

Die Wirkung neuartiger Zelltod-Aktivatoren auf das Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Stevens
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Februar 2017

aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Csaba Mahotka

Korreferent: Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juni 2017

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	X
Summary.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie bösartiger Erkrankungen der Niere.....	1
1.2. Konventionelle Behandlungsstrategien bei Nierenzellkarzinomen und ihre Grenzen.....	2
1.3. Gestörte Zellhomöostase in Nierenzellkarzinomzellen.....	3
1.4. Zelltodsignalwege einer Zelle zur Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase.....	5
1.5. Die Apoptose – ein Caspase-abhängiger Zelltod.....	7
1.5.1. Der intrinsische Signalweg.....	8
1.5.2. Der extrinsische Signalweg.....	12
1.6. Aktivierung der Apoptose über den TNF-Rezeptor.....	13
1.7. Die Nekroptose - ein Caspase-unabhängiger Zelltodmechanismus.....	16
1.8. Der JNK-Signalweg, eine alternative Form des Caspase-unabhängigen Zelltods.....	17
1.9. Die Rolle der IAPs als natürliche Hemmer von Zelltodmechanismen.....	18
1.10. Neue <i>Small Molecules</i> als Zelltod-Aktivatoren mit dem Ziel, IAPs zu inhibieren.....	21
1.11. Die klarzellige Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 als Modell einer XIAP-vermittelten Resistenz.....	24
1.12. Forschungsfrage und Ziele der Doktorarbeit.....	26
2. Material und Methode.....	28
2.1. Materialien.....	28
2.2. Methoden.....	34
2.2.1. Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.2. Induktion des Zelltodes.....	34
2.2.3. Quantifizierung des Zelltodes.....	36
2.2.4. Durchflusszytometrische Analysen.....	36
2.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	39
2.2.6. Western-Blot-Analysen.....	41
2.2.7. Proteome Profiler™ Antibody Array.....	44
2.2.8. Molekularbiologische Methoden.....	45
2.2.9. Signifikanzen.....	50

3.	Ergebnisse	51
3.1.	Neuartige Zelltod-Aktivatoren induzieren tumorspezifischen in Nierenkarzinomzellen den Zelltod.....	51
3.2.	Erstellung von Struktur-Wirksamkeits-Beziehungen aufgrund der Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren und ihrer abgeleiteten Derivate.....	53
3.3.	Die Zelltod-Aktivatoren LBPS01 und LBPS03 sowie ihre Strukturderivate liefern erste Hinweise auf einen Apoptose-ähnlichen Zelltodsignalweg.....	56
3.4.	LBPS03 aktiviert sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen.....	57
3.5.	Der Zelltod-Aktivator LBPS03 reprimiert möglicherweise die Expression einiger antiapoptotischer Proteine in ClearCa-2.....	60
3.6.	Zunehmende Inkubationsdauer steigert die antiproliferativen Effekte der Zelltod-Aktivatoren in ClearCa-2-Zellen.....	62
3.7.	Die kombinatorische Anwendung der Zelltod-Aktivatoren mit TNF α oder TRAIL führen zu keinen verstärkten Wirkeffekten.....	63
3.8.	LBPS03 wirkt als Apoptose-Induktor.....	66
3.8.1.	Identifikation von XIAP als Zielmolekül des Zelltod-Aktivators LBPS03, das durch eine mögliche Interaktion die Aktivierung der Caspasen fördert.....	66
3.8.2.	Aktivierung von p53 durch den Zelltod-Aktivator LBPS03 in ClearCa-2-Zellen.....	69
3.8.3.	LBPS03 induziert mitochondriale Apoptose.....	75
3.8.4.	Durch LBPS03 werden Phosphatidylserine an die äußere Membran transloziert.....	77
3.8.5.	Hinweis auf die Unterdrückung einer LBPS03-induzierten PARP-Spaltung durch die Verwendung des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK.....	78
3.8.6.	LBPS03 bewirkt eine Stabilisierung der Kinase RIP1 und aktiviert den NF- κ B-Signalweg.....	80
3.9.	LBPS05 induziert einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod.....	84
3.9.1.	LBPS05 stabilisiert in ClearCa-2 die zellulären IAPs.....	85
3.9.2.	LBPS05 führt zu einer Induktion von Genen, die im Zusammenhang mit einer Zytokine-Zytokine-Interaktion stehen.....	86
3.9.3.	Der Zelltod-Aktivator LBPS05 fördert die Stabilisierung von RIP1 und reguliert PIDD.....	88
3.9.4.	Der MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide verstärkt den LBPS05-induzierten Zelltod in ClearCa-2-Zellen.....	90
3.9.5.	Die Kombinationsbehandlung aus Necrosulfonamide und LBPS05 verstärkt die Aktivierung der Initiatorcaspase-8.....	92
3.9.6.	Necrosulfonamide bewirkt in ClearCa-2-Zellen eine RIP1-Degradation, die durch LBPS03 verstärkt werden kann.....	94
3.9.7.	Necrostatin-1 hebt die LBPS05-verstärkte Expression von RIP1 auf.....	95
4.	Diskussion	98
4.1.	Die Struktur-Wirkungs-Beziehung der neuartigen Zelltod-Aktivatoren ist tumorunspezifisch.....	99
4.2.	Pharmakologische Wirkweise der Zelltod-Aktivatoren.....	102

4.3.	Weder TRAIL noch TNF α steigern das antiproliferative Potential der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 im Nierenzellkarzinom.....	102
4.4.	Der Zelltod-Aktivator LBPS03 ist ein effektiver Apoptose-Induktor.....	104
4.4.1.	Die Relevanz von XIAP als Zielmolekül des Zelltod-Aktivators LBPS03	104
4.4.2.	LBPS03 aktiviert den intrinsischen Apoptosesignalweg durch die Inhibierung des antiapoptotischen Proteins XIAP	106
4.4.3.	Die Externalisierung von Phosphatidylserinen in LBPS03-behandelten Zellen weist auf ein apoptotisches Zellschicksal hin	108
4.4.4.	Die Initiierung des p53-Signalwegs durch LBPS03 bewirkt eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials.....	108
4.4.5.	Die Induktion von p53-abhängigen proapoptotischen Genen korreliert mit einer Membranpotentialänderung in LBPS03-stimulierten Zellen.....	109
4.4.6.	In Abhängigkeit von p53 aktiviert LBPS03 die Caspase-2.....	112
4.4.7.	P53-induzierbare Gene unterdrücken den p21-abhängigen Zellzyklusarrest in LBPS03-behandelten Zellen	113
4.4.8.	Das Protein p53 induziert in einem negativen Feedback antiapoptotische Gene.....	113
4.4.9.	Die Rolle der c-IAPs in der LBPS03-abhängigen Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs.....	114
4.4.10.	LBPS03 fördert die Ubiquitinierung von A20, einem Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs.....	118
4.4.11.	Die Stabilisierung von RIP1 durch LBPS03 begünstigt möglicherweise die Ripoptosombindung und die Initiierung der Caspase-8.....	119
4.4.12.	Durch die Hemmung der Caspasen wird in LBPS03-stimulierten Zellen ein Caspase-unabhängiger Zelltod induziert	121
4.5.	Necrosulfonamide induziert in ClearCa-2 die Apoptose und wirkt zusammen mit LBPS03 in einer additiven Weise	124
4.6.	Der Zelltod-Aktivator LBPS05 induziert einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod	124
4.6.1.	LBPS05 induziert zusammen mit Necrosulfonamide die Apoptose in einer verstärkenden Weise	126
4.6.2.	Die Rolle von RIP1 im PIDDosomen-Komplex.....	127
4.7.	Fazit.....	130
5.	Literaturverzeichnis.....	132
6.	Danksagung.....	143
7.	Eidesstattliche Erklärung.....	144

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Signaltransduktionswege der Apoptose.....	10
Abbildung 2: TNF-Rezeptor-vermittelte Nekroptose.....	14
Abbildung 3: Die acht humanen IAPs und ihre funktionellen Domänen.....	19
Abbildung 4: Homologe Strukturen des IAP-Bindemotivs.....	21
Abbildung 5: PS-1-Struktur und chemische Strukturen der Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05.....	23
Abbildung 6: Rolle von XIAP in der Vermittlung einer TRAIL-induzierten Apoptose in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen.....	25
Abbildung 7: Arbeitsablauf zur Identifikation der Signalwege, die durch LBPS03 und LBPS05 aktiviert werden.....	35
Abbildung 8: Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren auf die Zellproliferation in ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen und Western-Blot-Analysen zur XIAP- Basalexpression in den beiden Zelllinien.....	52
Abbildung 9: Struktur-Wirkungs-Beziehung der drei Ausgangssubstanzen und ihrer strukturellen Derivate.....	54
Abbildung 10: Bestimmung der Apoptoserate der Zelltod-Aktivatoren wurde nach Nicoletti durchgeführt.....	57
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspaseaktivierung in LBPS03- und LBPS05-behandelten ClearCa-2-Zellen.....	58
Abbildung 12: Western-Blot-Analysen zur Spaltung von Caspasen und Caspase- spezifischen Substraten durch LBPS03.....	59
Abbildung 13: Dot-Plot-Analysen geben erste Hinweise auf den Einfluss der Zelltod- Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 auf die Proteinlevel Apoptose- relevanter Proteine in ClearCa-2-Zellen.....	61
Abbildung 14: Wirkung der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 auf das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von ClearCa-2-Zellen.....	62
Abbildung 15: ClearCa-2-Zellen weisen eine Resistenz gegenüber TNF α auf, trotz vorhandener TNF-Rezeptoren.....	64
Abbildung 16: Proliferationsanalysen zur Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit TNF α oder TRAIL geben erste Hinweise darauf, dass die Wirkeffekte nicht verstärkt werden können.....	65
Abbildung 17: Western-Blot-Analyse zur Regulation der IAPs durch den Einfluss von LBPS03..	67
Abbildung 18: Nachweis der Caspaseinhibierung in LBPS03-stimulierten Zellen durch den Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK.....	68
Abbildung 19: "Gene Ontology (GO)"-Kriterien der biologischen Prozesse durch den Einfluss von LBPS03.....	69
Abbildung 20: KEGG-Signalweg-Analyse.....	71
Abbildung 21: Relatives mRNA-Expressionsprofil in LBPS03-behandelten ClearCa-2-Zellen....	72
Abbildung 22: Western-Blot-Analysen zur Expression von p53 und p21 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 in ClearCa-2-Zellen.....	74

Abbildung 23: Western-Blot-Analysen zum Einfluss von LBPS03 auf die PIDD-Expression in ClearCa-2-Zellen.....	74
Abbildung 24: Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf das mitochondriale Membranpotential und das proapoptotische Protein Bid.....	76
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zum Nachweis von translozierten Phosphatidylserinen.....	77
Abbildung 26: Wirkung von LBPS03 in Kombination mit Z-VAD-FMK auf das Zellüberleben und die Proteinlevel von PARP und p53.....	79
Abbildung 27: Einfluss von LBPS03 auf die Proteinexpression von RIP1 in ClearCa-2-Zellen....	81
Abbildung 28: Western-Blot-Analysen zum Einfluss von LBPS03 auf die Proteinexpression von I κ B α , NF- κ B und seiner phosphorylierten Form Phospho-NF- κ B.....	82
Abbildung 29: Dot-Blot-Analysen zum Ubiquitinierungsstatus ausgewählter Apoptose-relevanter Proteine unter LBPS03-Einfluss.....	83
Abbildung 30: Western-Blot-Analyse zur Regulation der IAPs unter Einfluss des Zelltod- Aktivators LBPS05.....	85
Abbildung 31: "GeneOntology (GO)"-Kriterien von biologischen Prozessen, die in LBPS05-behandelten Zellen reguliert werden.....	87
Abbildung 32: Einfluss von LBPS05 auf die mRNA-Expressionslevel von IL8 und CCL20.....	88
Abbildung 33: Western-Blot-Analysen zur konzentrationsabhängigen Wirkung des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf die Proteine RIP1 und PIDD.....	89
Abbildung 34: Proliferationsanalysen zum Einfluss der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit den Nekroptoseinhibitoren Necrosulfunamide (NSA) oder Necrostatin-1 (Nec-1). 91	
Abbildung 35: Einfluss der Nekroptoseinhibitoren Necrosulfunamide und Necrostatin-1 in Kombination mit den Zelltod-Aktivatoren auf die Fähigkeit, Caspase-8 zu aktivieren und PARP zu spalten.....	93
Abbildung 36: Nachweis der RIP1-Expression mittels Western-Blot-Analysen unter Einfluss des MLKL-Inhibitors NSA und in Kombination mit LBPS03 oder LBPS05.....	95
Abbildung 37: Western-Blot-Analysen zur Wirkung von Necrostatin-1 in Kombination mit LBPS03 oder LBPS05 auf die Proteinexpression von RIP1, MLKL und PARP.....	96
Abbildung 38: Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf ausgewählte Apoptosesignalwege..	111
Abbildung 39: Modell möglicher Signalwege, über die LBPS05 den Zelltod einleitet.....	129

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Zelltodformen und ihre biologische Bedeutung.....	6-7
Tabelle 2: Erkrankungen, die mit einer verstärkten beziehungsweise verminderten Apoptosefähigkeit assoziiert sind.....	8
Tabelle 3: Primersequenzen der verwendeten Primer für Real-Time-PCR-Analysen.....	31
Tabelle 4: Zelltod-Aktivatoren und ihre molekulare Masse.....	32
Tabelle 5: Strukturelle Derivate der Ausgangssubstanzen.....	32
Tabelle 6: Verwendete molekulare Inhibitoren.....	33
Tabelle 7: IC ₅₀ -Werte der Zelltod-Aktivatoren im Vergleich zu kommerziell erwerblichen Smac-Mimetika.....	55
Tabelle 8: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der LBPS03-induzierten Gene durch die beiden verwendeten Methoden der Affymetrix-Whole-Transcript-Expression-Profiling-Analyse sowie der Real-Time-PCR-Untersuchungen.....	73

