2]. Für Nutlin-3a lag ebenfalls ein signifikanter Potenzunterschied zwischen den gesunden und malignen Zellen vor, der jedoch geringer ausfiel (s. Kap. 3.5) [1, 2]. Interessanterweise zeigten Tonsing-Carter *et al.* bei einer Behandlung mit  $15 \mu\text{M}$  Nutlin-3a sogar eine signifikant stärkere Zellviabilitätsreduktion in den

MCF-10A-Zellen im Vergleich zu den TNBC-Zellen bis um das 25-Fache. Die Zellviabilität der TNBC-Zellen wurde dabei kaum beeinflusst [161].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass für Nutlin-3a in gesunden Zellen im Gegensatz zu den Tumorzellen nach einer Woche eine Reversibilität der toxischen Wirkung beschrieben ist [162]. Ob dies in gesunden Zellen bei VWK603 wie bei Nutlin-3a ebenfalls zutrifft, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht beantworten. Aufgrund des wahrscheinlich vergleichbaren Wirkmechanismus beider MDM2-spezifischen Inhibitoren (vgl. Kap. 4.3) erscheint dieses aber möglich und könnte therapeutisch die toxische Wirkung von VWK603 auf gesunde Zellen reduzieren.

In Übereinstimmung mit der Meinung von Tosing-Carter *et al.* sollte nicht unerwähnt bleiben, dass sich die Toxizitätsdaten *in vitro* nicht unbedingt auf die Toxizität *in vivo* übertragen lassen können. Stattdessen geben sie eine Orientierung der Dosiswerte und Hinweis zur möglichen Entstehung von Gewebeschäden bei hoher Dosis *in vivo* an. Sie fanden dabei *in vivo* trotz Verabreichung höherer Konzentration von Nutlin-3a (200 mg/kg) keine erhöhte Toxizität zu dem adjuvanten verabreichten Carboplatin [161]. Zur Ermittlung des vollständigen Nebenwirkungsprofils von VWK603 ist es somit notwendig, weitere Toxizitätsversuche in verschiedenen Zelllinien und schließlich in Tierversuchen durchzuführen. Anschließend würde bei guter Verträglichkeit die klinische Phase-I-Untersuchung bei TNBC-Patientinnen erfolgen.

Bis heute laufen Studien zur Ermittlung der Wirksamkeit und der Nebenwirkungen von MDM2-Inhibitoren bei Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren [142]. Jedoch wurde bis heute noch keine Studie mit einem MDM2-Inhibitor für TNBC-Patientinnen etabliert. Erstmals im Jahre 2018 wurde eine Studie mit dem MDM2-Inhibitor Idasanutlin in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Atezolizumab in metastasierten und nicht resektablen rezidivierenden hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom-Patientinnen durchgeführt (NCT03566485). In der Studie zeigten Patientinnen typische Nebenwirkungen von MDM2-Inhibitoren. Jedoch konnte keine maximal tolerierte Dosis aufgrund der geringen Teilnehmeranzahl ermittelt werden [285]. Eine Phase-II-Studie konnte neben dem Verlust der Studienfinanzierung somit nicht erfolgen [285]. Hier ergibt sich die Frage, ob Idasanutlin eine antitumorale Wirkung sowohl in den TNBC-Zelllinien als auch bei TNBC-Patientinnen erzielen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass VWK603 in gesunden Brustzellen *in vitro* zwar eine toxische Wirkung aufzeigt, die  $IC_{50}$  der Dosis-Wirkungs-Kurve aber oberhalb der von TNBC-Zellen liegt und gegenüber Nutlin-3a im Vergleich zur Antitumorwirkung geringer ausfällt [2]. Da zudem in Mausmodellen durchgeführte Studien in gesunden Zellen nach längerer Applikationsdauer auf eine Reversibilität der Toxizität von MDM2-Inhibitoren hinweisen [161], kann die Hypothese gestellt werden, dass VWK603 bei einer späteren Verwendung *in vivo* ein positives Wirkungs-Toxizitäts-Verhältnis erreichen könnte.

#### 4.4.3 Resistenzentwicklung von MDM2-Inhibitoren *in vivo* und mögliche synergistische Anwendung von VWK603 mit Paclitaxel

Wie in Kapitel 4.3.2 bereits für *in-vitro*-Studien an Zelllinien diskutiert, sind für MDM2-Inhibitoren Resistenzentwicklungen auch bei der therapeutischen Anwendung beim Menschen beschrieben [286]. Die Chemoresistenz stellt oft als therapielimitierender Faktor ein klinisches Problem dar, weshalb verschiedene Chemotherapeutika mit anderen Wirkstoffklassen kombiniert werden. Die Resistenzentwicklung findet nicht nur bei genotoxischen Chemotherapeutika statt, sondern sie entsteht durch den längerfristigen monotherapeutischen Einsatz *in vitro* (s. Kap. 4.3.2) und möglicherweise auch *in vivo* von MDM2-Inhibitoren in p53-Wildtyp-Tumoren [287, 288].

Ob VWK603 Mutationen bei p53-mutierten Tumorzellen und somit die Resistenzentwicklung weiter verstärken oder sogar zur Entstehung von sekundären malignen Tumoren *in vivo* beitragen würde, lässt sich jedoch zum aktuellen Zeitpunkt nicht beantworten. Dennoch muss betont werden, dass in mehreren Arbeiten die Kombination aus MDM2-Inhibitoren und den Chemotherapeutika die Apoptosesensitivität in p53-mutierten Tumoren nachhaltig verbesserte [161, 179, 289], sodass VWK603 in Kombinationsanwendungen das Spektrum der Therapie bei p53-mutierten Tumoren erweitern könnte. Folglich sollte die Auswirkung der Langzeitbehandlung von VWK603 in Kombination mit Chemotherapeutika auf die TNBC-Zellen zukünftig evaluiert werden.

Für synergistisch wirkende Kombinationen von Therapeutika ist es wichtig, ergänzende und unterschiedliche Wirkmechanismen gezielt zu adressieren. Aus diesem Grund wäre für den MDM2-adressierenden Inhibitor VWK603 das Taxan Paclitaxel ein wichtiger Kandidat in einer zukünftigen TNBC-Therapie. Diese These ist darin begründet, dass Paclitaxel zum einen umfangreich als Chemotherapeutikum in der TNBC-Therapie erfolgreich eingesetzt wird [6, 8, 17] und zum anderen dessen Wirkung nicht vom p53-Status abhängt [290]. In mehreren Zelllinien der Kolonkarzinome wurde diese Unabhängigkeit gezeigt [291]. Dies ließ sich auch in dieser Arbeit durch die vergleichbare Zellviabilitätsreduktion und somit Potenz von Paclitaxel im Versuch der HCT116-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status bestätigen (s. Kap. 3.3) [1, 2]. Auch in anderen Arbeiten mit den HCT116-Zelllinien ließ sich eine p53-unabhängige Wirkung des Paclitaxels beobachten [226, 292]. Beim Mammakarzinom wurde in einer Studie gezeigt, dass das therapeutische Ansprechen auf Paclitaxel mit einem defekten p53 positiv korrelieren könnte [293]. Interessanterweise zeigten Schaafsma *et al.* in verschiedenen TNBC-Zelllinien das Gegenteil. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 zeigten eine hohe Resistenz gegenüber Paclitaxel [294]. Da jedoch die Kombination aus Chemotherapeutika und MDM2-Inhibitoren die Apoptosesensitivität in MDA-MB-231-Zellen und in weiteren TNBC-Zelllinien verbessern konnte [161, 179] und die IC<sub>50</sub> von VWK603 und Paclitaxel hinsichtlich der Potenz im vergleichbaren mikromolaren Bereich lagen [1, 2],

erscheint ein synergistischer Effekt auf die Zellviabilität in TNBC-Zellen bei Zugabe beider apoptoseinduzierenden Substanzen wahrscheinlich und sollte in auf diese Arbeit nachfolgenden Zellkulturstudien zunächst *in vitro* untersucht werden.

Die hier dargestellten *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien von MDM2-Inhibitoren für den effizienten Einsatz als Krebstherapeutikum legen dar, dass insbesondere im Rahmen einer Langzeitbehandlung eine Kombinationstherapie mit einem aktuellen Chemotherapeutikum erfolgsversprechender als eine Monotherapie erscheint. Für VWK603 lässt sich demnach annehmen, dass eine besonders effektive Behandlung zukünftig ebenfalls in einer synergistischen Anwendung mit z.B. Paclitaxel etabliert werden könnte.

#### 4.4.4 Mögliche synergistische Anwendung in der zukünftigen Chemotherapie-unabhängigen Behandlung

Das Ziel moderner zielgerichteter Krebstherapien ist es, tumorspezifische Veränderungen therapeutisch zu adressieren und chemotherapeutische Behandlungen aufgrund ihres großen unerwünschten Nebenwirkungsspektrums und begrenzter Effizienz zu reduzieren und in einzelnen Fällen zu ersetzen [295]. So sind für p53-mutierte Tumore Wirkstoffe wie Prima-1 und sein Nachfolger Prima-1<sup>MET</sup> (APR-246) entwickelt worden, die gezielt das mutierte Tumorsuppressorprotein p53 der Tumorzellen in eine Konformation mit Eigenschaften eines p53-Wildtyps überführen können (vgl. Kap. 4.3.4) [211, 281]. Hierzu wurden auch Studien in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien durchgeführt [143, 211]. Dabei fanden Liang *et al.* heraus, dass Prima-1 die Apoptose über den mitochondrialen Signalweg *in vitro* induzierte und das Tumorwachstum in den mit hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomzellen injizierten *Xenograft*-Mäusen signifikant reduzierte [143]. Später untersuchten Synnott *et al.* die antitumorale Wirkung in TNBC-Zelllinien. Der Nachfolger Prima-1<sup>MET</sup> reduzierte dabei in der Studie konzentrationsabhängig die Zellviabilität in den p53-mutierten TNBC-Zellen mit einer IC<sub>50</sub> zwischen 1,90 µM und 11,90 µM [211]. In der p53-Wildtyp exprimierenden hormonrezeptor-positiven MCF-7-Zelllinie wurde nur eine verminderte Wirkung der p53-mutationsspezifischen Wirkstoffe Prima-1 bzw. Prima-1<sup>MET</sup> beobachtet [143, 211]. Insgesamt war die IC<sub>50</sub> der getesteten p53-mutierten Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu der IC<sub>50</sub> der Zelllinien mit einem p53-Wildtyp signifikant geringer. Dies deutet auf eine erhöhte Selektivität des Wirkstoffs gegenüber den p53-mutierten Tumorzellen hin [211]. In gesunden Brustzellen konnte in der Studie von Liang *et al.* überwiegend keine Toxizität beobachtet werden [143]. Eine klinische Studie mit Prima-1<sup>MET</sup> wurde bereits etabliert, die die Anwendung bei Patienten mit hämatologischen Malignitäten und Prostatakarzinomen untersuchte (NCT00900614) [296, 297]. Dabei wurde das Medikament gut vertragen und eine Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax, PUMA und Noxa beobachtet [296].

Beim Vergleich zwischen Prima-1/Prima-1<sup>MET</sup> und VWK603 kann vermutet werden, dass mechanistisch keine direkten Parallelen bestehen, da VWK603 unabhängig vom p53-Status wirkt und als MDM2-spezifischer Inhibitor über die Bindung an MDM2 fungiert [2]. Eine synergistische Anwendung beider Wirkstoffklassen wäre aufgrund der unterschiedlichen *Mode of Action* und sich wahrscheinlich verstärkender Mechanismen demnach gut vorstellbar, was VWK603 auch für zukunftsweisende Therapien wie mit Prima-1/Prima-1<sup>MET</sup> interessant macht. Diese These wird dadurch gestützt, dass *in vitro* MDM2-Inhibitor-resistente Tumorzellen mittels der synergistischen Gabe eines Wirkstoffs namens RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*) sensibilisiert werden konnten [282], bei dem neben der Inhibition der p53/MDM2-Interaktion ebenfalls eine Apoptoseinduktion durch Konformationsänderung des mutierten p53 in p53-mutierten Tumorzellen angenommen wird [283, 284]. Hierbei zeigte die Kombinationstherapie aus RITA und einem MDM2-Inhibitor einen größeren antitumoralen Effekt als die Monotherapie von RITA [282]. Für weitere bei TNBC zukünftig mögliche synergistische Therapien von MDM2-Inhibitoren mit nicht genotoxischen Substanzen wie z.B. Immuntherapeutika, PARP-Inhibitoren oder Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-(PI3K/AKT)-Inhibitoren liegen bisher *in vitro* keine Daten vor. Aufgrund des unterschiedlichen *Mode of Action* erscheint eine adjuvante Anwendung mit MDM2-Inhibitoren auch hier möglich. Diese These muss allerdings erst durch zukünftige Studien untersucht werden.

#### 4.4.5 Erweiterung des Wirkstoffprofils von VWK603 über duale Adressierung von MDM2 und MDMX

In der Studie von Yu *et al.* wurde im Mammakarzinom neben dem MDM2 eine Überexpression bzw. Amplifikation des MDM2-Homologs MDMX beobachtet, die somit zur Karzinogenese beitragen kann [298]. Haupt *et al.* analysierten eine Datenbank und stellten fest, dass jeweils ca. ein Drittel der Mammakarzinom-Patientinnen mit Luminal-Typ A und B eine Amplifikation des MDMX aufwiesen. In TNBC lag in ca. < 30 % der Fälle eine Amplifikation des MDMX vor, wenn man den Basal-Typ und Claudin-Low-Typ zusammenfasste [98]. Eine stärkere Expression von MDMX in den MDA-MB-231- und MDA-MB-468-Zellen als in der Kontrollzelllinie MCF-10A auf der Proteinebene wurde in der Arbeit von Miranda *et al.* festgestellt [299]. Ein Gen-Knockdown stellte MDMX als ein potenzielles Target beim Mammakarzinom inklusive TNBC dar [299]. Untermauert wurde diese Erkenntnis durch den Einsatz eines MDMX-Inhibitors in den MDA-MB-231- und MDA-MB-468-Zelllinien [299]. Zudem zeigten Gao *et al.*, dass eine Überexpression des MDM2 und MDMX in MDA-MB-231-Zellen die Metastasierung und die zirkulierenden Tumorzellen im Blut fördern könnte. Ein Knockdown einer der beiden Gene führte zu einer Reduktion von mindestens 78 % der zirkulierenden Tumorzellen *in vivo* [300]. Darüber hinaus wurde in einer anderen Studie

festgestellt, dass TNBC-Patientinnen mit fehlender Expression von MDMX oder MDM2 eine bessere Prognose hatten [179]. Diese Daten legen nahe, dass beide Proteine MDMX und MDM2 therapeutisch eine wichtige Rolle beim TNBC einnehmen.

Eine Koexpression von MDM2 und MDMX ließ sich signifikant beim Claudin-Typ beobachten [98]. Obwohl beide Onkoproteine eine hohe Homologie, insbesondere in der p53-Bindungsdomäne, zueinander aufweisen [96], können sich beide gegenseitig nicht ersetzen [301]. Studien zeigten, dass ein isolierter Knockout des MDMX vergleichbar wie ein Knockout des MDM2 zur embryonalen Letalität in den Mäusen führte, die nur durch eine Deletion des p53 gerettet werden konnten [105, 106, 302, 303]. Dies zeigt, dass MDMX wie MDM2 ebenfalls ein wichtiger Regulator des p53 darstellt [302, 303]. Zwar kann es die Transkriptionsaktivität des p53 hemmen [96], aber im Gegensatz zum MDM2 nicht zum Abbau durch Ubiquitinierung aufgrund der fehlenden E3-Ligase-Aktivität selbst fördern [304]. Es unterstützt jedoch MDM2 bei dessen Abbaufunktion des p53 durch Bildung eines heterodimeren Komplexes [301, 305] und die aus der Komplexierung resultierende Verlängerung der Halbwertszeit des MDM2 [301]. Beide üben somit zusammen einen synergistischen regulatorischen Effekt auf p53 aus [301]. Gleiches gilt vermutlich auch für die Wirkung auf p73 (vgl. Kap. 4.3.3) [251, 274].

Eine Antitumortherapie wäre somit effektiver, wenn Inhibitoren neben MDM2 auch gegen MDMX gerichtet sind [231, 306]. In einigen Studien banden MDM2-Inhibitoren zwar auch an MDMX, jedoch inhibierten die meisten bevorzugt MDM2 [61]. Aus diesem Grund werden MDM2-Inhibitoren für eine bessere, effektivere Therapie mit den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Inhibitoren (MAP-Kinase-Inhibitoren) oder Chemotherapeutika kombiniert, die die Aktivität des MDMX herunterregulieren [61]. Die Inhibition der Interaktion zwischen MDMX und p53 durch Nutlin-3a als Beispiel ist aufgrund der geringeren Affinität nicht ausreichend effektiv [231, 306]. Zudem ließ sich eine geringe Reaktivierung des p53 bei Zugabe von Nutlin-3a am ehesten auf die Überexpression des MDMX zurückführen [231], die die Transkriptionsaktivität des p53 unterdrückt [96]. Dies könnte auch erklären, warum MCF-7-Zellen, die MDMX stark überexprimieren, trotz einer Nutlin-3a-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in einer Studie vermindert auf die antitumorale Wirkung ansprachen [306]. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass VWK603 ebenfalls vermindert an MDMX binden könnte, da im *drug screening* als Vorversuch der Arbeitsgruppe „Wirkstoffentwicklung“ der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitätsklinikum Düsseldorf keine Apoptoseinduktion durch VWK603 mit 10  $\mu\text{M}$  in den MCF-7-Zellen, verglichen mit den MDA-MB-231-Zellen [2], zu beobachten war [unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe].

Exemplarisch wurde in einer Studie der Einsatz mit einem neuartigen MDM2-MDMX-Inhibitor in TNBC untersucht, der vielversprechende Antitumorwirkung zeigte. Er reduzierte in Kombination mit Doxorubicin effektiver und dosisabhängig die Zellviabilität in den TNBC-

Zelllinien im nanomolaren Bereich im Vergleich zu Nutlin-3a. Zudem erhöhte er die Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin und somit die Apoptosesensitivität. Weiterhin reduzierte die Kombinationstherapie das Tumorwachstum und die EMT der implantierten MDA-MB-231- und MDA-MB-468-Zellen *in vivo* [179]. Das im Kapitel 1.7.3 bereits erwähnte geklammerte  $\alpha$ -helikale Peptid ALRN-6924 gehört ebenfalls zu den dualen Inhibitoren. Dabei zeigte es als erster dualer Inhibitor in der klinischen Studie vielversprechende Ergebnisse in einigen p53-Wildtyp-Tumoren. Im Gegensatz zu den klassischen MDM2-Inhibitoren (s. Kap. 4.4.2) waren die myeloischen suppressiven Nebenwirkungen geringer. Zu den weiteren Nebenwirkungen dieses Inhibitors gehörten Fatigue, gastrointestinale Nebenwirkungen, Kopfschmerzen und Anämie [171].