Abkürzungsverzeichnis

	%	Prozent			
	°	Grad			
	μ	Mikro			
A	A	Amper		D	CrmA
	A20	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>			<i>Cytokine response modifier A</i>
	Abb.	Abbildung			C _t
	abs	Absorption			<i>Cycle threshold</i>
	AIF	Apoptose-induzierenden Faktoren			CYLD
	Apaf-1	<i>Apoptotic protease activity factor-1</i>			<i>Cylindromatosis</i>
	APO	siehe TRAIL			Da
	ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>			Dalton
	atg	Tripletcode für Aminosäure Methionin			DAPI
	ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>			4',6-Diamidin-2-phenylindol
	ATP	Adenosintriphosphat			dATP
	AVPFY	Alanin-Valin-Prolin-Phenylalanin-Tyrosin			Desoxydenosintriphosphat
	AVPI	Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin			<i>Damage specific DNA binding protein 2</i>
	AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft			DDB2
					<i>Damage specific DNA binding protein 2</i>
B	Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>			DED
	Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>			Todeseffektordomäne
	Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma-2</i>			DEPC
					Diethylcarbonat
	Bcl-2A1	<i>BCL2 related protein A1</i>			DEVD
					Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
	Bcl-w	<i>Bcl-2 like protein 2</i>			<i>Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pl</i>
	Bcl-xL	Bcl-2-ähnlichen Genprodukts X			DIABLO
	BH3	Bcl-2-Homolog-3			<i>Death inducing signalling complex</i>
	Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>			DISC
	Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>			<i>Death inducing signalling complex</i>
	BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>			DKFZ
	BIRC5	<i>Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i>			Deutsches Krebsforschungszentrum
					DKG
	BRUCE	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>			Deutsche Krebsgesellschaft
C	C	Celsius			DMEM
	Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>			Dulbecco's Modified Eagle Medium
	CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>			DMSO
	CD95 (Fas)	<i>Cluster of differentiation 95</i>			Dimethylsulfoxid
	cdc	<i>Cell-division cycle protein</i>			DNA
	cDNA	<i>Complementary DNA</i>			Desoxyribonukleinsäure
	Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>			DNA
					Desoxyribonukleinsäure
	CHOP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein</i>			dNTP
	c-IAP1	<i>cellular-IAP1</i>			Desoxynukleosidtriphosphate
	c-IAP2	<i>cellular-IAP2</i>			DR
					<i>Death Receptor</i> (siehe TRAIL)
	CO ₂	Kohlenstoffdioxid			DR5/
					TNFRSF10B/
					TRAIL
					Death receptor 5/ tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B
					dsDNA
					Doppelsträngige DNA
					DTT
					Dithiothreitol
					EDTA
					Ethylendiamintetraessigsäure
					em
					Emission
					ER
					Endoplasmatisches Reticulum
					EthD-III
					Ethidium Homodimer III
					FADD
					<i>Fas-associated protein with death domain</i>
					Fas/ CD95
					<i>Cluster of differentiation 95</i>
					FCS
					Fetales Kälberserum
					FITC
					Fluorescein
					FLIP
					<i>Flice inhibitory protein</i>
					g
					Gramm
					G1-Phase
					Gap-1-Phase
					Gadd45
					<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
					GAPDH
					<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
					GO-Term
					<i>Gene Oncology</i>
					GPX4
					Glutathion Peroxidase 4
					<i>NADH dehydrogenase</i>
					Grim
					<i>[ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit</i>
					GTPase
					Guanosintriphosphat-Enzym

H	h	Stunde		Na	Natrium
	H ₂ O	Wasser		NaCl	Natriumchlorid
	HCl	Chlorwasserstoff		NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
	Hid	<i>Head involution defective</i>		N-AIP	Neuronale IAP
	HIF α	Hypoxie-induzierter Faktor α		Nec-1	Necrostatin-1
	Hrsg	Herausgeber		NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
	HtrA2	<i>High temperature requirement A</i>		NEMO	siehe IKK γ
I	IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>	NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	
	IC ₅₀	Halb maximale inhibitorische Konzentration	NIK	<i>NF-kappa-B-inducing kinase</i>	
	IKK	<i>IκB kinase-Komplex</i>	Nod	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>	
	IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit	NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	
	IKK γ /NEMO	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma	NSA	Necrosulfonamide	
	IL-2	Interleukin-2	O OD	Optische Dichte	
	IL8/ CXCL8	Interleukin-8/ <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>	P p21/CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>	
	IFN α	Interferon- α	p53	Tumorprotein 53	
	I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	p62	Nucleoporin p62	
	I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>	
J	JNK	c-Jun N-terminale Kinasen	PBS	Phosphate Buffered Saline	
	K	k	Kilo	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
K		Lysin	PI	Propidiumiodid	
L	KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	PIDD	<i>Leucine-rich repeats and death domain containing</i>	
	L	l	Liter	PIDD-FL	PIDD-Fulllength
		LBPS	<i>Ligand-based pan-selective</i>	PMBC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
	LC3	<i>Autophagy-related protein 8</i>	Pon2	Paraoxonase 2	
	Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	PS-1	<i>Pan-selective IAP antagonist</i>	
	LMP	Lysosomaler Membran-Permeabilisierung	PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	
	LUBAC	<i>Linear ubiquitin chain assembly complex</i>	PVRL4	<i>Poliovirus receptor-related 4</i>	
M	m	Milli	p-Wert	<i>(probability)Signifikanzwert</i>	
	M	Molare Masse	R RAIDD	<i>Death domain-containing protein CRADD</i>	
	M	Mitose	RelA	<i>Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit</i>	
	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	RelB	Transkriptionsfaktor RelB	
	MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>	RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>	
	MDM2	<i>Murine double minute-2</i>	Rho	<i>Rat sarcoma homologue</i>	
	MDM4	<i>Mouse double minute 4</i>	RING	<i>Really Interesting New Gene Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>	
	MDR	Multi-Drug-Resistenz	RIP		
	MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>	RNA	Ribonukleinsäure	
	MOMP	Mitochondriellen äußeren Membranpermeabilität	ROS	reaktiven Sauerstoffspezies	
	MP	Milchpulver	RRC	renal cell carcinoma	
	mRNA	<i>Messenger-RNA</i>	RRMB2	<i>Ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B</i>	
	m-TOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>	rRNA	Ribosomale RNA	
N	n	nano	S S	Schwefel	
	n.d.	not done	SDS	Natriumdodecylsulfat	
	n.s.	Nicht signifikant			

	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
	siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
	Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
T	TAB	TAK1-bindende Proteine
	Tab.	Tabelle
	TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
	TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>
	tBid	<i>t-(truncated) Bid</i>
	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
	TBS/T	<i>Tris-buffered saline-Tween 20</i>
	TEMED	Tetramethylethyldiamin
	TNFAIF3	<i>Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3</i>
	TNFAIP3/A20	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
	TNFR1	TNF-Rezeptor-1
	TNM	Tumorgröße-Lymphknoten-Fernmetastasen
	TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
	TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	Ts-IAP	Testis-spezifisches IAP
U	UBA	Ubiquitin-bindende Domäne
	USP11	Ubiquitin-spezifische Protease 11
	UV	Ultraviolettstrahlung
V	v	Volumen
	V	Volt
	VEGF	Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor
	vgl.	Vergleiche
	VHL	Von-Hippel-Lindau
	vIRAL	<i>Viral inhibitor of caspase 8 activation</i>
W	w	<i>weight</i>
X	XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
Z	Z-VAD-FMK	<i>Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>
	α	Alpha
	β	Beta
	γ	Gamma
	λ	Wellenlänge Lambda

Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste solide Tumor der Niere. Das Auftreten eines Multi-Drug-resistenten Phänotyps stellt ein massives Problem für die Behandlung von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen im fortgeschrittenen Tumorstadium dar. Der Bedarf an Entwicklung von wirksamen Medikamenten, die spezifisch und effektiv diese therapieresistenten Nierenzellkarzinome bekämpfen, ist daher besonders groß. Hierbei stellt die Dysregulation der Apoptose in Tumorzellen einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt dar, der unter anderem auf der Zunahme von antiapoptotischen Proteinen basiert, welche die unkontrollierte Zellproliferation, die de novo Angiogenese und auch die Metastasierung von Tumorzellen ermöglichen. Das antiapoptotische Protein XIAP ist der stärkste Caspase-inhibitor der IAP-Familie und konnte in klarzelligen Nierenzellkarzinomen bereits als prognostischer Marker und molekularer Schalter für das Ansprechen auf die Apoptose identifiziert werden. Die Entwicklung neuartiger Substanzen, die das AVPI-Motiv des natürlichen IAP-Antagonisten Smac imitieren, führte zur Identifikation der drei vielversprechenden Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05, die das Potential besitzen XIAP zu inhibieren und tumorspezifisch den Zelltod zu induzieren. Die Verwendung von strukturellen Derivaten ermöglichte Rückschlüsse auf eine Struktur-Wirkungs-Beziehung.

Für LBPS01 und LBPS03 wurde die Apoptose als Hauptsignalweg für den Zelltod identifiziert. Infolge einer LBPS03-abhängigen, zielgerichteten Degradierung von XIAP, konnte XIAP als Zielmolekül identifiziert werden, in dessen Folge Caspasen reaktiviert und der intrinsische Apoptosesignalweg eingeleitet wurde. Die LBPS03-induzierte Initiierung des p53-Signalwegs förderte zudem die Transkription von proapoptotischen Faktoren, die ihrerseits antiapoptotische Bcl-Mitglieder inhibieren und die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials begünstigen. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 war imstande, durch die Degradierung von I κ B α und der Phosphorylierung von NF- κ B, den kanonischen NF- κ B-Signalweg zu induzieren. Sowohl die Aktivierung des p53- wie auch des kanonischen NF- κ B-Signalwegs könnten dazu beitragen, dass LBPS03 auf der transkriptionellen Ebene proapoptotische Faktoren wie CD95 verstärkt exprimiert, um den extrinsischen Signalweg zu induzieren. Neben einer Todesliganden-vermittelten Apoptose könnte der Ripoptosom-Komplex in LBPS03-stimulierten Zellen die Aktivierung der Caspase-8 fördern. Die Stabilisierung von RIP1 und PIDD begünstigten möglicherweise zudem die Formierung

eines PIDDosom-Komplexes, der zu einer Caspase-2-Initiierung führte. Eine LBPS03-vermittelte Reduktion der Pon2- und Katalase-Proteinlevel wies auf die Aktivierung der Apoptose über den JNK-Signalweg hin.

Ferner konnte gezeigt werden, dass LBPS05 einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod förderte, der Caspase-unabhängig verlief. Die Akkumulation von RIP1 in LBPS05-behandelten Zellen wies auf eine Necrosom-Formierung hin, die durch die Verwendung eines MLKL-Inhibitors in Nierenkarzinomzellen die Apoptose einleitete. Die Transkription von IL8 und CCL20 in LBPS05-behandelten Zellen verwies auf einen Zytokine-vermittelten Zelltod, der in einer NF- κ B- und JNK-abhängigen Weise einen Caspase-unabhängigen Zelltod einleiten könnte.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, dass erstmals zwei neue Substanzen – LBPS03 und LBPS05 – aufgrund ihrer molekularbiologischen Charakterisierung und ihrer vollständig divergenten Wirkweise, als potenzielle Kandidaten für zukünftige klinische Studien in Frage kommen können, weil sie zielgerichtet in die Zelltodsignalwege von Tumorzellen eingreifen und tumorspezifisch den Zelltod induzieren.

Summary

Renal cell carcinoma is the most common solid tumor of the kidney. The occurrence of a multi-drug resistant phenotype represents a massive problem in the treatment options for patients with clear cell renal carcinoma in advanced tumor stages. The dysregulation of apoptosis is a common phenomenon in tumor cells and can partly be attributed to the upregulation of anti-apoptotic proteins leading to cell proliferation, cell growth, angiogenesis and metastasis. In renal cell carcinoma the anti-apoptotic protein XIAP could be identified as a prognostic and independent marker and represents the strongest caspase and apoptosis inhibitor of its family. The development of new substances that imitate the AVPI motif of the natural IAP antagonist Smac led to the identification of three interesting cell death activators LBPS01, LBPS03, LBPS05 with minimal to no toxic effects on normal renal epithelial cells. In a second screening we identified structural derivatives of the three initial structures, which led to conclusions about their structure-activity relationship.

The substances LBPS01 and LBPS03 induced apoptosis, in which LBPS03 represented the more effective substance. During a LBPS03-mediated degradation of XIAP, XIAP could be identified as a molecular target. By downregulation of XIAP, LBPS03 induced the initiation of caspases and the intrinsic apoptotic signaling pathway. The LBPS03-mediated activation of the p53-signaling pathways led to a transcription of proapoptotic factors, which themselves inhibited antiapoptotic proteins of the Bcl-family and promoted a change in the mitochondrial membrane potential. The new cell death inducer LBPS03 was able to degrade I κ B α , phosphorylate NF- κ B and in further consequence induced the NF- κ B-signaling pathway. The p53- as well as the NF- κ B-signaling pathway may initiate the transcription of proapoptotic genes such as CD95 in LBPS03-stimulated cells, which activated the extrinsic apoptosis pathway. In addition to a death-ligand-mediated apoptosis, the ripoptosom-complex could promote the activation of caspase-8 in LBPS03-treated cells. The stabilization of RIP1 and PIDD during LBPS03-treatment favor the formation of the PIDDosom, in which caspase-2 became active. A LBPS03-promoted reduction of the Pon2- and Catalase-protein level indicated a JNK-dependent apoptosis.

Further, we could show that LBPS05 promotes a cell death similar to necroptosis in a caspase-independent manner. The accumulation of RIP1 suggested that LBPS05 induced a necrosom. By treating LBPS05-stimulated cells with an inhibitor of MLKL ClearCa-2 cells an apoptotic cell fate was mediated. The transcription of IL8 and CCL20 in LBPS05-

stimulated cells indicated a cytokine-dependent cell death by which cells might undergo a caspases-independent cell death in a NF- κ B- and JNK-dependent fashion.

In this work we could describe for the first time two new substances – LBPS03 and LBPS05 – and their molecular-biological characterization. Both cell death activators, despite their completely divergent mode of action, represent new interesting candidates for future clinical trials by successfully interrupting the tumor program and by inducing cell death in a regulated fashion.

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie bösartiger Erkrankungen der Niere

Erwerben Zellen in einem Gewebeverband die Fähigkeit eines unkontrollierten Teilungspotentials, entsteht ein Tumor. Häufig sind Veränderungen des Erbguts für das Fehlverhalten der Zellen verantwortlich. Auslöser, die verstärkt zu einer Krebsentstehung beitragen, sind unter anderem Karzinogene und UV-Strahlung. Tumorerkrankungen treten in einer benignen (gutartigen) oder malignen (bösartigen) Form auf und beeinflussen stark den Verlauf der Krankheit. Im Jahre 2014 stellten bösartige Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Kreislaufsystems dar (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2015). Die jährliche Inzidenz maligner Erkrankungen der Niere liegt in Deutschland bei 3% (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015). Bösartige Veränderungen der Niere stellen zwar nur einen geringen Anteil der Krebserkrankungen in Deutschland dar, zeichnen sich jedoch bei 80% der betroffenen Patienten durch die Expression eines Multi-Drug-resistenten (MDR-) Phänotyps aus (STAEHLER & POMER, 1997). Durch die Expression dieser MDR-Gene erwerben Tumorzellen eine sehr seltene und besonders hartnäckige Resistenz, die Zellen eine Art Schutzmechanismus gegenüber herkömmlicher Chemotherapeutika verleiht. Durch neue zielgerichtete Therapieansätze könnte die Behandlung von Patienten mit Nierenkarzinomen verbessert und die Überlebensrate gesteigert werden. Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste solide Tumor der Niere, macht etwa 90% aller malignen Erkrankungen der Nieren aus (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015) und ist besonders weit in westlichen Ländern verbreitet (LJUNGBERG et al., 2015). Bei Männern tritt das Nierenzellkarzinom um den Faktor 1,5-mal häufiger auf als bei Frauen. Die Prävalenz bei Männern hat sich in den Jahren zwischen 1990 und 2004 verdoppelt und auch bei den Frauen konnte ein Anstieg um 50% beobachtet werden. Die Mortalitätsrate blieb zwischen 2011 und 2012 weitgehend stabil. Etwa 2,4% starben an den Folgen eines Nierentumors. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen bei 78% und bei Männern bei 76% (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015).