Diese Daten unterstreichen das Potenzial der dualen MDM2-MDMX-Inhibitoren als therapeutischen Ansatz in hochmalignen Tumoren wie dem TNBC und sollten bei einer zukünftigen medizinalchemischen Optimierung von VWK603 berücksichtigt werden. Hierbei sollte die zusätzliche Bindung an MDMX zunächst untersucht und nachfolgend gegebenenfalls für eine effiziente therapeutische Anwendung optimiert werden.

#### 4.5 Limitationen der Untersuchungen und Ausblick

In den in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor VWK603 die Zellviabilität in TNBC-Zellen signifikant reduzierte [2]. Im direkten Vergleich zu der Referenzsubstanz Nutlin-3a konnte dabei festgestellt werden, dass VWK603 hinsichtlich der pharmakologischen Potenz Nutlin-3a übertrifft. Als wahrscheinlich grundlegender Mechanismus konnte die Induktion einer Apoptose in den Tumorzellen dargestellt werden [2]. Für eine weiterführende Validierung der Apoptoseinduktion können Methoden wie die Durchflusszytometrie zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der toten Zellen und zur Zellzyklusanalyse, Assays über die Caspaseaktivität 3, 7 und 9 und die Bestimmung der Expression von *cleaved* PARP und Cytochrom c herangezogen werden (vgl. Arbeiten von [161, 210, 215, 222]).

Es ist in der Literatur beschrieben, dass p53-Wildtyp-Tumore im Vergleich zu p53-mutierten Tumoren eine höhere Sensitivität gegenüber MDM2-Inhibitoren aufweisen [61, 162-164]. Es konnte jedoch in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass MDM2-adressierende Inhibitoren, wie hier für VWK603 gezeigt [2], auch p53-unabhängig eine Apoptose induzieren können [161, 178-180] und die  $IC_{50}$ -Werte mit den Werten für einige MDM2-Inhibitoren in p53-Wildtyp-Tumoren vergleichbar waren [162, 163, 180, 212, 213]. Da einzelne Arbeiten für Nutlin-3a eine p53-unabhängige Apoptoseinduktion über p73 zeigen konnten [161, 178, 222], soll dies als möglicher Wirkmechanismus auch zukünftig bei VWK603 validiert werden. Dabei ist über eine Zielprotein-Validierung mittels CETSA (*cellular thermal shift assay*) die Charakterisierung der

Interaktion zwischen MDM2 und den potenziellen Interaktionspartnern inklusive p73 geplant. Darüber hinaus könnte die Expression der Zielgene des p73 sowohl auf der mRNA-Ebene anhand einer qRT-PCR als auch auf der Proteinebene mittels einer Western-Blot-Analyse überprüft und auf diese Weise eine Wirkung von VWK603 auf p73 weiter bestätigt werden. Dabei wäre bei einer Adressierung der Interaktion zwischen MDM2 und p73 durch VWK603 eine verstärkte Expression weiterer proapoptotischer Zielgene und -proteine neben Bax wie z.B. Noxa und PUMA in den Versuchen zu erwarten (vgl. Arbeiten von [178, 222, 266, 273, 274]). Zur Kontrolle könnte vor VWK603-Behandlung über Transfektion der Zelllinien mit einer spezifischen siRNA (*small interfering RNA*) die p73-Genexpression herabreguliert werden, wodurch nach VWK603-Behandlung die Expressionsveränderung der p73-regulierten Gene gegenüber den p73 nicht reduzierten exprimierenden Zellen eingeschränkt werden sollte und hierüber weiter die VWK603/p73-Interaktion belegt werden könnte.

Diese hier diskutierten Methoden ergänzen die bisherige Charakterisierung des Wirkstoffs VWK603 und vervollständigen die Analyse des p53-unabhängigen zellviabilitätsreduzierenden Mechanismus.

Aufgrund der allgemeinen Resistenzentwicklung werden oft Kombinationen aus Chemotherapeutika mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Beim TNBC kommen therapeutisch gemäß der Leitlinie Taxane und Anthrazykline zur Anwendung [6] und seit Neustem ergänzt der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab die bisherige Therapie [17]. In verschiedenen Zellkulturstudien wurden potenzielle Substanzen mit Chemotherapeutika in Zelllinien kombiniert, um die Dosis der Chemotherapeutika zu reduzieren und eine höhere Apoptosesensitivität zu erreichen. Beispielsweise konnten in der Arbeit von Tonsing-Carter *et al.* eine erhöhte Apoptosesensitivität in TNBC-Zelllinien durch die Kombination von Nutlin-3a und Carboplatin erreicht werden [161]. Der MDM2-MDMX-Inhibitor von Fan *et al.* [179] und der potenzielle natürliche MDM2-Inhibitor Platycodin D [307] zeigten einen synergistischen antitumoralen Effekt in Kombination mit Doxorubicin. Zur Bestimmung eines therapeutischen Fensters und Untersuchung des synergistischen adjuvanten Effekts durch VWK603 sollte in Zukunft untersucht werden, ob VWK603 in nicht toxischen Konzentrationen beispielsweise effizient mit Paclitaxel oder Doxorubicin oder auch mit PD-1-Inhibitoren kombiniert werden kann.

Neben potenziellen synergistischen Wirkungen zu anderen Wirkstoffklassen sollte untersucht werden, ob VWK603 neben MDM2 auch MDMX adressiert bzw. VWK603 hinsichtlich einer zusätzlichen Adressierung von MDMX optimiert werden kann, da in TNBC eine erhöhte Expression von MDMX vorliegen kann [98]. Analog zu der oben beschriebenen synergistischen Behandlung mit Chemotherapeutika wäre auch eine Kombination mit einem MDMX-Inhibitor alternativ denkbar. Im Rahmen einer personalisierten Behandlung sollte hierbei MDMX als Biomarker beim Mammakarzinom in Betracht gezogen werden, um bei

primärer MDM2-Adressierung von VWK603 eine bessere zielgerichtete Therapie etablieren zu können.

Eine zytotoxische Wirkung in den nicht malignen Zellen durch VWK603 konnte in dieser Arbeit festgestellt und als mögliche Nebenwirkungen interpretiert werden. Hierbei zeigte VWK603 im Vergleich zu Nutlin-3a und in Bezug zur Wirkung in TNBC-Zellen eine geringere Toxizität in den gesunden Brustepithelzellen [2]. Die Ergebnisse *in-vitro*-Versuchen lassen sich jedoch nicht auf die Tiere oder auf den menschlichen Körper direkt übertragen. Zwischen den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen *in vitro* und der ersten klinischen Phase-I-Studie müssen noch weitere umfangreiche Toxizitätsstudien insbesondere in Kleintiermodellen durchgeführt werden. Unabhängig von noch ausstehenden Toxizitätsstudien wurde in dieser Arbeit bereits der Aspekt der Langzeitbehandlung berücksichtigt. In vielen Studien werden die Zellen der Tumormodelle mit neuen potenziellen Wirkstoffen maximal drei bis fünf Tage lang inkubiert (vgl. Arbeiten von [161, 179, 180, 273]). Durch die Erweiterung der Inkubationszeit auf sieben Tage wurde in dieser Arbeit versucht, eine möglichst kliniknahe Behandlung darzustellen. Als nächste Stufe vor den Versuchen *in vivo* könnte die Untersuchung der Wirksamkeit in 3D-Zellkulturmodellen dienen. Der Vorteil der 3D-Zellkulturmodelle besteht darin, dass die Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Kontakte berücksichtigt werden können [308]. Somit können die natürliche Morphologie des Brustgewebes und die biologischen Signalprozesse besser nachgestellt werden [309]. Dadurch erfolgt eine genauere Validierung der Wirkung. Anschließend würden dann die Versuche *in vivo* mit *Xenograft*-Mäusen erfolgen, in denen entweder kommerzielle Zelllinien oder menschliche Tumorzellen injiziert werden [310]. Sollten die Versuche *in vivo* eine signifikante Antitumorwirkung durch VWK603 zeigen, würde die klinische Phase-I-Studie am Menschen durchgeführt. Alternativ könnte man die bereits in klinischen Studien etablierten MDM2-Inhibitoren bei TNBC-Patientinnen testen. Wie für die einzelnen in diesem Kapitel genannten Punkte diskutiert, ergeben sich für VWK603 zukunftsweisende Ansätze und Pläne für eine erfolgreiche Weiterführung des vorliegenden Forschungsprojektes.

## 4.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde der neuartige MDM2-adressierende Inhibitor VWK603 als ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung des TNBC charakterisiert. Bislang sind die MDM2-Inhibitoren für ihre Wirkung in malignen Tumoren mit einem p53-Wildtyp bekannt [142]. In einigen Arbeiten konnte jedoch auch eine Zellviabilitätsreduktion durch den Einsatz der MDM2-Inhibitoren in malignen Tumoren trotz einer vorliegenden p53-Mutation gezeigt werden [161, 164, 178, 179, 222].