Das Nierenzellkarzinom wird nach histopathologischen sowie genetischen Gesichtspunkten in drei Subtypen unterteilt: das klarzellige, das papilläre sowie das chromophobe Nierenzellkarzinom (THOENES et al., 1986). Das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom finden ihren Ursprung im proximalen Tubulus, wohingegen das chromophobe Nierenzellkarzinom aus dem distalen Bereich des Nephrons hervorgeht (THOENES et al., 1986). Die Diagnose eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms wird besonders häufig in einem fortgeschrittenen Tumorstadium gestellt und ist meistens gekennzeichnet durch einen höheren

Grad und vermehrtes Auftreten von Metastasen (CHEVILLE et al., 2003; AMIN et al., 2002). Zudem besitzen Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten mit einem papillären oder chromophoben Nierenzellkarzinom (DOGAN et al., 2010; CHEVILLE et al., 2003).

In dem LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, welches im September 2015 von der deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), der deutschen Krebshilfe und der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) veröffentlicht wurde, wird zwischen „modifizierbaren und nicht modifizierbaren Risikofaktoren“ als Ursache von Nierenzellkarzinomen unterschieden. Zu den „modifizierbaren Risikofaktoren“ zählen Rauchen, Übergewicht und ein erhöhter Blutdruck (HUNT et al., 2005; THEIS et al., 2008). Als „nicht modifizierbare Risikofaktoren“ gelten Niereninsuffizienz und vererbte Tumorsymptome (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF, 2015). Zwischen 1% und 4% aller Nierenkarzinome finden ihren Ursprung in Keimbahnmutationen (DECKER, 2007). Ein erhöhtes Risiko, an einem klarzelligem Nierenzellkarzinom zu erkranken, besteht bei Patienten mit von-Hippel-Lindau-Syndrom, tuberöser Sklerose oder durch hereditärer Phäochromozytom und Paragangliom (SHUCH et al., 2015).

1.2. Konventionelle Behandlungsstrategien bei Nierenzellkarzinomen und ihre Grenzen

Die Behandlung des Nierenzellkarzinoms variiert in Abhängigkeit von der Tumorentwicklung, die mit Hilfe der TNM-Klassifikation bestimmt werden kann (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF, 2015). Die TNM-Klassifikation dient der Charakterisierung eines Tumors und trifft Aussagen über die Lokalisation, Größe und seinen Invasivitätsgrad. Neben der Möglichkeit, den Tumor operativ zu entfernen, die in frühen Stadien sehr vielversprechend ist, werden medikamentöse Behandlungstherapien hinzugezogen (TIEMANN, 2014). Die Behandlung mit Strahlen- oder Chemotherapie bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom zeigte dagegen nur mindere Behandlungserfolge und findet daher kaum Anwendung (BECKMANN, 2016). Bei bereits metastasierenden Nierenzellkarzinomen wurde in der Vergangenheit auf systemische Therapien wie die unspezifische Immuntherapie mit Interferon- α (IFN α) oder Interleukin-2 (IL-2) zurückgegriffen. Das Ziel der unspezifischen Immuntherapie ist die Aktivierung des Immunsystems der Patienten und die nachfolgende Eliminierung der Tumorzellen. Neben der konventionellen Chemotherapie bieten die neuartigen „zielgerichtete Krebstherapien“

(engl. *Targeted Therapies*) neue Behandlungsoptionen. Auf molekularer Ebene werden in Tumoren spezielle Strukturen gezielt angegriffen, die verantwortlich für das unkontrollierte Wachstumsverhalten der Zellen sind und verhindern, dass fehlgesteuerte Zellen eliminiert werden können (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM KREBSINFORMATIONSDIENST (DKFZ), 2014; DOGAN et al., 2010). Einige interessante Kandidaten, wie Tyrosinkinase- oder Angiogenese-Hemmer, finden bereits Einsatz in der Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinomen. Diese Substanzen greifen gezielt in die Signaltransduktionswege der Tumorzelle ein und induzieren den kontrollierten Zelltod. Neuartige zielgerichtete Substanzen, die seit einiger Zeit in der klinischen Medizin angewendet werden, sind Sunitinib, Sorafinib und Bevacizumab (SHUCH et al., 2015). Häufig treten jedoch besonders bei älteren Patienten starke Nebeneffekte auf und machen die Anwendung bedenklich. In Phase 3 klinischer Studien von zielgerichteten Therapeutika werden in erster Linie Patienten mit einem klarzelligem Nierenzellkarzinom eingeschlossen. Etwa 90% der Patienten, die eine systematische Therapie benötigen, haben ein klarzelliges Nierenzellkarzinom und scheinen am besten auf systematische Therapien anzusprechen (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF, 2015).

1.3. Gestörte Zellhomöostase in Nierenzellkarzinomzellen

Zellen, die in einem Gewebeverbund auftreten, unterliegen einer strengen Kontrolle aus Zellproliferation, welche die Erneuerung und Wiederherstellung von Struktur gewährleistet, sowie einem kontrollierten Abbau von zerstörten oder nicht mehr notwendigen Zellen. Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes ist für die Gesunderhaltung des Gewebes unerlässlich. Wird die Balance gestört, sodass der kontrollierte Abbau oder die ungehemmte Proliferation der Zellen überwiegen, fördert dies die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Viruslatenz und Krebs (SOLARY et al., 1996).

Als Tumor oder Neoplasie wird eine Akkumulation klonaler Zellen bezeichnet, die mit einem gesteigerten Proliferationspotential assoziiert werden und sich autonom verhalten. Maligne Zellen infiltrieren das umliegende Gewebe und bilden Metastasen. HANAHAN und WEINBERG (2011) führen in „Hallmarks of Cancer – The Next Generation“ ihre Theorien aus dem Jahre 2000 fort und schildern die sechs grundlegenden biologischen Prozesse, die zur Tumorentstehung bei Menschen beitragen können. Ein Tumor besitzt die Fähigkeit des unbegrenzten Teilungspotentials, in dem proliferative Signale erhalten bleiben, die Unterdrückung des Wachstums verhindert wird und der Zelltod nicht induziert werden kann. Tumore besitzen die Fähigkeit, so weit zu expandieren, dass sie umliegendes Gewebe

infiltriert und Metastasen bilden. Durch die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) kann der erhöhte Nährstoffbedarf in Tumorzellen gedeckt werden (HANAHAH & WEINBERG, 2011). HOLLAND und Kollegen (2003) beschreiben vier wichtige zelluläre Mechanismen, die in Tumorzellen grundlegend abweichen. Im Vergleich zu normalen Zellen besitzen Tumorzellen neben einem unbegrenzten Teilungspotential, ein verändertes Differenzierungsprogramm sowie eine Destabilisierung der genetischen und chromosomalen Integrität und eine verminderte Fähigkeit zur Apoptose.

In weniger als 4% der klarzelligen Nierenzellkarzinome basiert der Tumor auf einer hereditären Mutation (CHOYKE et al., 2003). In etwa 96% der Fälle tritt das klarzellige Nierenzellkarzinom wahrscheinlich sporadisch auf. Die häufigste genetische Veränderung in klarzelligen Nierenzellkarzinomen ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens von-Hippel-Lindau (VHL) (PAVLOVICH & SCHMIDT, 2004; LATIF et al., 1993; CAIRNS, 2010). Diese ist einzigartig unter den Subtypen des Nierenzellkarzinoms. Tumorsuppressoren sind Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose und maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in gesundem Gewebe beteiligt. Durch Veränderungen in definierten DNA-Abschnitten eines Tumorsuppressorgens bilden sich mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Tumore. Diese genetischen Veränderungen bewirken häufig eine Überexpression der Hypoxie-induzierten Faktor- α (*HIF α*)-Genen (TALKS et al., 2000). Das Protein HIF α wird durch die *VHL*-Gene kodiert und spielt eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor in der Sauerstoff-vermittelten Expression von Genen bei einer Hypoxie-Antwort sowie der Angiogenese und der Signaltransduktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-(VEGF)-Systems. Das Protein *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR), welches normalerweise an der Zellzyklusregulation beteiligt ist, kann durch eine genetische Aberration in Nierenkarzinomen hyperaktiviert sein und die Tumorprogression fördern (zusammengefasst in XU et al., 2014). Der Einsatz von neuartigen VEGF-Inhibitoren oder mTOR-Hemmern konnte das Überleben von Patienten mit metastasierenden Nierenzellkarzinomen deutlich verbessern (CAIRNS, 2010).

Neben den genetischen Aberrationen in den Genen *VEGF* und *mTOR*, die zu einer veränderten Signaltransduktion der Tumorzelle führen, rückte in den vergangenen Jahren vermehrt die Rolle des *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) als Resistenz-vermittelndes Protein in den Fokus (MIZUTANI et al., 2007). Bereits RAMP und Kollegen (2004) verwiesen auf die Rollen von XIAP als geeignetem prognostischen Marker in klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Auch MIZUTANI und Kollegen (2007) konnten eine Korrelation zwischen dem Tumorstaging und dem Expressionslevel von XIAP zeigen.

Die Expressionslevel von XIAP in dem Gewebe von Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom mit einem geringen Tumorstadium unterschieden sich nur geringfügig im Vergleich zu normalem Nierengewebe. Um den Faktor 2,5 erhöhte XIAP-Expressionslevel konnten dagegen bei Patienten mit einem Staging von III oder IV beobachtet werden. Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Expressionslevel von XIAP und einer verstärkten Resistenz gegenüber Apoptose nachgewiesen werden (MIZUTANI et al., 2007). Durch die Behandlung von Nierenzellkarzinomzellen mit XIAP-anti-sense-Oligonukleotiden konnte eine Sensitivität gegenüber *Cluster of Differentiation 96*(CD95)- und *TNF-related apoptosis inducing ligand*(TRAIL)-vermittelter Apoptose erzielt werden (MIZUTANI et al., 2007).

1.4. Zelltodsignalwege einer Zelle zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase

Die traditionelle Klassifizierung der zwei bekanntesten Zelltodsignalwege, der Apoptose und der Nekrose, erfolgte bislang anhand morphologischer Kriterien. Modernere Klassifikationen orientieren sich an biochemischen Veränderungen der Zelle.

Die nachfolgenden Darstellungen beruhen auf der Arbeit von BLATT UND GLICK (2001), die in ihrer Arbeit die wesentlichen Unterschiede der beiden Zelltodwege zusammenfassen. Die Apoptose wird als ein sehr komplexer biochemischer Prozess beschrieben, in dem viele morphologische Veränderungen zu beobachten sind. Infolge eines Apoptose-Stimulus beginnt das Chromatin zu kondensieren bis hin zur vollständigen Fragmentierung. Das Zytoplasma zieht sich zusammen und es bilden sich sogenannte apoptotische Körperchen. Diese apoptotischen Körperchen sind gefüllt mit kleinen Zellfragmenten und Zytoplasma und werden umschlossen von einer Plasmamembran. Durch die Externalisierung von Phosphatidylserin können die apoptotischen Zellen von Phagozyten erkannt und beseitigt werden. Durch den streng regulierten Ablauf wird bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Die Nekrose dagegen wird in den meisten Fällen durch eine Schädigung, wie zum Beispiel durch mechanische Traumata, Kontakt mit Toxinen oder durch Infektionen mit Krankheitserregern, ausgelöst. Die Zellen schwellen unkontrolliert an und brechen anschließend vollständig in sich zusammen. Dabei zerbricht die Plasmamembran, der zytoplasmatische Inhalt wird unkontrolliert freigesetzt, sodass im umliegenden Gewebe eine Entzündungsreaktion hervorgerufen werden kann (BLATT & GLICK, 2001).

Bei vereinzelt Zellen, die dem Zelltod unterliegen, kann keine bestimmte Zelltodart zugeordnet werden, da sie verschiedene charakteristische Veränderungen besitzen, die in mehr als einer Art der Zelltodformen auftreten. Die eindeutige Klassifizierung ist daher in

manchen Fällen schwierig (BLATT & GLICK, 2001). Im Jahr 2005 wurde eine weitere Form des programmierten Zelltods durch DEGRETEREV und Kollegen entdeckt: heute bekannt als die Nekroptose (VANDEN et al., 2014). VANDEN und Kollegen (2014) beschreiben die Nekroptose als eine programmierte Form der Nekrose, die ähnlich wie die Apoptose kontrolliert ist, jedoch vollständig Caspase-unabhängig verläuft.

Tabelle 1: Zelltodformen und ihre biologische Bedeutung. Charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen der verschiedenen Zelltodformen und ihre biologische Bedeutung (verändert nach PASPARAKIS & VANDENABEELE, 2015; KROEMER et al., 2009; BROWN & ATTARDI, 2005; INOUE & TANI, 2014).

Zelltodform	Morphologische und biochemische Charakteristika	Bedeutung	
Programmierter Zelltod	Apoptose	Zellschrumpfen Kondensation des Chromatin DNA-Fragmentierung Apoptotische Körperchen Aktivierung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie Aktivierung der Caspasen Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials Plasmamembranruptur Externalisierung von Phosphatidylserinen ROS-Übergenerierung Nicht entzündlich	Kontrolle der Zellzahl während der Embryogenese und Zellhomöostase; Immunregulation, Pathogenabwehr
	Autophagie	Große intrazelluläre Vesikel Caspase- und p53-unabhängig Große intrazelluläre Vesikel Membranverschlingung Katabolische Degradierung des Zytoplasmas Beclin-1 Dissoziation von Bcl-2/XL Abhängigkeit von atg-Genprodukten LC3-I zu LC3-II-Umwandlung p62Lck-Degradation Nicht entzündlich	Überlebensprozess als Antwort auf eine metabolische Krise oder um geschädigte Organellen oder Proteinaggregate zu entfernen
	Mitochondriale Katastrophe	Tritt nach oder während der Mitose in Erscheinung bei Fehlverteilung der Chromosomen oder Zellteilung Giant-Zellformationen/multinukleolide Zellen Micronukleoli Kann zur Apoptose oder Nekrose führen p53-unabhängig	Eliminierung von Zellen mit ungleichmäßig verteilten Chromosomen
	Seneszenz	Metabolisch aktiv Keine Zellteilung oder Zellwachstum Zellen exprimieren Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (p53-abhängiger Prozess)	Bestandteil des Alterungsprozesses, kann zu degenerativen Prozessen führen
	Anoikis	Induzierte Apoptose durch den Verlust oder die Bindung an ein Substrat oder andere Zellen Zellmechanismen vergleichbar zur Apoptose	Eliminierung von fehlgeleiteten Zellen
	Paraptose	Expression des Insulin-like Growth Factor Rezeptor 1 Extensive zytoplasmatische Vakuolisierung Mitochondriales Anschwellen Keine weiteren vergleichbaren morphologischen Änderungen der Apoptose	Entwicklung des Nervensystems und bei der Nervendegeneration
	Entose	„Zellulärer Kannibalismus“ Verschlingen der lebenden Nachbarzelle Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix Rho-GTPase und Actinmyosin-abhängig	Wichtiger Entwicklungsprozess als interdigitaler Zelltod und bei der Aushöhlung der Milchgänge in der Pubertät

Programmierte Nekrose	Häufige morphologische Veränderungen während der programmierten Nekrose: Anstieg im transparenten Zytoplasma; Anschwellen der Organellen; lysosomale Membranpermeabilisierung; Anstieg im Zellvolumen (Oncosis); Permeabilisierung der Plasmamembran; geringe Chromatinkondensation; Nukleus bleibt intakt		
	Nekroptose	Aktivierung von RIP3 durch das Necrosom Entzündlich	Embryogenese? Homöostase? Entzündung, Thrombose, Neurodegenerativ IR-Verletzung
	Ferroptose	Verlust der GPX4-Aktivität (Lipid-Repair-Enzyme Glutathion-Peroxidase 4) Akkumulation von Lipid-basierten ROS Lipid-Hydroperoxisomen Eisen-abhängiger Zelltod	Glutathiontoxizität, IR-Verletzungen, Neurodegenerativ Transplantation
	Parthanatos	PARP1-Spaltung Anstieg von NAD ⁺ und ATP	DNA-Schädigung, Neurodegenerativ
	Pyroptose	Aktivierung über den Nod-like-Rezeptor Caspase-1-abhängiges Pyroptosom Zellyse und schneller Verlust der Plasmamembran Anschwellen der Zelle Porenformation ROS-Anstieg Entzündlich	Entzündung, Pathogenabwehr
	Pyronekrose	Benötigen Caspase-1 Mögliche RIP1-Abhängigkeit	Immunsystem
Zufälliger Zelltod	Nekrose	Anschwellen der Zelle Plasmamembranruptur Verlust der Struktur der Organellen Keine Chromatinkondensation Zytoplasm Austritt Plasmamembranruptur Entzündlich	Starke irreversible Schädigung der Zelle

Neben der Nekroptose werden die Ferroptose, Parthanatos sowie die Pyroptose ebenfalls der programmierten Nekrose zugeordnet (PASPARAKIS & VANDENABEELE, 2015). Neben der Apoptose stellt die Nekroptose durch ihren regulierten Mechanismus ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Die Regulation von Apoptose oder Nekroptose durch einen Rezeptor-induzierten Stimulus oder genotoxischen Stress bietet eine hohe klinische Relevanz in der zukünftigen Therapie (VANDENABEELE et al., 2010).