Zur Untersuchung der Wirkung in p53-mutierten TNBC wurde in dieser Arbeit der Wirkstoff VWK603 in verschiedenen TNBC-Zellkulturmodellen getestet und mit Nutlin-3a verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Nutlin-3a als auch VWK603 die Zellviabilität p53-unabhängig stark reduzierten. Es wurde eine höhere pharmakologische Potenz des VWK603 im Vergleich zu Nutlin-3a festgestellt [2]. Zur Überprüfung, ob die Zellviabilitätsreduktion auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen war, wurde dazu die Genexpression der apoptoserelevanten Gene Bax und Bcl-2 untersucht. Hier konnte unter VWK603-Behandlung eine erhöhte Bax/Bcl-2-Ratio bestimmt werden, die auf eine erhöhte Apoptosesensitivität mit mitochondrialer Beteiligung hinweist [2]. Um sowohl die Apoptoseinduktion als auch den Wirkmechanismus vollständig zu evaluieren, werden zukünftig weitere Versuche angestrebt. Trotz des antitumoralen Potenzials konnte eine geringere Toxizität in den nicht malignen Brustepithelzellen beobachtet werden [2].

Es ist jedoch bereits bekannt, dass MDM2-Inhibitoren bei Patienten Nebenwirkungen hervorrufen können [142]. Interessant ist in diesem Zusammenhang die zukünftige Evaluierung eines sinnvollen therapeutischen Fensters von MDM2-Inhibitoren beim TNBC. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen und anderen Arbeiten werfen dabei nun die Frage auf, ob die bereits in klinischen Studien etablierten MDM2-Inhibitoren auch bei TNBC-Patientinnen mit einer p53-Mutation effektiv wirken könnten. Um diese Frage zu adressieren, sollten zukünftige Patientenstudien in Betracht gezogen werden.

Obwohl mittlerweile eine gewisse Anzahl unterschiedlicher MDM2-Inhibitoren erhältlich ist, ist es aufgrund des häufig begrenzten pharmakologischen Potenzials [212] und neuer Resistenzbildungen [61] weiterhin notwendig, neue MDM2-spezifische Inhibitoren zu identifizieren und zu entwickeln. In diesem Zusammenhang muss in den geplanten *in vivo* Effizienz- und Toxizitätsstudien geprüft werden, ob VWK603 aufgrund seiner effizienten MDM2-Interaktion als neuartiges  $\alpha$ -Helix-Mimetikum hier das Spektrum der MDM2-Inhibitoren sinnvoll erweitern könnte.

Zusammenfassend bilden die gewonnenen Daten die erste Grundlage einer möglichen Anwendung von VWK603 bei der Behandlung des TNBC. Zukünftig sind einerseits sowohl Versuche hinsichtlich der Wirksamkeit in Kombination mit Chemotherapeutika als auch Untersuchungen bezüglich der Wirkmechanismen *in vitro* geplant. Dabei können zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften medizinalchemische Optimierungen durchgeführt werden. Weiterführend werden Studien bezüglich der Wirksamkeit und Nebenwirkungen *in vivo* angestrebt. Mit diesen geplanten Versuchen und Studien soll schließlich die mögliche zukünftige Anwendung von VWK603 bei TNBC-Patientinnen evaluiert und die Grundlage für eine mögliche zukünftige Einbindung in die personalisierte Therapie des TNBC geschaffen werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

### 5.1 Literaturverzeichnis

1. On, J.L. et al. Pharmacological Inhibition of MDM2 Induces Apoptosis in p53-Mutated Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025. 26(3): p. 1078.
2. On, J.L. et al. Development of a Bipyrimidineamide based  $\alpha$ -Helix Mimetic Lead Compound for efficient Targeting of MDM2 in Triple-Negative Breast Cancer. (Preprint). *bioRxiv*. 2024; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1101/2024.03.02.582899> (Zugriffsdatum: 10.03.2024).
3. Sung, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021. 71(3): p. 209-249.
4. Erdmann, F. et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021, Robert Koch-Institut. p. 172.
5. Britt, K.L., Cuzick, J. and Phillips, K.A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2020. 20(8): p. 417-436.
6. Cardoso, F. et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019. 30(8): p. 1194-1220.
7. Perou, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000. 406(6797): p. 747-52.
8. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften - AWMF online- Leitlinien/Mammakarzinom. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (*Kurzversion*). 2021; Verfügbar unter: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.4/LL\\_Mammakarzinom\\_Kurzversion\\_4.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Kurzversion_4.3.pdf) (Zugriffsdatum: 22.11.2022).
9. Plasilova, M.L. et al. Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (Baltimore)*. 2016. 95(35): p. e4614.
10. Waks, A.G. and Winer, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019. 321(3): p. 288-300.
11. Polyak, K. and Metzger Filho, O. SnapShot: breast cancer. *Cancer Cell*. 2012. 22(4): p. 562-562 e1.
12. Ovcaricek, T. et al. Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. *Radiol Oncol*. 2011. 45(1): p. 46-52.
13. Dawood, S. Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs*. 2010. 70(17): p. 2247-2258.
14. Gluz, O. et al. Triple-negative breast cancer-current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009. 20(12): p. 1913-27.
15. Goldhirsch, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013. 24(9): p. 2206-23.
16. Voduc, K.D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010. 28(10): p. 1684-91.
17. AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2023. 2023; Verfügbar unter: <https://www.ago-online.de> (Zugriffsdatum: 15.05.2023).
18. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011. 378(9793): p. 771-84.
19. Cameron, D. et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet*. 2017. 389(10075): p. 1195-1205.
20. Moja, L. et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012. 2012(4): p. CD006243.

21. Piccart, M. et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer in the APHINITY Trial: 6 Years' Follow-Up. *J Clin Oncol.* 2021. 39(13): p. 1448-1457.
22. Bertucci, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer.* 2008. 123(1): p. 236-40.
23. Rakha, E.A. et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009. 15(7): p. 2302-10.
24. Lehmann, B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011. 121(7): p. 2750-67.
25. Lehmann, B.D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One.* 2016. 11(6): p. e0157368.
26. Yin, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020. 22(1): p. 61.
27. Hwang, S.Y., Park, S. and Kwon, Y. Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacol Ther.* 2019. 199: p. 30-57.
28. Dent, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007. 13(15 Pt 1): p. 4429-34.
29. Dent, R. et al. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009. 115(2): p. 423-8.
30. Holm-Rasmussen, E.V. et al. Reduced risk of axillary lymphatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015. 149(1): p. 229-36.
31. Collett, K. et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005. 14(5): p. 1108-12.
32. Millikan, R.C. et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008. 109(1): p. 123-39.
33. Atchley, D.P. et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008. 26(26): p. 4282-8.
34. Schmid, P. et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020. 382(9): p. 810-821.
35. Schmid, P. et al. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022. 386(6): p. 556-567.
36. Lehmann, B.D. and Pietenpol, J.A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol.* 2014. 232(2): p. 142-50.
37. Chakrabarti, K.R. et al. Pharmacologic regulation of AMPK in breast cancer affects cytoskeletal properties involved with microtentacle formation and re-attachment. *Oncotarget.* 2015. 6(34): p. 36292-307.
38. Nag, S. et al. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res.* 2013. 27(4): p. 254-71.
39. Levine, A.J. The many faces of p53: something for everyone. *J Mol Cell Biol.* 2019. 11(7): p. 524-530.
40. Lane, D.P. and Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 1979. 278(5701): p. 261-3.
41. TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Last updated: 25.12.2022; Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> (Zugriffsdatum: 31.12.2022).
42. Levine, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994. 69(3): p. 409-16.
43. Koo, N., Sharma, A.K. and Narayan, S. Therapeutics Targeting p53-MDM2 Interaction to Induce Cancer Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(9).
44. Fields, S. and Jang, S.K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* 1990. 249(4972): p. 1046-9.
45. Meek, D.W. and Anderson, C.W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009. 1(6): p. a000950.

46. Zhu, J. et al. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *J Biol Chem.* 2000. 275(51): p. 39927-34.
47. Bourdon, J.C. et al. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene.* 1997. 14(1): p. 85-94.
48. el-Deiry, W.S. et al. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992. 1(1): p. 45-9.
49. Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science.* 1995. 267(5203): p. 1498-502.
50. Shaulsky, G. et al. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 1990. 10(12): p. 6565-77.
51. Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000. 408(6810): p. 307-10.
52. Chipuk, J.E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004. 303(5660): p. 1010-4.
53. Leu, J.I. et al. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 2004. 6(5): p. 443-50.
54. Levine, A.J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer.* 2020. 20(8): p. 471-480.
55. Horn, H.F. and Vousden, K.H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene.* 2007. 26(9): p. 1306-16.
56. Shieh, S.Y. et al. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997. 91(3): p. 325-34.
57. Banin, S. et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998. 281(5383): p. 1674-7.
58. Tibbetts, R.S. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 1999. 13(2): p. 152-7.
59. Giaccia, A.J. and Kastan, M.B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 1998. 12(19): p. 2973-83.
60. Khosravi, R. et al. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(26): p. 14973-7.
61. Wang, S. and Chen, F.E. Small-molecule MDM2 inhibitors in clinical trials for cancer therapy. *Eur J Med Chem.* 2022. 236: p. 114334.
62. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. 100(1): p. 57-70.
63. Li, G. and Ho, V.C. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol.* 1998. 139(1): p. 3-10.
64. Chen, X. et al. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 1996. 10(19): p. 2438-51.
65. Oda, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000. 288(5468): p. 1053-8.
66. Nakano, K. and Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001. 7(3): p. 683-94.
67. Zhang, C. et al. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol.* 2020. 12(9): p. 674-687.
68. Brosh, R. and Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009. 9(10): p. 701-13.
69. Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012. 490(7418): p. 61-70.
70. Pharoah, P.D., Day, N.E. and Caldas, C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 1999. 80(12): p. 1968-73.
71. Duffy, M.J., Synnott, N.C. and Crown, J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat.* 2018. 170(2): p. 213-219.