1.5. Die Apoptose – ein Caspase-abhängiger Zelltod

KERR und Kollegen (1972) beschrieben erstmals die Apoptose als einen programmierten Zelltodmechanismus, in dem einzelne Zellen eines multizellulären Organismus oder Gewebeverbands „Selbstmord“ begehen, um das Überleben eines Organismus zu gewährleisten. Der programmierte Zelltod besitzt somit wichtige Funktionen in physiologischen Prozessen, der Entwicklung, der Zellhomöostase sowie der Immunität von Organismen. Im gesunden

Gewebe wird die natürliche Zellhomöostase durch die Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose erhalten. Eine Störung dieses Gleichgewichts trägt zur Entstehung von Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen, Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Krebs bei (vgl. Tab. 2; Übersicht in THOMPSON, 1995).

Tabelle 2: Erkrankungen, die mit einer verstärkten beziehungsweise verminderten Apoptosefähigkeit assoziiert sind (verändert nach FAVALORO et al., 2012).

Erkrankung	Apoptose
AIDS Neurologische Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson, Huntington, Schlaganfall) Ischämieschaden (Herzinfarkt, Ischämie, bakterielle und virale Infektionen) Toxin-induzierte Lebererkrankungen (Alkohol)	Zu viel
Krebs Autoimmunerkrankungen (Lupus, rheumatoide Arthritis, Thyreoiditis) Virale Infektionen (Herpesvirus, Poxvirus, Adenovirus)	Zu wenig

Die Apoptose unterteilt sich in den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg. Der intrinsische Signalweg läuft über die Mitochondrien, wohingegen der extrinsische Signalweg über die Bindung eines Liganden an seinen Todesrezeptor initiiert wird. Charakteristisch für beide Signalwege ist die Aktivierung von Cystein-Proteasen, der *CysteinyI-aspartate specific protease* (Caspase)-Familie (zusammengefasst in HENGARTNER, 2000). In beiden Fällen wird die Pro-Caspase-3 aktiviert und führt zur Initiierung der Apoptose. Die beiden Signalwege der Apoptose werden in Abbildung 1 schematisch erläutert.

1.5.1. Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird unter anderem durch Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Schädigung oder Zytokinesezernierung ausgelöst und aktiviert eine Vielzahl von Signalnetzwerken, die eine Veränderung der mitochondrialen äußeren Membranpermeabilität (MOMP) bewirken und proapoptotische Faktoren wie Cytochrom *c*, *Second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac), Endonuklease G; Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) und *High temperature requirement A* (HtrA2) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ausschütten (Übersicht in VAN GURP et al., 2003). Freies Cytochrom *c* bildet zusammen mit *Apoptotic protease activity factor-1* (Apaf-1) und Desoxydenosintriphosphat (dATP) das sogenannte Apoptosom, ein Komplex, der seinerseits Caspase-9 aktiviert (LI et al., 1997). Eine Caspase-9-Aktivierung resultiert in der Spaltung von Caspase-3, -6 und -7 (LI et al., 1997; SRINIVASULA et al., 1998).

HENGARTNER (2000) bezeichnet die Caspasen als „Exekutoren der Apoptose“, welche evolutionär sehr konserviert sind. Caspasen sind eine Gruppe von Cystein-Proteasen mit einer

aktiven Cystein-Seite, die ihr Substrat an einer Asparaginsäure-Xxx-Bindung spaltet (THORNBERRY et al., 1997). In der Regel werden Caspasen als inaktive enzymatische Zymogene synthetisiert und bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer p20- sowie einer p10-Domäne. Die Aktivierung der Caspase erfolgt durch die proteolytische Spaltung des Zymogens zwischen der p20- und der p10-Domäne (EARNSHAW et al., 1999). In ihrer reifen Form bildet die Caspase ein Heterotetramer aus zwei p20/p10-Heterodimeren (EARNSHAW et al., 1999). Im Wesentlichen wird zwischen zwei Gruppen von Caspasen unterschieden: den Initiatorcaspasen wie Caspasen-2,-8,-9 und den Effektorcaspasen wie Caspasen-3,-7, die ihrerseits von den Initiatorcaspasen aktiviert werden können (HARVEY & KUMAR, 1998; DENAULT & SALVESEN, 2002; LAVRIK et al., 2005). Die Initiation von Caspasen bewirkt eine substratspezifische Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung von Zielproteinen (HENGARTNER, 2000). Natürliche Inhibitoren der Caspasen sind Proteine der *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAPs)-Familie. Der potenteste Caspaseinhibitor ist XIAP, das sowohl Caspase-3 als auch Caspase-9 direkt hemmen kann (DEVERAUX et al., 1997).

Ein Gegenspieler der IAPs ist das mitochondriale Protein Smac und sein Maushomolog *Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI* (DIABLO) (DU et al., 2000; VERHAGEN et al., 2000). Durch die Interaktion von Smac mit antiapoptotischen Proteinen der IAP-Familie wie XIAP, zellulären IAPs (c-IAP1 und c-IAP2) oder Survivin kann die Inhibierung der Caspasen aufgehoben werden, sodass die Apoptose initiiert werden kann (DU et al., 2000). Die Funktion von Smac erwies sich als vergleichbar zu den *Drosophila* Apoptose-aktivierenden Proteinen Reaper, *Head involution defective* (Hid) und Grim (DU et al., 2000; VUCIC et al., 1998; GOYAL et al., 2000). Die gesamte cDNA von Smac kodiert zunächst für ein 239 Aminosäuren und 27 kDa großes Molekül, die reife Form dagegen ist nur 25 kDa groß (DU et al., 2000). Wie viele andere mitochondriale Proteine besitzt Smac an seinem N-terminalen Ende eine typische 55 Aminosäure große mitochondriale Zielsignalsequenz, die sich durch eine amphipathische α -Helix mit positiv geladenen Aminosäuren charakterisiert (DU et al., 2000; SCHATZ & DOBBERSTEIN, 1996). Durch streng kontrollierte Mechanismen wird die Vorläuferform von Smac in den Mitochondrien in seine reife Form gespalten und während eines Apoptosestimulus aus dem Intermembranraum der Mitochondrien entlassen, woraufhin es seine proapoptotische Wirkung entfaltet, indem es Familienmitglieder der IAPs bindet (DU et al., 2000; SAELENS et al., 2004). Dabei ist es notwendig, dass Smac sowie sein Maushomolog DIABLO einen Homodimer formen, um ihre proapoptotischen Eigenschaften zu entfalten (CHAI et al., 2000). Eine spezifische N-terminale

Aminosäuresequenz mit den vier Aminosäuren Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin (AVPI) ist für die Interaktion mit den IAPs verantwortlich (CHAI et al., 2000; WU et al., 2000).

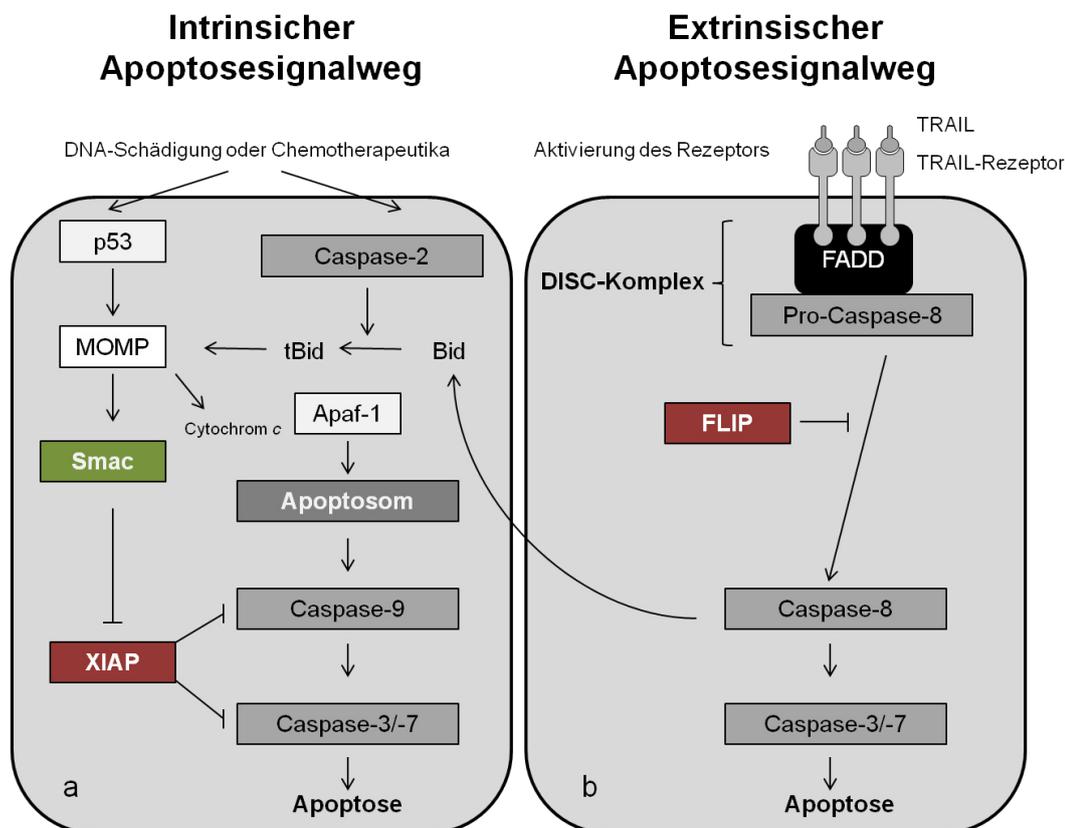


Abbildung 1: Signaltransduktionswege der Apoptose. a) Durch DNA-Schädigung oder chemotherapeutische Substanzen wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert und der intrinsische Apoptosesignalweg eingeleitet. p53 kann proapoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie aktivieren, die wiederum eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials hervorrufen. Infolge dessen werden aus dem Intermembranraum der Mitochondrien unter anderem Cytochrom c und Smac freigesetzt. Zusammen mit Apaf-1 und Caspase-9 kann Cytochrom c das Apoptosom bilden, das eine Aktivierung von Caspase-9 bewirkt. Als Initiatorcaspase kann Caspase-9 weitere Effektorcaspasen, wie Caspase-3 und -7, spalten und die Apoptose einleiten. Ein natürlicher Inhibitor von Caspase-3 und Caspase-9 ist das antiapoptische Protein XIAP, welches häufig in Tumorzellen überexprimiert wird. XIAP wird seinerseits wiederum durch Smac antagonisiert. Neben der p53-Aktivierung infolge einer DNA-Schädigung kann auch Caspase-2 initiiert werden, die das proapoptische Bid durch eine Spaltung aktiviert. **b)** Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie, wie zum Beispiel TRAIL, vermittelt. Bindet der TRAIL-Ligand an seinen entsprechenden Rezeptor, erfolgt eine Rezeptortrimerisierung, die dazu führt, dass der sogenannte DISC-Komplex entsteht. An dem DISC-Komplex rekrutiert das Adaptermolekül FADD mehrere Procaspase-8-Moleküle. Die Aktivierung der Caspase-8 kann durch die Bindung von c-FLIP inhibiert werden. Der extrinsische sowie der intrinsische Signalweg können miteinander interagieren, indem Bid Caspase-8-abhängig gespalten wird. Die gesplattene Form von Bid steigert die proapoptische Aktivität in Zellen (verändert nach SHALINI et al., 2015; HENGARTNER, 2000).

Neben den IAPs und Smac verfügen die Mitglieder der *B-Cell Lymphoma-2* (Bcl-2)-Familie über einen wichtigen Einfluss auf das Fortschreiten der Apoptose, indem einige Proteine dieser Familie einen hemmenden, andere wiederum einen aktivierenden Einfluss besitzen.

Die nachfolgenden Ausführungen beruhen auf der Arbeit von SCHWARTZ UND HOCKENBERY (2006), in der zusammenfassend die Eigenschaften der Bcl-2-Familie erläutert werden. Charakterisiert werden sie durch ihre Bcl-2-Homolog-3 (BH3)-Domäne und formen Heterodimere. Unterteilt wird die Familie der Bcl-2-Proteine in drei Subgruppen:

1) Eine Gruppe, die die Proteine Bcl-2, Bcl-2-ähnlichen Genprodukts X (Bcl-xL) und *Bcl-2 like protein 2* (Bcl-w) einschließt und ausschließlich antiapoptische Eigenschaften besitzt. 2) Eine Unterfamilie vertreten durch die Proteine *Bcl-2 associated X protein* (Bax) und *Bcl-2-antagonist/killer* (Bak) sowie 3) eine Unterfamilie mit *Bcl-2 interacting killer* (Bik) und *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), die über proapoptotische Einflüsse verfügen. Das Protein Bcl-2 aus der gleichnamigen Proteinfamilie ist der bekannteste Vertreter seiner Familie und kennzeichnet sich durch seine starke antiapoptotische Wirkung, indem es proapoptotische Proteine hemmt, die die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien verhindern (SCHWARTZ & HOCKENBERY, 2006).

Der populärste und bestuntersuchte Tumorsuppressor ist das Protein p53. Auch als „Wächter des Genoms“ bekannt, reagiert er auf zellulären Stress infolge von DNA-Schädigung, Hypoxie oder fehlgeleiteter Onkogen-Expression und induziert als Transkriptionsfaktor antiproliferative Effekte (LANE, 1992). Im gesunden Gewebe kontrolliert es essentielle biologische Prozesse wie den Zellzyklus-Arrest, die Seneszenz und die Apoptose. Welches Ereignis eintritt, hängt sowohl von den eingehenden Signalen wie auch von den umliegenden Faktoren und vom Zelltyp ab (FRIDMAN & LOWE, 2003). Die Aktivierung von p53 erfolgt als Antwort auf zellulären Stress, sodass p53 in einer tetrameren Form stabilisiert wird. Das aktivierte Protein bindet daraufhin an sequenzspezifische DNA-Abschnitte und beginnt mit der Transkription von Zielgenen (YEE & VOUSDEN, 2005). DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung oder durch chemotherapeutische Substanzen auftreten, bewirken eine posttranslationale Modifikation von p53 (APPELLA & ANDERSON, 2001). Unter anderem kann p53 durch die Kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) am N-terminalen Ende phosphoryliert werden (APPELLA & ANDERSON, 2001). Während der Zellzyklus-Kontrollpunkte werden Zellen auf „Fehler“ im Erbgut geprüft. Werden Unregelmäßigkeiten entdeckt, wird p53 über ATM aktiviert, in dessen Folge p21^{Waf1/Cip1}, ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor (cdc), transaktiviert wird und den G1-Arrest einleitet (XU & BALTIMORE, 1996). Ebenfalls ist p53 in der Lage, den G2/M-Arrest zu induzieren, indem es die Funktion des Cyclin B/cdc2-Komplexes stört (Thompson et al. 1997; NURSE, 1990). Die wichtigste Rolle wird p53 jedoch in der Apoptose zugeschrieben. p53 ist in der Lage, proapoptotische Gene wie *Bid*, *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (NOXA), *Leucine-rich repeats and death domain containing* (PIDD) und *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) zu induzieren und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-xL sowie Survivin zu unterdrücken (BARTKE et al., 2001; HOFFMAN et al., 2002; RYAN et al., 2001; WU et al., 2001). Der natürliche Hemmer von p53 ist *Murine double minute-2*

(MDM2); über einen negativen Feedback-Mechanismus wird die Transkription durch p53 induziert und MDM2 übernimmt als E3-Ubiquitin-Ligase die Ubiquitinierung von p53 und leitet somit dessen proteasomale Degradation ein (HOFFMAN et al., 2002). Der Ubiquitinierungsprozess von Proteinen verläuft über einen Mechanismus, der für seine Reaktion drei Enzyme benötigt. Zunächst bindet an das Cystein des E1-Enzyms ein Ubiquitinmolekül, das anschließend auf das E2-Enzym übergeben wird (BERNDSSEN & WOLBERGER, 2014). Die E3-Ligase schließlich überträgt das Ubiquitin auf sein Zielprotein und kennzeichnet es somit für den proteosomalen Abbau (BERNDSSEN & WOLBERGER, 2014). Phosphorylierungen am aminoterminalen Ende von p53 dagegen verhindern die Interaktion zwischen MDM2 und p53, sodass p53 stabilisiert werden kann (KUSSIE et al., 1996). Ebenso kann p53 durch die Repression von Survivin und die damit verbundene Aktivierung von Caspasen die Apoptose einleiten (HOFFMAN et al., 2002). Durch die fundamentale Rolle von p53 in der Apoptose wird in Tumoren häufig eine p53-Mutation nachgewiesen, die zu einer Inaktivierung des Proteins führen kann (HUSSAIN & HARRIS, 1998). p53 kann in Folge einer chemotherapeutischen Behandlung aktiviert werden und die Apoptose einleiten (JOHNSTONE et al., 2002). Eine DNA-Schädigung, zum Beispiel durch Gamma(γ)-Strahlung, bewirkt eine Phosphorylierung von ATM und *Checkpoint kinase 2* (Chk2), die zu einer Stabilisierung von p53 führt und die Inhibierung von MDM2 verursacht (KHANNA & JACKSON, 2001). Hauptsächlich agiert p53 im intrinsischen Signalweg, kann aber auch durch die Initiation der Transkription von CD95 und *Death receptor 5* (DR5/TRAIL-R2) den Signalweg über einen Todesrezeptor aktivieren (BOUVARD et al., 2000; WU et al., 1997).

1.5.2. Der extrinsische Signalweg

Zelloberflächenrezeptoren können Signale an die Zelle weiterleiten, um auf äußere Einflüsse wie Todesliganden, Wachstumsfaktoren oder Infektionen zu reagieren. Die Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs erfolgt über die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie, die extrazellulär eine Cystein-reiche Domäne und intrazellulär eine zytoplasmatische Todesdomäne besitzen (SMITH et al., 1994; NAGATA, 1997). CD95 und TRAIL-Rezeptoren gehören zu den bekanntesten Vertretern der Rezeptor-Superfamilie (HEHLGANS & PFEFFER, 2005). Bedingt durch die Ligandenbindung an seinen entsprechenden Rezeptor führt die Rezeptortrimerisierung zu der Rekrutierung des Adapterproteins *Fas-associated protein with death domain* (FADD) an die intrazelluläre Todesdomäne. Das Adapterprotein FADD seinerseits mobilisiert Procaspase-8 und bildet den sogenannten *Death inducing signalling complex* (DISC)-Komplex (KISCHKEL et al., 1995).

Der DISC-Komplex bewirkt die autoproteolytische Spaltung und Aktivierung der Pro-Caspase-8. Bei erfolgreicher Aktivierung von Caspase-8 wird eine Caspase-Kaskade ausgelöst, die wiederum zur Spaltung von Caspase-3 führen kann.

Ein negativer Regulator der Caspase-8 ist das Protein *cellulare Flice inhibitory protein* (c-FLIP) (INOHARA et al., 1997). In Säugerzellen werden aktuell drei c-FLIP-Formen beschrieben: das 55 kDa große c-FLIP_L (*long*), das 26 kDa große c-FLIP_S (*short*) und das 24 kDa große c-FLIP_R (IRMLER et al., 1997; DJERBI et al., 1999). Die kurze c-FLIP_S- sowie die lange c-FLIP_L-Form besitzen ebenso, wie Procaspase-8 und -10 je zwei charakteristische tandemartig angeordnete Todeseffektordomänen (DEDs), über die das Adapterprotein FADD gebunden werden kann. Die lange c-FLIP_L-Form beinhaltet des weiteren eine Protease-ähnliche Domäne, die homolog zu Caspase-8 ist (IRMLER et al., 1997). Aufgrund mehrerer Veränderungen in der Aminosäureabfolge fehlt c-FLIP_L im Gegensatz zur Procaspase-8 der katalytisch wichtige Cystein-Rest und somit auch die katalytische Aktivität (IRMLER et al., 1997). Eine vollständige Blockierung der Apoptose konnte bisher nur für c-FLIP_S und c-FLIP_R beschrieben werden (SHIRLEY & MICHEAU, 2013). Eine verstärkte Expression von c-FLIP_L führt nicht zwangsläufig immer zu einer Hemmung der Apoptose. Die Heterodimerisierung aus c-FLIP und Caspase-8 könnte eine Erklärung für die anhaltende Apoptose sein, indem durch die Aktivierung von Caspase-8 das Molekül c-FLIP stabilisiert wird (MICHEAU et al., 2002; YU et al., 2009). In einigen Zellen ist die Caspase-8-Aktivität nicht ausreichend, um den Zelltod zu induzieren, sodass Caspase-8 das proapoptotische Bid in seine aktive Form t(*truncated*) Bid spaltet und somit zusätzlich den intrinsischen Signalweg einleiten kann (LUTTER et al., 2001).

1.6. Aktivierung der Apoptose über den TNF-Rezeptor

Neben den bekanntesten Todesrezeptoren wie CD95 oder TRAIL-Rezeptoren kann der TNF-Rezeptor-1 (TNF-R1) das Adaptermolekül *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein* (TRADD) binden (HSU et al., 1995), welches wiederum mit FADD interagiert, um die Aktivierung von Caspase-8 zu initiieren (s. Abb. 2). Durch die Bindung von TNF α an seinen entsprechenden Rezeptor wird der Signalweg aktiviert. Eine TNF α -Aktivierung des Rezeptors bewirkt die Formation von Komplex I mit den Signalmolekülen TRADD, *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2), c-IAP1, c-IAP2 und *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIP1) (MICHEAU & TSCHOPP, 2003; DECLERCQ et al., 2009). Die Kinase RIP1 übernimmt als vorgeschalteter Hauptregulator eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen und ist an der Induktion

verschiedener Zelltodsignalwege wie der Apoptose oder der Nekroptose beteiligt (OFENGEIM & YUAN, 2013).

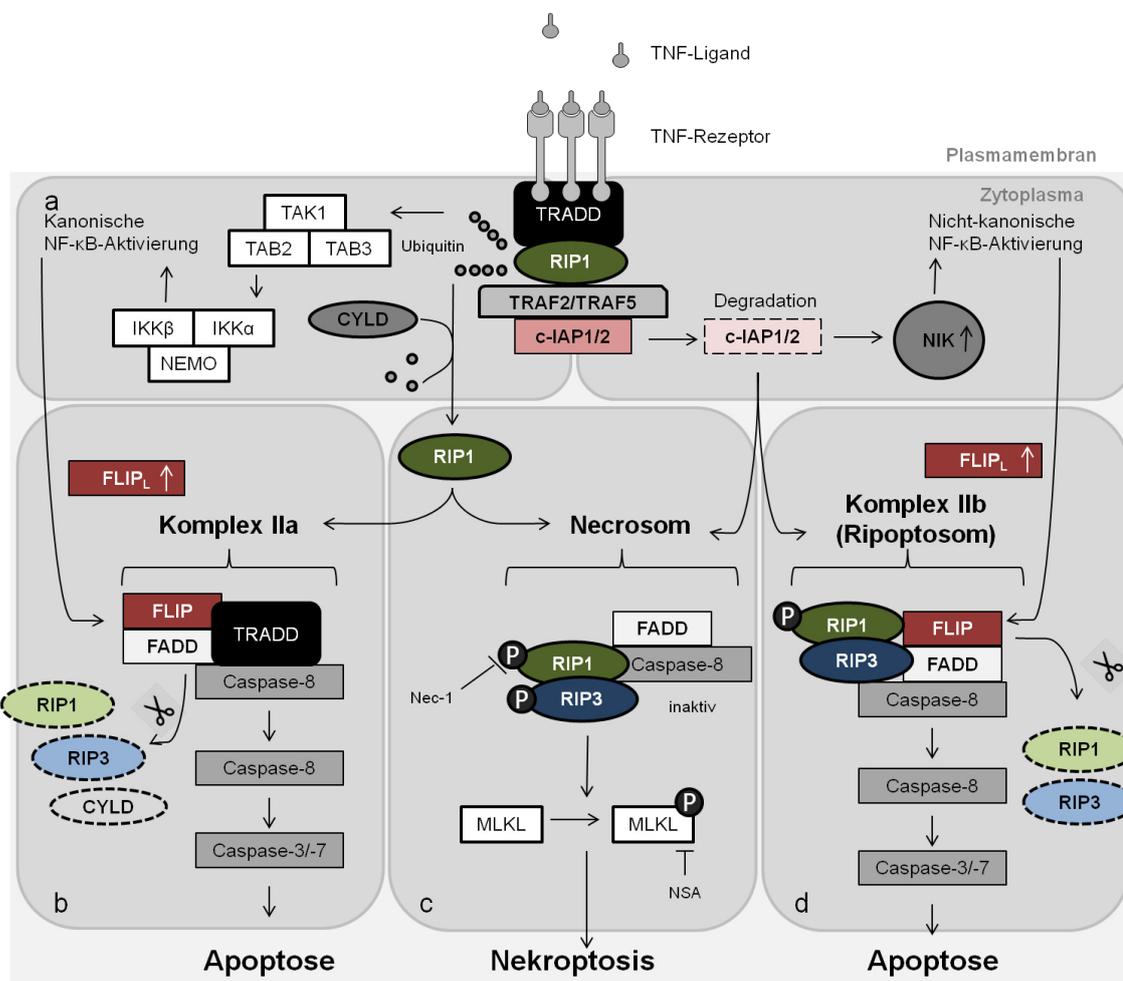


Abbildung 2: TNF-Rezeptor-vermittelte Nekroptose. **a)** Bindet ein TNF-Ligand an seinen entsprechenden Rezeptor, rekrutiert das Adapterprotein TRADD die Proteine RIP1, c-IAPs sowie TRAF2 und TRAF5 zum Rezeptor. Durch die Polyubiquitinierung von RIP1 durch c-IAP1 und c-IAP2 wird ein Komplex aus TAK1, TAB2 und TAB3 aktiviert, der wiederum den IKK-Komplex induziert. Der Zusammenschluss des IKK-Komplexes aktiviert den kanonischen NF-κB-Signalweg. **b)** CYLD entfernt daraufhin die Polyubiquitinierungen von RIP1, sodass der membranständige Komplex instabil wird und ins Zytoplasma dissoziiert. Die Moleküle RIP1, TRADD, FADD, Pro-Caspase-8 und FLIP interagieren miteinander. Das Protein FLIP_L bildet zusammen mit der Pro-Caspase-8 einen Komplex, der in der Lage ist RIP1, RIP3 und CYLD zu spalten und die Nekroptose zu unterdrücken. Dieser auch als Komplex IIa bezeichnete Komplex ermöglicht eine Caspase-8-Aktivierung, die als Folge die Effektorcaspase-3 und Caspase-7 spaltet. **c)** Ist jedoch Caspase-8 durch chemische Caspase-Inhibitoren (CrmA, RHIM oder vIRAL) gehemmt, können RIP1 und RIP3 in diesem Komplex assoziieren und das Necrosom bilden. Die Phosphorylierung von RIP1 und RIP3 wird das RIP3-Substrat MLKL rekrutierenden und Nekroptose initiiert. MLKL kann durch NSA inhibiert werden, sowie die RIP1 durch Nec-1. **d)** Wenn c-IAPs durch Smac-Mimetika degradiert oder inhibiert werden, kann RIP1 nicht mehr ubiquitiniert werden. Dies führt zur Hochregulation von NIK und der Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB-Signalweges. Zudem wird in Abwesenheit von c-IAPs ein TRADD-unabhängiger zytoplasmatischer Komplex aus RIP1, RIP3, FADD, FLIP_L und Caspase-8 gebildet, das Ripoptosom oder Komplex IIb. Durch die FLIP_L-Caspase-8-vermittelte Spaltung von RIP1 und RIP3 wird die Apoptose induziert (modifiziert nach VANDEN et al., 2014).