72. Hanel, W. et al. Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2013. 20(7): p. 898-909.
73. Song, H., Hollstein, M. and Xu, Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol.* 2007. 9(5): p. 573-80.
74. Olive, K.P. et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* 2004. 119(6): p. 847-60.
75. Lang, G.A. et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* 2004. 119(6): p. 861-72.
76. Hollstein, M. et al. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991. 253(5015): p. 49-53.
77. Kratz, C.P. et al. Overview of the Clinical Features of Li-Fraumeni Syndrome and the Current European ERN GENTURIS Guideline. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2022. 82(1): p. 42-49.
78. Kato, S. et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(14): p. 8424-9.
79. Kern, S.E. et al. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science.* 1992. 256(5058): p. 827-30.
80. Huang, Y. et al. Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle.* 2019. 18(24): p. 3442-3455.
81. Milner, J., Medcalf, E.A. and Cook, A.C. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol.* 1991. 11(1): p. 12-9.
82. Kogan-Sakin, I. et al. Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell Death Differ.* 2011. 18(2): p. 271-81.
83. Dong, P. et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene.* 2013. 32(27): p. 3286-95.
84. Thor, A.D. et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1992. 84(11): p. 845-55.
85. Fakhrazadeh, S.S., Trusko, S.P. and George, D.L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo j.* 1991. 10(6): p. 1565-9.
86. Cahilly-Snyder, L. et al. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet.* 1987. 13(3): p. 235-44.
87. Oliner, J.D. et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 1992. 358(6381): p. 80-3.
88. MDM2 proto-oncogene [Homo sapiens (human)]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Last updated: 25.12.2022; Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4193> (Zugriffsdatum: 26.12.2022).
89. Hou, H., Sun, D. and Zhang, X. The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. *Cancer Cell Int.* 2019. 19: p. 216.
90. Qin, J.J. et al. Natural product MDM2 inhibitors: anticancer activity and mechanisms of action. *Curr Med Chem.* 2012. 19(33): p. 5705-25.
91. Haines, D.S. et al. Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol.* 1994. 14(2): p. 1171-8.
92. Olson, D.C. et al. Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene.* 1993. 8(9): p. 2353-60.
93. Iwakuma, T. and Lozano, G. MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res.* 2003. 1(14): p. 993-1000.
94. Barak, Y. et al. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* 1994. 8(15): p. 1739-49.
95. Landers, J.E., Cassel, S.L. and George, D.L. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 1997. 57(16): p. 3562-8.

96. Shvarts, A. et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *Embo j.* 1996. 15(19): p. 5349-57.
97. Momand, J. et al. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26(15): p. 3453-3459.
98. Haupt, S. et al. The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. *J Mol Cell Biol.* 2017. 9(1): p. 53-61.
99. Onel, K. and Cordon-Cardo, C. MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res.* 2004. 2(1): p. 1-8.
100. Turbin, D.A. et al. MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006. 19(1): p. 69-74.
101. Jiang, M. et al. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer.* 1997. 74(5): p. 529-34.
102. Oliner, J.D., Saiki, A.Y. and Caenepeel, S. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016. 6(6).
103. Jones, S.N. et al. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(26): p. 15608-12.
104. de Rozieres, S. et al. The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2000. 19(13): p. 1691-7.
105. Jones, S.N. et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 1995. 378(6553): p. 206-8.
106. Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. and Lozano, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* 1995. 378(6553): p. 203-6.
107. Kussie, P.H. et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science.* 1996. 274(5289): p. 948-53.
108. Wu, X. et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993. 7(7a): p. 1126-32.
109. Reich, N.C. and Levine, A.J. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature.* 1984. 308(5955): p. 199-201.
110. Rogel, A. et al. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol.* 1985. 5(10): p. 2851-5.
111. Miles, X. et al. MDM2/X Inhibitors as Radiosensitizers for Glioblastoma Targeted Therapy. *Front Oncol.* 2021. 11: p. 703442.
112. Zauberman, A. et al. A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(14): p. 2584-92.
113. Fang, S. et al. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem.* 2000. 275(12): p. 8945-51.
114. Li, M. et al. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science.* 2003. 302(5652): p. 1972-5.
115. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2(3): p. 195-201.
116. Shi, D. et al. CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(38): p. 16275-80.
117. Grossman, S.R. et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science.* 2003. 300(5617): p. 342-4.
118. Maki, C.G., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53<sup>1</sup>. *Cancer Res.* 1996. 56(11): p. 2649-54.
119. Shangary, S. and Wang, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009. 49: p. 223-41.
120. Lukashchuk, N. and Vousden, K.H. Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol.* 2007. 27(23): p. 8284-95.
121. On, J. Die Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 über das Onkoprotein MDM2. Created in BioRender. 2025; Verfügbar unter: <https://BioRender.com/w43w866> (Zugriffsdatum: 28.02.2025).
122. Heinrich, P.C. et al. Der programmierte Zelltod – Apoptose, Nekroptose, Ferroptose und Pyroptose, in Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 2022, Springer Berlin Heidelberg. p. 825-834.

123. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019. 43(6): p. 582-592.
124. Xu, G. and Shi, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res.* 2007. 17(9): p. 759-71.
125. Lossi, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochem J.* 2022. 479(3): p. 357-384.
126. Kantari, C. and Walczak, H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011. 1813(4): p. 558-63.
127. Li, H. et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998. 94(4): p. 491-501.
128. On, J. Ablauf der Apoptose. Created in BioRender. 2025; Verfügbar unter: <https://BioRender.com/m82r640> (Zugriffsdatum: 28.02.2025).
129. Kalkavan, H. and Green, D.R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death & Differentiation.* 2018. 25(1): p. 46-55.
130. Cuda, C.M., Pope, R.M. and Perlman, H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016. 12(9): p. 543-58.
131. Müller, M. et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998. 188(11): p. 2033-45.
132. Owen-Schaub, L.B. et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 1995. 15(6): p. 3032-40.
133. Wong, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011. 30(1): p. 87.
134. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993. 74(4): p. 609-19.
135. Reed, J.C. Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest.* 1996. 97(11): p. 2403-4.
136. Raisova, M. et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2001. 117(2): p. 333-40.
137. Akhtar, S., Khan, M.K.A. and Arif, J.M. Evaluation and Elucidation Studies of Natural Aglycones for Anticancer Potential using Apoptosis-Related Markers: An In silico Study. *Interdiscip Sci.* 2018. 10(2): p. 297-310.
138. Singh, P. and Lim, B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2022. 24(3): p. 273-284.
139. Souers, A.J. et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013. 19(2): p. 202-8.
140. Alhoshani, A. et al. BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Onco Targets Ther.* 2020. 13: p. 13357-13370.
141. Tse, C. et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008. 68(9): p. 3421-8.
142. Konopleva, M. et al. MDM2 inhibition: an important step forward in cancer therapy. *Leukemia.* 2020. 34(11): p. 2858-2874.
143. Liang, Y., Besch-Williford, C. and Hyder, S.M. PRIMA-1 inhibits growth of breast cancer cells by re-activating mutant p53 protein. *Int J Oncol.* 2009. 35(5): p. 1015-23.
144. Carrasco, R.A. et al. Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol Cancer Ther.* 2011. 10(2): p. 221-32.
145. Natale, R. et al. Evaluation of antitumor activity using change in tumor size of the survivin antisense oligonucleotide LY2181308 in combination with docetaxel for second-line treatment of patients with non-small-cell lung cancer: a randomized open-label phase II study. *J Thorac Oncol.* 2014. 9(11): p. 1704-8.
146. Devarajan, E. et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene.* 2002. 21(57): p. 8843-51.
147. Allen, J.E. et al. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects. *Sci Transl Med.* 2013. 5(171): p. 171ra17.

148. Bergman, P.J. and Harris, D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1997. 27(1): p. 47-57.
149. Lanning, M. and Fletcher, S. Recapitulating the alpha-helix: nonpeptidic, low-molecular-weight ligands for the modulation of helix-mediated protein-protein interactions. *Future Med Chem.* 2013. 5(18): p. 2157-74.
150. Ryan, D.P. and Matthews, J.M. Protein-protein interactions in human disease. *Curr Opin Struct Biol.* 2005. 15(4): p. 441-6.
151. Davis, J.M., Tsou, L.K. and Hamilton, A.D. Synthetic non-peptide mimetics of alpha-helices. *Chem Soc Rev.* 2007. 36(2): p. 326-34.
152. Petta, I. et al. Modulation of Protein-Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics. *Mol Ther.* 2016. 24(4): p. 707-18.
153. Metz, A., Ciglia, E. and Gohlke, H. Modulating protein-protein interactions: from structural determinants of binding to druggability prediction to application. *Curr Pharm Des.* 2012. 18(30): p. 4630-47.
154. Pelay-Gimeno, M. et al. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015. 54(31): p. 8896-927.
155. European Medicines Agency (EMA). Venclxyto (Venetoclax). 2016. Last Updated: 25.06.2021; Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/venclxyto> (Zugriffsdatum: 19.12.2022).
156. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves venetoclax for CLL and SLL. 2019. Last Updated: 15.05.2019; Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-venetoclax-ctl-and-sll> (Zugriffsdatum: 29.01.2023).
157. Perini, G.F. et al. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2018. 11(1): p. 65.
158. Zhou, J.D. et al. BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagnostic Pathology.* 2019. 14(1): p. 68.
159. Guerra, V.A., DiNardo, C. and Konopleva, M. Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019. 32(2): p. 145-153.
160. Hanada, M. et al. bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 1993. 82(6): p. 1820-1828.
161. Tonsing-Carter, E. et al. Potentiation of Carboplatin-Mediated DNA Damage by the Mdm2 Modulator Nutlin-3a in a Humanized Orthotopic Breast-to-Lung Metastatic Model. *Mol Cancer Ther.* 2015. 14(12): p. 2850-63.
162. Vassilev, L.T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004. 303(5659): p. 844-8.
163. Tovar, C. et al. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Res.* 2013. 73(8): p. 2587-97.
164. Ding, Q. et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem.* 2013. 56(14): p. 5979-83.
165. Konopleva, M.Y. et al. Idasanutlin plus cytarabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: results of the MIRROS trial. *Blood Adv.* 2022. 6(14): p. 4147-4156.
166. On, J. Beispielhafte Sekundärstrukturelemente. Created in BioRender. 2025; Verfügbar unter: <https://BioRender.com/i69i900> (Zugriffsdatum: 01.03.2025).
167. Kalbitzer, H.R. Proteine – Struktur und Funktion, in Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 2022, Springer Berlin Heidelberg. p. 79-108.
168. Pauling, L., Corey, R.B. and Branson, H.R. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1951. 37(4): p. 205-11.
169. Barlow, D.J. and Thornton, J.M. Helix geometry in proteins. *Journal of Molecular Biology.* 1988. 201(3): p. 601-619.