Die C-terminale E3-Ligase-RING-Domäne der c-IAPs bewirkt eine K63-Polyubiquitinierung von RIP1. Dabei übertragen die zellulären IAPs ein Ubiquitin von einem E2-Enzym auf das Zielprotein (FELTHAM et al., 2011). Die Polyubiquitinierung von RIP1 durch c-IAP1 und c-IAP2 ermöglicht die Interaktion von RIP1 mit *TGF-β-activated kinase 1* (TAK-1) und den

TAK1-bindenden Proteinen (TAB) 2 und 3 zu einem Komplex, welcher den *IκB kinase* (IKK)-Komplex aus IKKα/IKKβ/NEMO aktiviert (BERTRAND et al., 2008). Die Kinase *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha* (IκBα) wird anlässlich dessen degradiert und bewirkt die Aktivierung des kanonischen *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB)-Signalwegs. Der kanonische Signalweg aktiviert *Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit* (RelA)/p50-Dimere, die im nicht-stimulierten Zustand an IκB-Protein gebunden sind. Aktiviert wird der kanonische Signalweg unter anderem durch TNFα oder genotoxischen Stress (Übersicht in JOST & RULAND, 2007). Der nicht-kanonische Weg dagegen wird durch *NF-kappa-B-inducing kinase* (NIK) induziert und aktiviert die RelB- und p52-Untereinheit (Übersicht in JOST & RULAND, 2007). Die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs fördert die Akkumulation von *Linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) an den Komplex, in dessen Folge *Cylin-dromatosis* (CYLD) die K63-Ubiquitinreste von RIP1 entfernen kann (HAAS et al., 2009). Das Protein CYLD entfernt die Ubiquitinreste vollständig, sodass folglich der Komplex Iia mit den Molekülen TRADD, FADD und Caspase-8 im Zytoplasma gebildet werden kann (Übersicht in WILSON et al., 2009).

C-IAP1, c-IAP2 und XIAP wurden als NF-κB-induzierte Transkripte identifiziert, die zu einem NF-κB-vermittelten Schutz gegen TNFα-induzierte Apoptose führen (CHU et al., 1997; WANG et al., 1998; STEHLIK et al., 1998). MICHEAU und Kollegen (2001) zeigten, dass durch die NF-κB-induzierte Expression von c-FLIP und zugleich die kombinatorische Transkription von TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1 und c-IAP2 zu einer Resistenz gegenüber Apoptosestimuli durch CD95 oder TNF führen. Über einen negativen Feedback-Mechanismus erfolgt die Transkription des NF-κB-induzierten Genes *Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3* (*TNFAIP3*), welches als Protein A20 neben CYLD die K63-Ubiquitinierungsketten von RIP1 entfernt. In seiner aktiven Form fügt A20 K48-Ubiquitinylierungsreste an die Kinase RIP1 an, kennzeichnet es somit für die proteosomale Degradation und unterdrückt sowohl den Zelltod als auch die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs (WERTZ et al., 2004). Zudem konnte aber auch gezeigt werden, dass A20 die TNF-vermittelte Apoptose unterdrücken kann, indem es die Rekrutierung von TRADD und RIP1 an den Rezeptor unterbindet (HE & TING, 2002). In Abwesenheit von c-IAPs kann sich ein TRADD-unabhängiger Komplex, Komplex Iib oder auch Ripoptosom genannt, mit RIP1, RIP3, FADD und einem Heterodimer aus FLIP_L und Caspase-8 bilden und tritt in Folge von genotoxischem Stress auf (VANDEN et al., 2014; CHRISTOFFERSON & YUAN, 2010). Insofern Caspase-8 nicht blockiert ist, können sowohl Komplex Iia als auch Komplex Iib (Ripoptosom) mit der Initiierung der

Apoptosemaschinerie fortfahren und Caspase-8-abhängig RIP1 und RIP3 gespalten werden (vgl. Abb.2; VANDEN et al., 2014). Der aktivierte CD95-Rezeptor kann außerdem an das Adaptermolekül RIP1 (STANGER et al. 1995) und TRADD (HSU et al. 1995; DUAN & DIXIT, 1997) binden und das Protein *Death domain-containing protein CRADD* (RAIDD) rekrutieren (DUAN & DIXIT, 1997), einen Adapter, welcher an der Prodomäne von Caspase-2 binden kann. Das sogenannte PIDDosom ist ein Multiproteinsignalkomplex, der zur Aktivierung von Caspase-2 führt (TINEL & TSCHOPP, 2004; JANG & PARK 2013). BERUBE und Kollegen (2005) zeigten in ihrer Studie, dass eine Überexpression von PIDD zu einem RAIDD-abhängigen Zelltod führen kann. Die Spaltung von PIDD-FL zu PIDD-C fördert zunächst die Interaktion mit NEMO und RIP1, die eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges initiiert. Eine weitere Spaltung von PIDD-C in PIDD-CC dagegen begünstigt die Formierung eines RAIDD-abhängigen Komplexes, der wiederum zu einem Caspase-2-vermittelten Zelltod führt (RIBE et al., 2008). Die Interaktion mit dem Adapterprotein RAIDD scheint jedoch dabei nicht zwangsläufig notwendig zu sein (SHALINI et al., 2015). Die Aktivierung von Caspase-2 kann sowohl vor als auch nach dem MOMP ablaufen. Eine p53-induzierte Induktion von PIDD infolge einer DNA-Schädigung, die damit verbundene Caspase-2-Aktivierung und Spaltung von MDM2 führen zur Stabilisierung von p53 und zur Unterdrückung der Tumorgenese (Übersicht in SHALINI et al., 2015).

1.7. Die Nekroptose - ein Caspase-unabhängiger Zelltodmechanismus

Im Gegensatz zur Apoptose unterliegen nekrotische Zellen einem nicht regulierten Zelltod. Die Nekrose wird durch unterschiedlichste Faktoren wie Viren, Bakterien und Protozoen ausgelöst und verursacht ein unkontrolliertes Anschwellen der Zellen, das wiederum zum Zusammenbruch der Plasmamembran und der damit verbundenen Zellyse führt. Die Nekrose charakterisiert sich durch die unzureichende Sekretion von Zytokinen, Stickoxiden und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und führt in jedem Fall zu einer Entzündungsreaktion (Übersicht in BLATT & GLICK, 2001).

Jedoch konnte in der Vergangenheit die Beobachtung gemacht werden, dass in einigen Fällen die Nekrose, durch die Aktivierung von spezifischen und pathologischen Prozessen, unter regulierten Bedingungen ablaufen kann (PROSKURYAKOV et al., 2003). Diese regulierte Form der Nekrose wird heute als Nekroptose bezeichnet und beschreibt einen Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus und wird in Abbildung 2 dargestellt (DEGTEREV et al., 2005). Induziert wird die Nekroptose durch die Aktivierung der Todesrezeptor-Subtypen der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Zu den Induktoren zählen unter anderem der CD95- und der

TNF α -Ligand, die ebenfalls in vielen Zelltypen die Apoptose stimulieren. Unter differenziellen Gegebenheiten fördern diese Liganden den Zelltod in einer nicht-apoptotischen Weise mit nekrotisch-morphologischen Merkmalen. Normalerweise würden der Komplex IIa und das Ripoptosom mit der Initiierung der Apoptose über die Aktivierung von Caspase-8 zur Spaltung von RIP1 und RIP3 führen. Wird Caspase-8-Aktivität hingegen blockiert (z.B. durch *Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone* (Z-VAD-FMK), *cytokine response modifier A* (CrmA) oder c-FLIP), ist die Spaltung von RIP1 und RIP3 unterbunden und die Kinasen signalisieren der nekroptotischen Maschinerie, den nicht-apoptotischen Zelltod einzuleiten (Übersicht in VANDEN et al., 2014). Sowohl Komplex IIa wie auch das Ripoptosom sind in der Lage, den apoptotischen wie auch den nekroptotischen Signalweg auszulösen.

Bei diesem Prozess wird die Bildung von ROS, lysosomaler Membranpermeabilisierung (LMP), AIF und *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP)-Spaltung beobachtet. Um den Signalweg der Nekroptose auszulösen, müssen die Kinasen RIP1 und RIP3 sowie *Mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL), ein RIP-3-Substrat, aktiviert werden (CHO et al., 2009; HE et al., 2009). RIP1, als Schlüsselregulator der Nekroptose, phosphoryliert RIP3, sodass damit die Bildung eines Necrosom-Komplexes einhergeht. Dieser Komplex phosphoryliert MLKL, welches als eine wichtige Komponente des nekroptotischen Signalwegs identifiziert werden konnte (SUN et al., 2012). Die RIP3-Kinaseaktivität ist entscheidend für die Initiierung der Nekroptose (KAISER et al., 2013). RIP3 beteiligt sich an der Aufrechterhaltung einer Ripoptosom-ähnlichen Plattform, die eine Signaltransduktion zwischen Apoptose und Nekroptose vermittelt (MANDAL et al., 2014). Durch die Inhibierung von RIP3 kann die Apoptose induziert werden (MANDAL et al., 2014). Pharmakologische Inhibitoren der Nekroptose sind der RIP1-Hemmer Necrostatin-1 (Nec-1) und der MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide (NSA) (DEGTEREV et al., 2008; SUN et al., 2012).

1.8. Der JNK-Signalweg, eine alternative Form des Caspase-unabhängigen Zelltods

Eine weitere Form des Caspase-unabhängigen Zelltods, der ebenfalls die Apoptose induzieren kann, wird durch zellulären Stress ausgelöst und verläuft über die Aktivierung des c-Jun N-terminale Kinasen(JNK)-Signalwegs. JNK-Kinasen werden auch als *stress-activated phospho-kinases* (SAPK) bezeichnet und gehören zu den *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Sie spielen unter anderem bei der proinflammatorischen Zytokinen-vermittelten und durch genotoxischen Stress-induzierten Apoptose eine wichtige Rolle (DAVIES & TOURNIER, 2012). Des Weiteren übernehmen sie wichtige Funktionen in der Regulation von

Zellüberleben, Wachstum und Differenzierung (DAVIS, 2000). Die Aktivierung des JNK-Signalwegs kann demnach sowohl durch DNA-Schädigung wie auch durch Rezeptorstimulation vermittelt werden und in An- und Abwesenheit von Caspasen zum Zelltod führen. Unter anderem erfolgt bei der Aktivierung des JNK-Signalwegs die Phosphorylierung und anschließende Stabilisierung von p53 durch die JNK-Kinase (FUCHS et al., 1998). In der Caspase-unabhängigen Proteolyse der Zellen dagegen besitzen neben p53 Faktoren wie FADD, RIP1 und TRADD wichtige Funktionen im JNK-Signalweg, die zur lysosomalen Membranpermeabilisierung beitragen, was wiederum zur Freisetzung von Cathepsin-Proteasen führt (MATSUYOSHI et al., 2006; KROEMER & MARTIN, 2005). Der JNK-Signalweg kann jedoch auch über die Bindung eines Liganden an den TNF-R1-Rezeptor aktiviert werden, wie MULLER-SIENERTH und Kollegen (2011) zeigten. KIM und Kollegen (2015) erläutern ferner, dass die Aktivierung der JNK-Kinase unter anderem die Funktion der Katalase unterdrückt, sodass eine ROS-abhängige Apoptose induziert werden kann. Tumorzellen schützen sich durch die Expression der Katalase vor intrazellulärer ROS-vermittelter Apoptose über den Hypochloros-Säure(HOCl)- oder Stickstoffmonoxid (NO)/Peroxynitrit-Signalweg (BECHTEL & BAUER, 2009; HEINZELMANN & BAUER, 2010). Ein weiteres Protein, welches an der Inhibierung der Apoptose beteiligt ist, indem es mitochondriale O₂-Formationen in Folge eines endoplasmatischen Retikulum-induzierten Stresssignals unterdrückt und Zellen vor oxidativer Schädigung schützt, ist Pon2 (NG et al., 2001). Pon2 reduziert indirekt die Superoxid-Freisetzung aus der inneren Mitochondrienmembran (ALTENHOFER et al., 2010). Zudem charakterisiert sich Pon2 durch sein Potential, direkt den JNK-Signalweg zu hemmen (Übersicht in WITTE et al., 2012).

1.9. Die Rolle der IAPs als natürliche Hemmer von Zelltodmechanismen

Die gängige Vorstellung einer Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Familienmitgliedern entscheidet, ob Zellen der Apoptose unterliegen (HENGARTNER, 2000). Die Apoptose wird in den meisten Nierenzellkarzinomen durch die Hochregulation antiapoptotischer Proteine wie XIAP und seiner verwandten Mitglieder der IAP-Familie unterdrückt und verringert die Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Substanzen (SCHNEIDER et al., 2007). IAP-Proteine sind durch eine bis drei N-terminale lokalisierte *baculovirale IAP repeats*(BIR)-Domänen charakterisiert (BIRNBAUM et al., 1994) und treten in vielzelligen Organismen von *Drosophila* bis hin zu den Säugetieren auf (VERHAGEN et al., 2001). Innerhalb der Domäne der Eukaryoten sind die IAPs weiter verbreitet und sehr konserviert (DEVERAUX & REED, 1999). Erstmals wurde die BIR-Domäne im Genom des

Insekten-infizierenden Baculovirus entdeckt, sie reprimiert in seiner Wirtszelle die Apoptose (CROOK et al., 1993; BIRNBAUM et al., 1994). Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die nahe Verwandtschaft zwischen den baculoviralen IAPs und Insekten-IAPs auf einen Gentransfer zurückzuführen ist, in dem IAP-Gene des Insektenwirts auf den Baculovirus übertragen wurden (HUGHES, 2002).

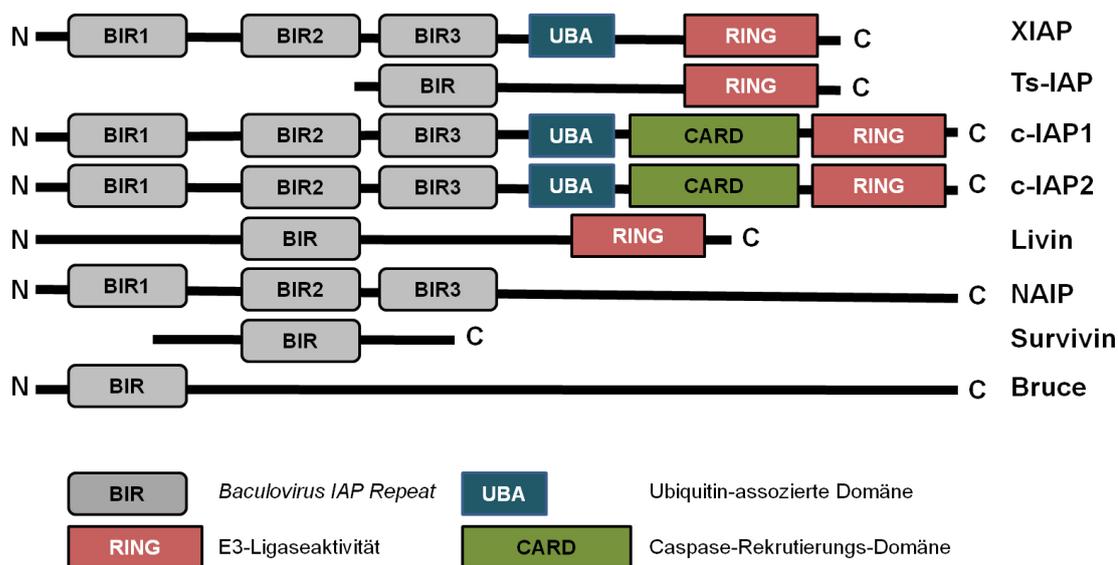


Abbildung 3: Die acht humanen IAPs und ihre funktionellen Domänen. Charakteristisch für die Familie der IAPs ist mindestens eine BIR-Domäne, die sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet. Einige der IAPs besitzen eine RING-Domäne am carboxyterminalen Ende, die als E3-Ubiquitinligase agiert und die Ubiquitinierung von aktivierten Caspasen bewirkt. Die beiden zellulären IAPs, c-IAP1 und c-IAP2, besitzen zudem eine CARD-Domäne, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Die UBA-Domäne ermöglicht den IAP-Proteinen, eine Vielzahl von Ubiquitinketten zu binden (verändert nach GYRD-HANSEN & MEIER, 2010; FULDA & VUCIC, 2012).

In Abbildung 3 sind die acht bekannten humanen IAP-Familienmitglieder dargestellt (HUNTER et al., 2007); die beiden zellulären IAPs c-IAP1 und c-IAP2, das X-chromosomale IAP (XIAP), Livin, das neuronale IAP (N-AIP) sowie Survivin, *Baculoviral IAP repeat-containing protein 6* (BRUCE) und Testis-spezifisches IAP (Ts-IAP) (Übersicht in VERHAGEN et al., 2001). Der stärkste Caspaseinhibitor aus der Familie der IAPs ist das Protein XIAP, das über seine BIR2-Domäne mit Caspase-3/-7 und über die BIR3-Domäne mit Caspase-9 interagieren kann (DEVERAUX et al., 1997). Die BIR-Domänen sind 70-80 Aminosäuren groß und charakterisieren sich durch drei konservierte Cysteine und ein Histidin (LIU et al., 2000; WU et al., 2000). Die strukturellen Eigenschaften der c-IAP1-BIR3-Domäne sind vergleichbar zu der BIR2- und der BIR3-Domäne von XIAP und zeichnen sich durch ein typisches Muster mit einer Reihe von vier bis fünf α -Helices, einem dreisträngigen β -Faltblatt und einem einzelnen Zinkion, welches zwischen Cystein- und Histidinresten lokalisiert ist, aus (VERHAGEN et al., 2001). Die BIR1-Domäne ist möglicherweise an der Aktivierung von NF- κ B über die Interaktion mit TAB1 beteiligt (LU et al., 2007).

Bei einigen der IAPs, wie XIAP, c-IAP1 und c-IAP2, tritt eine *Really Interesting New Gene* (RING)-Domäne, ein Typ von Zinkfinger, am carboxyterminalen Ende auf, welche in Insektenzellen zusammen mit der BIR-Domäne ihre antiapoptotische Wirkung entfaltet (DEVERAUX & REED, 1999). Die RING-Domäne ermöglicht den Proteinen aufgrund einer Ubiquitin-Ligase-Aktivität eine Regulation zur Selbstubiquitinierung und Degradierung (YANG, 2000). Die humanen c-IAP1 und c-IAP2 besitzen des Weiteren eine Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD), die zwischen der BIR- und der RING-Domäne assoziiert ist und beispielsweise mit dem Adapterprotein Apaf-1 interagieren kann (zusammengefasst in VERHAGEN et al., 2001). Die beiden zellulären IAPs sind in der Lage, *in vitro* die Aktivität der Caspase-3/-7 zu inhibieren (zusammengefasst in VERHAGEN et al., 2001). Die Überexpression von XIAP, aber auch der zellulären IAPs c-IAP1, c-IAP2 sowie NAIP und Survivin unterdrückt die Apoptose bei einer Vielzahl von Stimuli in Tumorzellen (DEVERAUX & REED, 1999). Signifikant erhöhte Expressionslevel von IAPs sind in Nierenzellkarzinomen mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen wie TRAIL assoziiert (RAMP et al., 2003). In Tumorzellen können c-IAP1 und c-IAP2 die K63-Ubiquitinierung von RIP1 bewirken, um sich vor einem TNF-induzierten Zelltod zu schützen (BERTRAND et al., 2008; FEOKTISTOVA et al., 2011). Unter TNF α -Einfluss werden die Proteine XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 in primären endothelialen Zellen stark überexprimiert, was ihnen wiederum eine Resistenz gegenüber einem TNF α -Stimulus verleiht (STEHLIK et al., 1998). STEHLIK und Kollegen (1998) fanden heraus, dass die Induktion der IAPs auf die Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen ist. Die Ubiquitin-bindende Domäne (UBA) der c-IAPs und XIAP scheint zudem Zellen vor einer TNF α -induzierten Apoptose zu schützen und unterstützt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (GYRD-HANSEN et al., 2008).

Das mitochondriale Protein Smac/DIABLO (DU et al. 2000; VERHAGEN et al., 2000) als starker Inhibitor der IAPs interagiert über sein N-terminales AVPI-Bindemotiv mit seinen Antagonisten (SRINIVASULA et al., 2001; SHIOZAKI et al., 2003). Die vier N-terminalen Aminosäurereste Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin (AVPI) von Smac bilden das IAP-Bindemotiv (IBM) und erkennen die Furche der BIR2- beziehungsweise BIR3-Domäne der IAPs (SCOTT et al., 2005). Die erste Aminosäure Alanin bindet über Wasserstoffbrücken an die hydrophobe Tasche der XIAP-BIR3-Domäne (SHI, 2002). Ein Austausch dieser Aminosäure mit jeder Aminosäure außer Glycin verhindert aufgrund einer sterischen Hinderung die Interaktion mit der Bindungstasche der BIR3-Domäne (SHI, 2002). Durch die Interaktion von Smac mit IAPs kann die IAP-abhängige Caspasehemmung aufgehoben werden.

Vergleichbare Wechselwirkungen zu der Smac-XIAP-Interaktion über die N-terminale Sequenz konnten bei dem *Drosophila*-Protein DIAP1 und Hid oder Grim beobachtet werden (s. Abb. 4; zusammengefasst in SHI, 2002).

A Proteine mit N-terminalen Sequenzhomologien		B		
Protein	Bindemotiv/-domäne	Interagiert mit	Funktion	
Smac/DIABLO	AVPI	BIR2-BIR3	Inhibierung von IAPs	
Reaper	AVAFYI	BIR3		
Grim	AIAYFLPD			
Hid	AVPFYLP			
hCasp-9	ATPFQEGP	Caspase-3/-7	Inhibierung der Apoptose	
mCasp-9	AVPYQEGP			
X-Casp-9	ATPVFSGE	Caspase-9	Inhibierung der Apoptose	

Abbildung 4: Homologe Strukturen des IAP-Bindemotivs. **A)** Homologe Aminosäuresequenzen im N-terminalen Bereich von Proteinen, über deren Aminosäurereste, insbesondere des Alanins, eine Interaktion zur hydrophobe Tasche die BIR-Domäne von IAPs auftreten kann (nach SHI, 2002). **B)** Tabelle ausgewählter Faktoren, die Einfluss auf die Apoptose haben, deren Bindemotive oder -domäne und die damit verbundene Funktionen.

Ausgenommen der ersten 10 N-terminalen Aminosäurereste des Proteins Smac sind keine Sequenzhomologien zwischen Hid, Grim und Reaper bekannt (SHI, 2002). Interessanterweise konnte ein Smac-ähnliches AVPI-Motiv in der Pro-Caspase-9 identifiziert werden, über die XIAP binden kann (s. Abb. 4; SRINIVASULA et al., 2001). Erst eine proteolytische Spaltung der Pro-Caspase-9 und ein darauffolgender Apoptosestimulus ermöglichen XIAP mit dem N-terminalen Tetrapeptid der Caspase-9 zu interagieren, um diesen zu inhibieren. Im Verlauf der Apoptose wird die Caspase-9 weiter gespalten und aktiviert die Effektorcaspase-3. Da eine RING-Dimerisierung von c-IAP-Molekülen essentiell für ihre E3-Ligaseaktivität ist, bewirkt die Interaktion zwischen Smac und einer BIR-Domäne der IAPs eine schnelle RING-abhängige Autoubiquitinierung. Ebenso kann in der Abwesenheit von c-IAP-Proteinen RIP1 nicht ubiquitiniert werden, sodass FADD und Caspase-8 binden können, was zur Aktivierung der Apoptose führt (GESERICK et al., 2009). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen, darunter auch Mitglieder der IAP-Familie, entscheidend an der Resistenzvermittlung in Tumoren beteiligt ist (LACASSE et al., 2008).

1.10. Neue *Small Molecules* als Zelltod-Aktivatoren mit dem Ziel, IAPs zu inhibieren

Die IAPs stellen einen wichtigen pharmakologischen Ansatzpunkt in der Entwicklung neuartiger Substanzen dar. IAPs sind häufig in Tumorzellen überexprimiert und führen zu einer fehlgeleiteten Apoptose. OOST und Kollegen (2004) entdeckten erstmals ein chemisch modifiziertes Peptidomimetika, welches das AVPI-Motiv von Smac imitierte, über die

Zellmembran penetrieren und die Apoptose in Tumorzellen induzieren konnte. Darauffolgend wurden nicht-peptidische kleine Moleküle (*Small Molecules*) designt, die eine hohe Bindeaffinität zu den BIR2/3-Domänen der zellulären IAPs und XIAP besitzen. Diese Verbindungen werden auch als IAP-Antagonisten oder Smac-Mimetika bezeichnet. Smac-Mimetika ahmen das AVPI-Motiv nach, um mit der BIR3-Domäne der IAPs zu interagieren. Eine ideale Voraussetzung für eine pharmazeutische Bindetasche sind die polaren und hydrophoben Gruppen auf der BIR3-Oberfläche der IAPs (SHI, 2002). Das Pentrapeptid AVPFY von dem funktionellen Smac-Homolog *Head involution defective* Protein (HID) zeigte eine deutlich stärkere Bindungsaffinität zu XIAP als das AVPI-Motiv (LIU et al., 2000). Diese neuartigen *Small Molecules* besitzen die Eigenschaft, Caspasen durch die Hemmung von XIAP zu reaktivieren sowie zelluläre IAPs zu degradieren und die RIP1-Ubiquitinierung zu unterdrücken. Somit können Smac-Mimetika sowohl die Apoptose wie auch die Nekroptose induzieren und stellen in der Behandlung von Krebspatienten neue potentielle Kandidaten dar, die eine IAP-vermittelte Resistenz in Tumorzellen aufheben und erfolgreich die Apoptose einleiten können (FULDA & VUCIC, 2012).

Smac-Mimetika lassen sich in monovalente und bivalente Moleküle unterteilen. Monovalente Verbindungen imitieren das AVPI-Motiv von IAP-Proteinen. Bivalente Strukturen setzen sich aus zwei AVPI-Motiven zusammen, die über einen Linker miteinander verknüpft sind (SUN et al., 2008). Zu den derzeit wichtigsten und bedeutendsten bivalenten IAP-Antagonisten zählen Birinapant und BV-6, monovalente Verbindungen sind GDC-0152, AT-406 und LBW242 (ALLENSWORTH et al., 2013; LI et al., 2011; FLYGARE et al., 2012; CAI et al., 2011; WEISBERG et al., 2007). Diese Smac-Mimetika weisen zum Teil nicht nur eine hohe Affinität zur der XIAP-BIR3-Domäne, sondern auch zu c-IAP1, c-IAP2 und ML-IAP auf. Sie können die Autoubiquitinierung von RING-enthaltenen IAPs, besonders c-IAP1 und c-IAP2, fördern (CAI et al., 2011). In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass pan-selektive IAP-Antagonisten mit als besonders effektiv eingestuft werden konnten (LU et al., 2008; NDUBAKU et al., 2009). Von vorklinischen Untersuchungen bis hin zu klinischen Studien finden diese Antagonisten Anwendung.

CAROSATI und Kollegen (2015) suchten in einem weit angelegten, Liganden-basierten virtuellen Screening nach potentiellen nicht-peptidischen Kandidaten, die das AVPI-Motiv von Smac nachahmen und mit der BIR3-XIAP-Domäne interagieren können. Als Ausgangsstruktur für das Screening wurde die PS-1-Struktur verwendet, die pan-selektiv an die BIR3-Domäne von XIAP und zellulären IAPs bindet und effektiver als c-IAP-spezifische Antagonisten den Zelltod induzierten sollte (s. Abb. 5; CAROSATI et al., 2015; NDUBAKU et

al., 2009). Die durch NDUBAKU und Kollegen (2009) getesteten pan-selektiven IAP-Antagonisten charakterisierten sich durch eine Vielzahl von dipolaren und hydrophoben Wechselwirkungen mit der Oberfläche der BIR-Domäne. CAROSATI und Kollegen (2015) entwickelten einen Algorithmus, der die Identifikation von möglichen Kandidaten aus einer Datenbank von mehr als 800.000 Substanzen (ChemDiversity) erlaubte. Dies führte zur Identifikation von 31 potentiellen IAP-Antagonisten. Die neu identifizierten Substanzen werden mit dem Namen LBPS für *Ligand-based-pan-selective* abgekürzt und beschreiben zum einen die Methode, mit der sie identifiziert wurden, zum anderen werden sie als *pan-selective* bezeichnet, da sie an verschiedene IAPs binden, selektiv aber nur mit der BIR-3-Domäne interagieren. Im Rahmen einer Kooperation wurden unserer Arbeitsgruppe die Substanzen exklusiv zur Verfügung gestellt. Im Laufe meiner Masterarbeit konnten aus den 31 Substanzen drei besonders wirksame Kandidaten identifiziert werden (STEVENS et al., 2014).

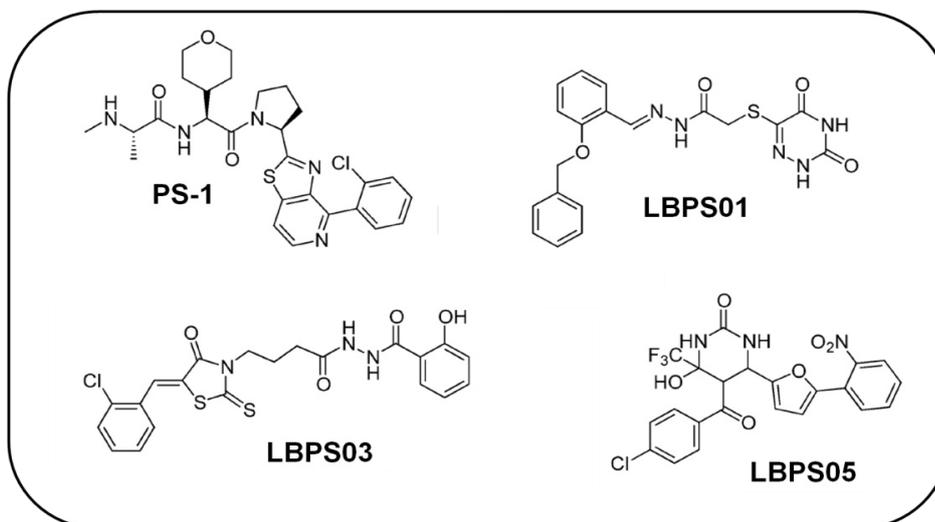


Abbildung 5: PS-1-Struktur und chemische Strukturen der Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05. Basierend auf der PS-1-Struktur wurden in einem Liganden-basiertem Screening Moleküle gesucht, die eine vergleichbare Struktur besitzen (NDUBAKU et al., 2009; CAROSATI et al., 2015).