170. Bullock, B.N., Jochim, A.L. and Arora, P.S. Assessing Helical Protein Interfaces for Inhibitor Design. *Journal of the American Chemical Society*. 2011. 133(36): p. 14220-14223.
171. Saleh, M.N. et al. Phase 1 Trial of ALRN-6924, a Dual Inhibitor of MDMX and MDM2, in Patients with Solid Tumors and Lymphomas Bearing Wild-type TP53. *Clin Cancer Res*. 2021. 27(19): p. 5236-5247.
172. ClinicalTrials.gov. Safety Study of ALRN-6924 in Patients With Acute Myeloid Leukemia or Advanced Myelodysplastic Syndrome. Identifier: NCT02909972. Last updated: 19.11.2019; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02909972> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
173. ClinicalTrials.gov. Phase 1 Study of the Dual MDM2/MDMX Inhibitor ALRN-6924 in Pediatric Cancer. Identifier: NCT03654716. Last updated: 15.06.2022; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03654716> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
174. ClinicalTrials.gov. ALRN-6924 in Patients With Advanced Solid Tumors or Lymphomas. Identifier: NCT02264613. Last updated: 14.07.2020; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02264613> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
175. ClinicalTrials.gov. A Study of ALRN-6924 for the Prevention of Chemotherapy-induced Side Effects (Chemoprotection). Identifier: NCT04022876. Last updated: 10.10.2022; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04022876> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
176. ClinicalTrials.gov. ALRN-6924 and Paclitaxel in Treating Patients With Advanced, Metastatic, or Unresectable Solid Tumors. Identifier: NCT03725436. Last updated: 26.08.2022; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03725436> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
177. Ribeiro, R. et al. Immunotherapy in triple-negative breast cancer: Insights into tumor immune landscape and therapeutic opportunities. *Front Mol Biosci*. 2022. 9: p. 903065.
178. Lau, L.M. et al. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene*. 2008. 27(7): p. 997-1003.
179. Fan, Y. et al. Dual-target MDM2/MDMX inhibitor increases the sensitization of doxorubicin and inhibits migration and invasion abilities of triple-negative breast cancer cells through activation of TAB1/TAK1/p38 MAPK pathway. *Cancer Biol Ther*. 2019. 20(5): p. 617-632.
180. Wang, W. et al. The pyrido[b]indole MDM2 inhibitor SP-141 exerts potent therapeutic effects in breast cancer models. *Nat Commun*. 2014. 5: p. 5086.
181. Woloschin, V. Synthese und biologische Evaluation Pyrimidon- und Pyrimidinbasierter  $\alpha$ -Helixmimetika [Dissertation]. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2020.
182. American Type Culture Collection. HCT 116. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/ccl-247> (Zugriffsdatum: 20.11.2022)
183. American Type Culture Collection. MCF10A. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/crl-10317> (Zugriffsdatum: 20.11.2022).
184. Marzec, K.A. et al. Involvement of p53 in insulin-like growth factor binding protein-3 regulation in the breast cancer cell response to DNA damage. *Oncotarget*. 2015. 6(29): p. 26583-98.
185. American Type Culture Collection. MDA-MB-231. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/htb-26> (Zugriffsdatum: 20.11.2022)
186. Wasielewski, M. et al. Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2006. 99(1): p. 97-101.
187. American Type Culture Collection. MDA-MB-436. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/htb-130> (Zugriffsdatum: 20.11.2022).
188. American Type Culture Collection. MDA-MB-468. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/htb-132> (Zugriffsdatum: 20.11.2022)
189. American Type Culture Collection. NIH/3T3. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/crl-1658> (Zugriffsdatum: 20.11.2022).
190. Thermo Fisher Scientific. Advanced RPMI 1640 Medium. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/12633012> (Zugriffsdatum: 26.08.2023).

191. Thermo Fisher Scientific. 12633 - Advanced RPMI 1640 [Media formulations]. Ohne Datum; Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/technical-resources/media-formulation.226.html> (Zugriffsdatum: 26.08.2023).
192. Brunner, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*. 2010. 27(1): p. 53-62.
193. Caneparo, C. et al. Evaluation of a Serum-Free Medium for Human Epithelial and Stromal Cell Culture. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(17).
194. Cui, X.S. et al. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing in vitro. *Reproduction*. 2004. 127(1): p. 125-30.
195. Faheina-Martins, G.V. et al. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2011. 25(5): p. 290-6.
196. Barnes, D. and Sato, G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*. 1980. 22(3): p. 649-655.
197. van der Valk, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*. 2010. 24(4): p. 1053-1063.
198. Itahana, Y. et al. Role of Id-2 in the Maintenance of a Differentiated and Noninvasive Phenotype in Breast Cancer Cells<sup>1</sup>. *Cancer Res*. 2003. 63(21): p. 7098-7105.
199. Debnath, J., Muthuswamy, S.K. and Brugge, J.S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*. 2003. 30(3): p. 256-68.
200. Promega. ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System Technical Manual. Last updated: 09/2021; Verfügbar unter: <https://www.promega.de/products/nucleic-acid-extraction/rna/reliaprep-rna-miniprep-systems/?catNum=Z6010&tabset0=0#protocols> (Zugriffsdatum: 26.08.2023).
201. Thermo Fisher Scientific. SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Last updated: 05.03.2007; Verfügbar unter: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fsuperscript\\_firststrand\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fsuperscript_firststrand_man.pdf) (Zugriffsdatum: 26.08.2023).
202. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25(4): p. 402-8.
203. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008. 3(6): p. 1101-8.
204. Creative Commons. Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License. Verfügbar unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0> (Zugriffsdatum: 01.03.2025).
205. Bargou, R.C. et al. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996. 97(11): p. 2651-2659.
206. Lima, R.T. et al. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 2004. 11(5): p. 309-16.
207. Yang, E. and Korsmeyer, S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*. 1996. 88(2): p. 386-401.
208. Perlman, H. et al. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999. 6(1): p. 48-54.
209. Boncler, M. et al. Differentiated mitochondrial function in mouse 3T3 fibroblasts and human epithelial or endothelial cells in response to chemical exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019. 124(2): p. 199-210.
210. Qin, J.J. et al. Identification of lineariifollianoid A as a novel dual NFAT1 and MDM2 inhibitor for human cancer therapy. *J Biomed Res*. 2016. 30(4): p. 322-33.
211. Synnott, N.C. et al. Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? *Int J Cancer*. 2017. 140(1): p. 234-246.

212. Chen, F., Wang, W. and El-Deiry, W.S. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2010. 80(5): p. 724-30.
213. Shangary, S. et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. 105(10): p. 3933-8.
214. Kong, Y. et al. Platycodin D, a metabolite of Platycodin grandiflorum, inhibits highly metastatic MDA-MB-231 breast cancer growth in vitro and in vivo by targeting the MDM2 oncogene. *Oncol Rep.* 2016. 36(3): p. 1447-56.
215. Sp, N. et al. Potential Antitumor Effects of 6-Gingerol in p53-Dependent Mitochondrial Apoptosis and Inhibition of Tumor Sphere Formation in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021. 22(9).
216. Inao, T. et al. Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin. *Oncotarget.* 2018. 9(39): p. 25545-25556.
217. Oakes, S.R. et al. Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109(8): p. 2766-71.
218. Dawson, S.J. et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer.* 2010. 103(5): p. 668-75.
219. Karmakar, S., Banik, N.L. and Ray, S.K. Curcumin suppressed anti-apoptotic signals and activated cysteine proteases for apoptosis in human malignant glioblastoma U87MG cells. *Neurochem Res.* 2007. 32(12): p. 2103-13.
220. Del Principe, M.I. et al. Clinical significance of bax/bcl-2 ratio in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2016. 101(1): p. 77-85.
221. Kojima, K. et al. Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. *Cell Cycle.* 2006. 5(23): p. 2778-86.
222. Wang, J. et al. MDM2 antagonist can inhibit tumor growth in hepatocellular carcinoma with different types of p53 in vitro. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011. 26(2): p. 371-7.
223. Karami, P. et al. Nanoformulation of Polyphenol Curcumin Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Drug-Resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Molecules.* 2022. 27(9).
224. Azimian, H. et al. Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy. *Iran J Basic Med Sci.* 2018. 21(3): p. 325-332.
225. Zhu, L. et al. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. *Mol Med Rep.* 2015. 12(1): p. 1151-6.
226. Dudgeon, D.D. et al. Implementation of a 220,000-compound HCS campaign to identify disruptors of the interaction between p53 and hDM2 and characterization of the confirmed hits. *J Biomol Screen.* 2010. 15(7): p. 766-82.
227. Hurd, C. et al. Regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, by estrogen and antiestrogens in breast cancer cells. *Oncogene.* 1997. 15(8): p. 991-995.
228. Hurd, C. et al. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. *J Biol Chem.* 1995. 270(48): p. 28507-10.
229. Aziz, M.H., Shen, H. and Maki, C.G. Acquisition of p53 mutations in response to the non-genotoxic p53 activator Nutlin-3. *Oncogene.* 2011. 30(46): p. 4678-86.
230. Michaelis, M. et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death Dis.* 2011. 2(12): p. e243.
231. Hu, B. et al. MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J Biol Chem.* 2006. 281(44): p. 33030-5.
232. Peugeot, S. and Selivanova, G. MDM2-PROTAC versus MDM2 Inhibitors: Beyond p53 Reactivation. *Cancer Discov.* 2023. 13(5): p. 1043-1045.
233. Adams, C.M. et al. Targeted MDM2 Degradation Reveals a New Vulnerability for p53-Inactivated Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Discov.* 2023. 13(5): p. 1210-1229.
234. Canon, J. et al. The MDM2 Inhibitor AMG 232 Demonstrates Robust Antitumor Efficacy and Potentiates the Activity of p53-Inducing Cytotoxic Agents. *Mol Cancer Ther.* 2015. 14(3): p. 649-58.

235. Vassilev, L.T. Small-Molecule Antagonists of p53-MDM2 Binding: Research Tools and Potential Therapeutics. *Cell Cycle*. 2014. 3(4): p. 417-419.
236. Kaghad, M. et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997. 90(4): p. 809-19.
237. Yang, A. et al. *p63*, a *p53* Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell*. 1998. 2(3): p. 305-316.
238. Trink, B. et al. A new human p53 homologue. *Nat Med*. 1998. 4(7): p. 747-8.
239. Yang, A. and McKeon, F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000. 1(3): p. 199-207.
240. Irwin, M. et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*. 2000. 407(6804): p. 645-8.
241. Jost, C.A., Marin, M.C. and Jr, W.G.K. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997. 389(6647): p. 191-194.
242. Zhu, J. et al. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*. 1998(0008-5472 (Print)).
243. Moll, U.M. and Slade, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2004. 2(7): p. 371-86.
244. Yang, A. et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000. 404(6773): p. 99-103.
245. Melino, G., De Laurenzi, V. and Vousden, K.H. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2(8): p. 605-15.
246. Han, S. et al. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol*. 1999. 25(2): p. 194-8.
247. Urist, M. et al. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev*. 2004. 18(24): p. 3041-54.
248. Flores, E.R. et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 2002. 416(6880): p. 560-4.
249. Melino, G. et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*. 2004. 279(9): p. 8076-83.
250. Bálint, E., Bates, S. and Vousden, K.H. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene*. 1999. 18(27): p. 3923-9.
251. Ongkeko, W.M. et al. MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Current Biology*. 1999. 9(15): p. 829-832.
252. Deyoung, M.P. and Ellisen, L.W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007. 26(36): p. 5169-83.
253. Dobbstein, M. et al. Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene*. 1999. 18(12): p. 2101-6.
254. Stindt, M.H. et al. Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene*. 2015. 34(33): p. 4300-10.
255. Zeng, X. et al. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol*. 1999. 19(5): p. 3257-66.
256. Di Como, C.J., Gaiddon, C. and Prives, C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1999. 19(2): p. 1438-49.
257. Gaiddon, C. et al. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*. 2001. 21(5): p. 1874-87.
258. Irwin, M.S. et al. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*. 2003. 3(4): p. 403-10.
259. Santini, S. et al. Interaction of mutant p53 with p73: a Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Spectroscopy study. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1840(6): p. 1958-64.
260. Di Agostino, S. et al. The disruption of the protein complex mutantp53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle*. 2008. 7(21): p. 3440-7.

261. Kravchenko, J.E. et al. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(17): p. 6302-7.
262. Bergamaschi, D. et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2003. 3(4): p. 387-402.
263. Vayssade, M. et al. P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2005. 116(6): p. 860-9.
264. Choi, E.K. et al. SH003 selectively induces p73-dependent apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016. 14(4): p. 3955-60.
265. Huang, L. et al. Curcumol triggers apoptosis of p53 mutant triple-negative human breast cancer MDA-MB 231 cells via activation of p73 and PUMA. *Oncol Lett*. 2017. 14(1): p. 1080-1088.
266. Tiwary, R. et al.  $\alpha$ -TEA cooperates with chemotherapeutic agents to induce apoptosis of p53 mutant, triple-negative human breast cancer cells via activating p73. *Breast Cancer Res*. 2011. 13(1): p. R1.
267. Rozenberg, J.M. et al. The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. *Biol Direct*. 2021. 16(1): p. 23.
268. Ahomadegbe, J.C. et al. Loss of heterozygosity, allele silencing and decreased expression of p73 gene in breast cancers: prevalence of alterations in inflammatory breast cancers. *Oncogene*. 2000. 19(47): p. 5413-8.
269. Dominguez, G. et al. Wild Type p73 Overexpression and High-Grade Malignancy in Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2001. 66(3): p. 183-190.
270. Stiewe, T., Theseling, C.C. and Pützer, B.M. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem*. 2002. 277(16): p. 14177-85.
271. Tomasini, R. et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*. 2008. 22(19): p. 2677-91.
272. Peirce, S.K. and Findley, H.W. The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *Int J Oncol*. 2009. 34(5): p. 1395-402.
273. Gomes, S. et al. New inhibitor of the TAp73 interaction with MDM2 and mutant p53 with promising antitumor activity against neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2019. 446: p. 90-102.
274. Sznarkowska, A. et al. Reactivation of TAp73 tumor suppressor by protoporphyrin IX, a metabolite of aminolevulinic acid, induces apoptosis in TP53-deficient cancer cells. *Cell Div*. 2018. 13: p. 10.
275. Wang, X. et al. MDM2 and MDMX can interact differently with ARF and members of the p53 family. *FEBS Lett*. 2001. 490(3): p. 202-8.
276. Malik, N. et al. CBF $\beta$  cooperates with p53 to maintain TAp73 expression and suppress breast cancer. *PLoS Genet*. 2021. 17(5): p. e1009553.
277. Gomez, L.C. et al. TP73 DNA methylation and upregulation of  $\Delta$ Np73 are associated with an adverse prognosis in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2018. 71(1): p. 52-58.
278. Wilhelm, M.T. et al. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*. 2010. 24(6): p. 549-60.
279. Qin, J.J. et al. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: Recent advances and implications in cancer medicine. *Genes Dis*. 2018. 5(3): p. 204-219.
280. Clement, J.A. et al. Discovery of new pyridoacridine alkaloids from *Lissoclinum* cf. *badium* that inhibit the ubiquitin ligase activity of Hdm2 and stabilize p53. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008. 16(23): p. 10022-10028.
281. Bykov, V.J. et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002. 8(3): p. 282-8.
282. Jones, R.J. et al. Drug resistance to inhibitors of the human double minute-2 E3 ligase is mediated by point mutations of p53, but can be overcome with the p53 targeting agent RITA. *Mol Cancer Ther*. 2012. 11(10): p. 2243-53.
283. Zhao, C.Y. et al. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle*. 2010. 9(9): p. 1847-55.

284. Issaeva, N. et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-MDM2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med.* 2004. 10(12): p. 1321-8.
285. ClinicalTrials.gov. Atezolizumab and Cobimetinib or Idasanutlin in Participants With Stage IV or Unresectable Recurrent Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. Identifier: NCT03566485. Last updated: 11.08.2021; Verfügbar unter: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03566485> (Zugriffsdatum: 21.01.2023).
286. Marcellino, B.K. et al. Transient expansion of TP53 mutated clones in polycythemia vera patients treated with idasanutlin. *Blood Adv.* 2020. 4(22): p. 5735-5744.
287. Hoffman-Luca, C.G. et al. Significant Differences in the Development of Acquired Resistance to the MDM2 Inhibitor SAR405838 between In Vitro and In Vivo Drug Treatment. *PLoS One.* 2015. 10(6): p. e0128807.
288. Chapeau, E.A. et al. Resistance mechanisms to TP53-MDM2 inhibition identified by in vivo piggyBac transposon mutagenesis screen in an Arf(-/-) mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017. 114(12): p. 3151-3156.
289. Ambrosini, G. et al. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene.* 2007. 26(24): p. 3473-81.
290. Marchetti, P. et al. Weekly administration of paclitaxel: theoretical and clinical basis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. 44 Suppl: p. S3-13.
291. Sharma, N. et al. Multiple factors other than p53 influence colon cancer sensitivity to paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000. 46(4): p. 329-37.
292. Fan, S. et al. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment. *Clin Cancer Res.* 1998. 4(4): p. 1047-54.
293. Kandioler-Eckersberger, D. et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000. 6(1): p. 50-6.
294. Schaafsma, E. et al. Predicting clinical outcomes of cancer patients with a p53 deficiency gene signature. *Sci Rep.* 2022. 12(1): p. 1317.
295. Joo, W.D., Visintin, I. and Mor, G. Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas.* 2013. 76(4): p. 308-14.
296. Lehmann, S. et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2012. 30(29): p. 3633-9.
297. Deneberg, S. et al. An open-label phase I dose-finding study of APR-246 in hematological malignancies. *Blood Cancer Journal.* 2016. 6(7): p. e447-e447.
298. Yu, Q. et al. Amplification of Mdmx and overexpression of MDM2 contribute to mammary carcinogenesis by substituting for p53 mutations. *Diagnostic Pathology.* 2014. 9(1): p. 71.
299. Miranda, P.J. et al. MDM4 is a rational target for treating breast cancers with mutant p53. *J Pathol.* 2017. 241(5): p. 661-670.
300. Gao, C. et al. Context-dependent roles of MDMX (MDM4) and MDM2 in breast cancer proliferation and circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2019. 21(1): p. 5.
301. Gu, J. et al. Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem.* 2002. 277(22): p. 19251-4.
302. Parant, J. et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet.* 2001. 29(1): p. 92-5.
303. Finch, R.A. et al. mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo. *Cancer Res.* 2002. 62(11): p. 3221-5.
304. Stad, R. et al. Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO reports.* 2001. 2(11): p. 1029-1034.
305. Linares, L.K. et al. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(21): p. 12009-12014.
306. Graves, B. et al. Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109(29): p. 11788-93.

307. Tang, Z.H. et al. Platycodin D from *Platycodonis Radix* enhances the anti-proliferative effects of doxorubicin on breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Chin Med.* 2014. 9: p. 16.
308. Pampaloni, F., Reynaud, E.G. and Stelzer, E.H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007. 8(10): p. 839-45.
309. Roelofs, C. et al. Breast tumour organoids: promising models for the genomic and functional characterisation of breast cancer. *Biochem Soc Trans.* 2019. 47(1): p. 109-117.
310. Murayama, T. and Gotoh, N. Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. *Cells.* 2019. 8(6).

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Tumorsuppressorproteins p53. ....	6
Abb. 2: Aufbau des Onkoproteins MDM2. ....	9
Abb. 3: Die Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 über das Onkoprotein MDM2. ...	12
Abb. 4: Ablauf der Apoptose. ....	13
Abb. 5: Die Wirkungsweise der Protein-Protein-Interaktionsmodulatoren.....	18
Abb. 6: Strukturformel der MDM2-Inhibitoren Idasanutlin und Nutlin-3a. ....	20
Abb. 7: Beispielhafte Sekundärstrukturelemente.....	20
Abb. 8: Strukturformel des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603.....	22
Abb. 9: Formel zur Berechnung der gesamten Zellzahl unter Anwendung einer Neubauer-Zählkammer.....	30
Abb. 10: Reaktionsschema des <i>CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assays</i> . ....	33
Abb. 11: Formel des ersten Schritts bei der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. ....	38
Abb. 12: Formel des zweiten Schritts bei der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. ....	38
Abb. 13: Formel des dritten Schritts bei der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. ....	38
Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603 und DMSO in drei TNBC-Zelllinien.....	40
Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Analysen von Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien.....	42
Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603, Nutlin-3a, Paclitaxel und DMSO in den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout. ....	45
Abb. 17: VWK603 erhöht die Bax/Bcl-2-Ratio in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen. ....	48
Abb. 18: Darstellung der relativen Genexpression der Apoptosegene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in der Zelllinie MDA-MB-231.....	49
Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603 und DMSO in NIH-3T3-Fibroblasten. ....	51
Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Analysen von VWK603, Nutlin-3a und DMSO in MCF-10A-Zellen.....	52
Abb. 21: Vergleich des Aufbaus von p53 und p73.....	62
Abb. 22: Mögliche Wirkmechanismen des neuartigen MDM2-adressierenden Inhibitors VWK603. ....	65

### 5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms. ....	2
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien. ....	24
Tabelle 3: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung. ....	25
Tabelle 4: Verwendete Wirkstoffe. ....	26
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien. ....	26
Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte. ....	27
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	27
Tabelle 8: Verwendete Kits. ....	28
Tabelle 9: Verwendete Primer. ....	29
Tabelle 10: Verwendete Software. ....	29
Tabelle 11: Erster Mastermix des Kits <i>SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR</i> . ....	35
Tabelle 12: Zweiter Mastermix des Kits <i>SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR</i> . ....	36
Tabelle 13: qRT-PCR-Reaktionsansatz pro Gen. ....	37
Tabelle 14: Standardprogramm für qRT-PCR. ....	37
Tabelle 15: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der Substanz VWK603 in drei TNBC-Zelllinien. ....	41
Tabelle 16: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der Substanz Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien. ....	42
Tabelle 17: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte und Vergleich der Substanzen VWK603 und Nutlin-3a in drei TNBC-Zelllinien. ....	43
Tabelle 18: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel in den Zelllinien HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout und Vergleich der IC <sub>50</sub> -Werte der Substanzen zwischen den beiden Zelllinien. ....	46
Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse beim Vergleich der IC <sub>50</sub> -Werte der Substanzen VWK603, Nutlin-3a und Paclitaxel in der jeweiligen Zelllinie HCT116 mit p53-Wildtyp und p53-Knockout. ....	46
Tabelle 20: Zusammenfassung der Bax/Bcl-2-Ratio von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen. ....	48
Tabelle 21: Zusammenfassung der relativen Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen (normalisiert auf GAPDH). ....	49
Tabelle 22: Zusammenfassung der relativen Genexpression der Gene Bax und Bcl-2 von VWK603 und DMSO in nicht toxischen Konzentrationen in den MDA-MB-231-Zellen (normalisiert auf HPRT1). ....	49
Tabelle 23: IC <sub>50</sub> -Wert der Substanz VWK603 in der Zelllinie NIH-3T3. ....	51
Tabelle 24: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte und Vergleich der Substanzen VWK603 und Nutlin-3a in der Zelllinie MCF-10A. ....	52

Tabelle 25: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte und Vergleich der Substanz VWK603 zwischen gesunden und karzinösen Brustzellen. ....	53
Tabelle 26: Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte und Vergleich der Substanz Nutlin-3a zwischen gesunden und karzinösen Brustzellen. ....	53
Tabelle 27: Wirkmechanismen der Substanzen mit einem Einfluss auf den p53-MDM2- Signalweg.....	66

---

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken, die mich auf verschiedene Art und Weise auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Doktormutter **Frau Professor Dr. med. Tanja Fehm**. Ich danke ihr für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Begutachtung der Arbeit sowie ihr wertvolles, fachliches Feedback und ihre stetige Unterstützung während des gesamten Projektes.

Ein großer Dank gebührt **Herrn Professor Dr. med. Nikolas Stöcklein** für seine hilfreichen Ratschläge hinsichtlich der Publikation und für die Begutachtung der Dissertation.

Danken möchte ich auch **Herrn Professor Dr. med. Georg Gasteiger** für die externe Begutachtung der Arbeit.

Bei **Herrn Professor Dr. med. Georg Pongratz** bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der Zweitbetreuung sowie sein Interesse am Fortschritt des Projektes.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Betreuer, **Herrn Dr. med. nat. Knud Esser**, für seine unermüdliche Unterstützung und gesamte Betreuung meiner Arbeit, von der Einarbeitung im Labor bis zum Korrekturlesen meiner Dissertation. Durch ihn, vor allem durch seine Begeisterung für die Wissenschaft und seine fachliche Expertise, konnte ich als Medizinerin einen sehr guten Einblick in die tiefe Grundlagenforschung gewinnen, die mir im Studium niemals begegnen würde. Zudem hatte er bei verschiedenen Problemen und Fragestellungen immer ein offenes Ohr für mich und dazu hilfreiche Tipps sowie kreative Lösungsansätze parat. Der Austausch und die Zusammenarbeit mit ihm während dieser Zeit waren für mich auf fachlicher und persönlicher Ebene sehr bereichernd und wertvoll. Danken möchte ich ihm auch herzlichst dafür, dass er stets seit Beginn ein großes Vertrauen in mich hatte und mich motivierte, an neuen Herausforderungen zu wachsen. Seine Unterstützung war für die Entstehung dieser Arbeit sehr maßgeblich und ich weiß seine Hilfe sehr zu schätzen.

Bei **Herrn Professor Dr. rer. nat. Thomas Kurz** möchte ich mich sowohl für die Bereitstellung der Wirkstoffe als auch für die interessanten Anregungen und Diskussionen über VWK603 bedanken.

Ein weiterer großer Dank gilt **Herrn Professor Dr. rer. nat. Hans Neubauer** und **Herrn Dr. rer. nat. Dieter Niederacher** für die stetige und fachliche Diskussionsbereitschaft sowie für die hilfreichen Ratschläge und spannenden Ideen.

Ein weiterer Dank richtet sich an **Herrn Dr. rer. nat. Sanil Bhatia** aus der Kinderonkologie für die Bereitstellung der Kolonkarzinomzellen.

---

Zusätzlich möchte ich mich bei **Herrn PD Dr. rer. nat. Torsten Lowin** für seine Durchsicht meiner Arbeit und sein wertvolles Feedback dazu bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an **das gesamte Team des Forschungslabors der Frauenklinik**, insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Wirkstoffentwicklung“, für die gute, familiäre Arbeitsatmosphäre und wertvolle Unterstützung.

Danken möchte ich mich an dieser Stelle nochmals herzlich bei **Frau Professor Fehm, Herrn Dr. Esser, Herrn Professor Neubauer** und **Herrn Dr. Niederacher** für die Ermöglichung der Teilnahme an den beiden renommierten Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe und der Deutschen Gesellschaft für Senologie sowie für die stetige Unterstützung bei der Vorbereitung der Kongressvorträge.

Abschließend möchte ich mich bei **meiner Familie** und **meinen Freunden** bedanken, die mich bedingungslos und in jeder Hinsicht auf ihre eigene Art und Weise unterstützt haben.