Basierend auf dieser guten Wirksamkeit wurden, abgeleitet von diesen drei Strukturen, weitere Strukturderivate identifiziert, die Aufschluss über die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Substanzen geben sollten. Ebenfalls zeigten die gleichen 3 Substanzen per se starke antiproliferative Wirkungen auf leukämischen T-Lymphozyten der Linie Jurkat mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich (VAN DEN HÖFEL et al., 2014; CAROSATI et al., 2015). Im Vergleich wurden die kommerziell erhältlichen und bereits in klinischen Studien verwendeten Smac-Mimetika GDC-0152, AT-406 und Birinapant mit vielfach höheren IC_{50} -Werten getestet. Zugleich zeigten diese neu identifizierten Substanzen keinen Effekt auf peripheren mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs), riefen jedoch zeitabhängig eine starke Caspase-Reaktivierung hervor (CAROSATI et al., 2015).

1.11. Die klarzellige Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 als Modell einer XIAP-vermittelten Resistenz

Eine Möglichkeit von Tumorzellen, den natürlichen Kontrollmechanismen der Zelle sowie chemotherapeutischen Behandlungen zu entkommen, wird durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen vermittelt. Durch seinen MDR-Phänotyp umgeht das Nierenzellkarzinom die Wirkung vieler herkömmlich verwendeter chemotherapeutischer Substanzen. In einigen *in-vitro*-Untersuchungen bei Nierenzellkarzinomen offenbarte sich eine mangelnde Apoptosefähigkeit nach Behandlung mit Krebsmedikamenten, wie durch die Stimulation mit CD95L und TRAIL (GERHARZ et al., 1999; RAMP et al., 2000; DÉJOSEZ et al., 2000; RAMP et al., 2001). Neben der MDR-vermittelten Resistenz konnten wir in unserer Arbeitsgruppe das antiapoptotische XIAP als weiteres stark Resistenz-vermittelndes Protein in Nierenzellkarzinomen identifizieren. In 95% der untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurde das Protein exprimiert (RAMP et al., 2004). Bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenkarzinom konnte eine inverse Korrelation zwischen gesteigertem Expressionslevel von XIAP und geringer Tumordifferenzierung in einem vorangeschrittenen Tumorstadium mit zunehmender Aggressivität und damit eine verbundene verminderte Überlebensrate der Patienten festgestellt werden (RAMP et al., 2004). Durch die Überexpression von XIAP wird die Caspaseaktivität unterdrückt und verleiht Tumorzellen einen Schutz gegenüber Apoptosereizen wie CD95L- und TNF-Rezeptoraktivierung, antineoplastischen Substanzen und UV-Strahlung (RAMP et al., 2003). Die Expression von XIAP konnte in Nierenzellkarzinomen als ein unabhängiger und prognostischer Parameter identifiziert werden (RAMP et al., 2004). Der XIAP-vermittelten Inhibierung der Apoptose konnte somit eine wichtige Rolle während der Tumorprogression von klarzelligen Nierenkarzinomen zugeteilt werden.

Neben XIAP besitzt Survivin das Potential, über seine einzelne BIR-Domäne die Caspasen-3/-7 zu inhibieren (TAMM et al., 1998). SONG und Kollegen (2003) zeigten, dass Survivins Caspase-inhibierenden Fähigkeiten erst in Form eines Heterodimers mit XIAP entfaltet werden können. Das antiapoptotische Signal, welches infolge einer Heterodimerbildung hervorgerufen wird, führt zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, in dessen Folge das Molekül I κ B α phosphoryliert und anschließend degradiert wird (SONG et al., 2003). RAMP und Kollegen (2003) zeigten ferner, dass zwar das Expressionslevel von XIAP, nicht aber Survivin in Nierenkarzinomzelllinien deutlich erhöht war.

YAN und Kollegen (2004) wiesen in ihrer Arbeit auf eine verschobene Balance zwischen XIAP und dem Smac-Expressionslevel in fortgeschrittenem Nierenkarzinomen hin. Der relative *messenger*-RNA(mRNA)-Expressionslevel von XIAP bei fortgeschrittenen Tumor-

stadium und zunehmender Tumordifferenzierung war signifikant erhöht. In Abhängigkeit des Tumorstadiums ergaben Analysen auf Proteinebene deutlich erhöhte Level von XIAP. Des Weiteren wurden die mRNA- und Proteinlevel von Smac untersucht, die sich zwischen unterschiedlichen Tumorstadien nicht signifikant voneinander unterschieden. Die mRNA-Expressions-Ratio zwischen dem antiapoptotischen Protein XIAP und dem proapoptotischen Smac ist mit zunehmender Tumorprogression und fortschreitendem Tumorstadium nennenswert erhöht. Für das Nierenzellkarzinom konnte somit gezeigt werden, dass XIAP wesentlich an der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beteiligt ist (YAN et al., 2004).

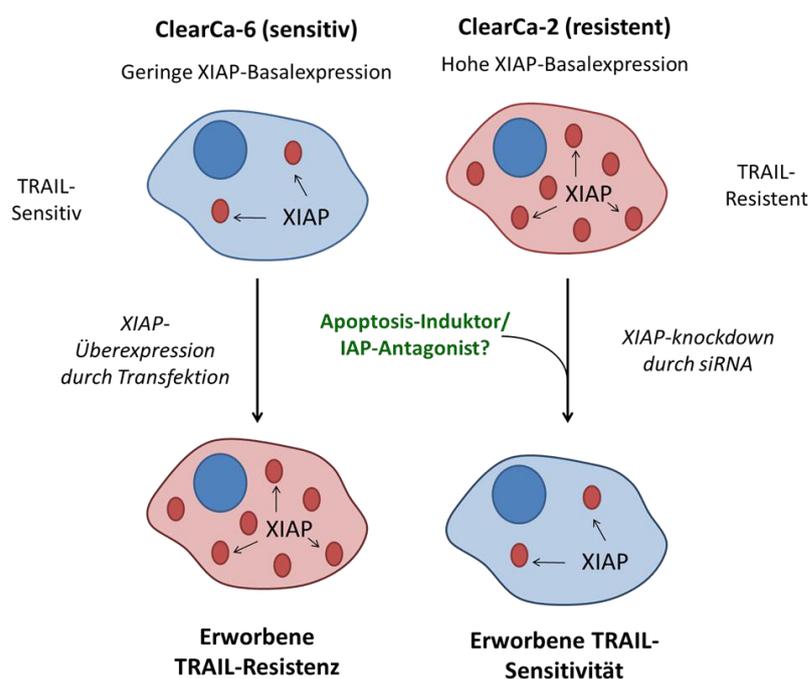


Abbildung 6: Rolle von XIAP in der Vermittlung einer TRAIL-induzierten Apoptose in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen. Die TRAIL-resistente Zelllinie ClearCa-2 charakterisiert sich durch erhöhte Expressionslevel von XIAP, wohingegen die TRAIL-sensitive Zelllinie ClearCa-6 deutlich geringere Proteinlevel aufweist. Durch die Überexpression von XIAP in der TRAIL-sensitiven Zelllinie ClearCa-6 konnten Zellen eine Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose erlangen, wohingegen der Knockdown von XIAP in der TRAIL-resistenten Zelllinie den Zelltod induziert (STEVENS et al., 2014).

Obwohl RAMP und Kollegen (2003) in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass die klarzellige Nierenzellkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 die beiden TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 exprimiert, konnte interessanterweise die Apoptose durch TRAIL-Behandlung nicht induziert werden. Erst die gleichzeitige Bestrahlung mit γ -Strahlen leitete die Apoptose ein. Als TRAIL-sensitive Zelllinie konnte unter anderem die Linie ClearCa-6 identifiziert werden (RAMP et al., 2003). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das antiapoptotische Protein XIAP in beiden Zelllinien differenziell exprimiert wird. Die Linie ClearCa-2 wies deutlich erhöhte XIAP-Expressionslevel im Vergleich zu ClearCa-6 auf. Durch die Transfektion von ClearCa-2 Zellen mit XIAP-siRNA konnten die Proteinlevel von

XIAP signifikant reduziert werden und eine TRAIL-Sensitivität erworben werden. Eine Überexpression von XIAP in ClearCa-6 Zellen führte zu einer Hochregulation des Proteins und dies wiederum vermittelte eine TRAIL-Resistenz (s. Abb. 6; Übersicht in STEVENS et al., 2014). Die Feststellung, dass XIAP in Nierenzellkarzinomen eine essentielle Funktion bei einer Unterdrückung der Apoptose einnimmt, macht die Untersuchung von neuen IAP-Antagonisten in diesem Modell sehr interessant. Die Linie ClearCa-2 konnte erfolgreich als Modell etabliert werden, da in dieser Zelllinie das antiapoptotische Protein XIAP offensichtlich einen molekularen Schalter zur Resistenzvermittlung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose darstellt.

1.12. Forschungsfrage und Ziele der Doktorarbeit

Neben Immun-, Chemo- oder Radiotherapie bekommt die sogenannte *Targeted Therapy* immer mehr Bedeutung. Bei dieser Form der Therapie finden monoklonale Antikörper oder *Small Molecules* Anwendung, um gezielt in Krebszellen den natürlichen Zelltod zu induzieren und Tumorzellen selektiv zu zerstören. Das häufige Auftreten von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen wird mit einer verminderten Überlebenschance assoziiert. Der häufig vertretene MDR-Phänotyp erschwert die Behandlung durch herkömmliche Chemotherapeutika, sodass ein dringlicher Bedarf für gezielte und effektivere Therapieoptionen besteht. Sollten zielgerichtete Therapien die Multi-Drug-Resistenz in Nierenzellkarzinomen überwinden, könnten neue Substanzen identifiziert werden, die in weitaus weniger therapieresistenten Tumoren zu guten antiproliferativen Effekten führen.

Durch die verstärkte Expression antiapoptotischer Komponenten erwerben neoplastische Zellen die Fähigkeit eines unbegrenzten Teilungspotentials, indem natürliche Zelltod-signalwege unterdrückt werden. Neben einer verstärkten Expression der MDR-Gene in klarzelligen Nierenzellkarzinomen besitzen Mitglieder der IAP-Familie eine bedeutende Rolle in der Resistenzvermittlung gegenüber chemotherapeutischen Herangehensweisen. In der TRAIL-resistenten klarzelligen Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 konnte XIAP als molekularer Schalter zur Regulation der Apoptose identifiziert werden. Für alternative Behandlungsoptionen wie der sogenannten *Targeted Therapy* könnte XIAP eine interessante molekulare Zielstruktur darstellen. Die Verwendung von *Small Molecules* mit dem Ziel, an die BIR3-XIAP-Domäne zu binden, stellte in den vergangenen Jahren einen vielversprechenden Forschungsschwerpunkt dar. Die Verwendung dieser neuartigen IAP-

Antagonisten oder Smac-Mimetika bietet die Möglichkeit, das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen wiederherzustellen und Tumorzellen für herkömmliche Chemotherapien zugänglich zu machen.

Im Rahmen meiner Masterarbeit konnten die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS01 und LBPS03 als potenzielle Apoptose-Induktoren identifiziert werden. Für beide Substanzen konnte eine Aktivierung der Initiatorcaspase-9 sowie der Effektorcaspasen-3/-7 und eine PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Als eine weitere vielversprechende Substanz wurde LBPS05 identifiziert, welches in ClearCa-2-Zellen signifikant den Zelltod induziert, jedoch keine Aktivierung der Caspasen-3/-7 beziehungsweise Caspase-9 hervorrief. Erste Hinweise darauf, dass die drei untersuchten Substanzen leicht degradierende Effekte auf XIAP besitzen und eine geringfügige Stabilisierung des Proteins c-IAP1 bewirkten, wurden ebenfalls im Rahmen meiner Masterarbeit generiert. Für das zelluläre c-IAP2 konnte durch LBPS01 und LBPS05 eine Expressionszunahme im Western Blot gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung und Identifikation der Wirkmechanismen der neuartigen Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 in ClearCa-2 sowie die Aufklärung der beteiligten Signalwege. Um die Annahme zu unterstützen, dass LBPS03 in ClearCa-2 einen apoptotischen Zelltod induziert, sollten weitere Nachweismethoden im Rahmen dieser Arbeit Anwendung finden. Der bereits beschriebene Caspase-unabhängige Zelltod in LBPS05-behandelten Zellen deutet auf eine programmierte Form der Nekrose, die Nekroptose, hin und seine Untersuchung soll ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sein. Die Verwendung von Inhibitoren der Apoptose und der Nekroptose soll bei der Aufklärung der beteiligten Signalwege eine wichtige Rolle spielen.

2. Material und Methode

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien	Firma
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Ammoniumperoxodisulfat	Bernd Braun Chemicals GmbH, Rottweil
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, St. Louis
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Bovine Serum Albumin Fraction V	PAA Cell Culture Company, Cambridge
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis
DTT	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Eisessig (100%)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ethanol (70%)	VWR Chemicals, Darmstadt
Glycerin	Roth Industries, Buchenau
Glycerol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth Industries, Buchenau
Natriumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, St. Louis
SDS Pellets	Bio-Rad Laboratories, Hercules
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis
Triton-x-100	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis
Tween-20	Merck, Darmstadt
β -Mercapthoethanol	Merck, Darmstadt

2.1.2. Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Reagenzien	Firma
Blocking Grad Blocker	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Bradford Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules
cOmplete, EDTA-free Proteaseinhibitor Tabletten	Hoffman-La Roche, Basel
DNA-Marker (1 kb)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DRAQ5	Biostatus, Shepshed
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis
Etoposide	Sigma-Aldrich, St. Louis
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis
IS Mounting Medium DAPI	Dianova, Hamburg
Page Ruler Plus Prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Penicillin-Streptomycin Glutamine (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PeqGreen	VWR Chemicals, Darmstadt
PhosSTOP - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Hoffman-La Roche, Basel
ProLong [®] Gold antifade Reagent-Eindeckelmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PonceauS Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis
RNA-Ladepuffer (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RNAse Zap Ambion	The RNA Company
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Roth Industries, Buchenau
TNF α	Humanzyme, Chicago
SuperKillerTRAIL	Enzo Life Sciences, Farmingdale
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis
TrypLE Express	Merck, Darmstadt

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
96-Well-PCR-Platte iCycler iQ5	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Counter Slides Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Dispenser Biopur	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Facs-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrilhandschuhe	Ansell Industrial GBU, Kleve
Nitrozellulosemembran	Whatman, Maidstone
Objektträger	Marienfeld HistoBond, Lauda Königshofen
PCR-Tube Caps	Bio-Rad Laboratories, Hercules
PCR-Tube Strips (0,2 ml)	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Pipettenspitzen Tip One	StarLab, Hamburg
Stripetten	Sigma-Aldrich, St. Louis
Whatman Papier	Whatman, Maidstone
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Kremsmünster
Zellkulturplatten	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One GmbH

2.1.4. Kits

Kits	Firma
Caspase-2 Staining Kit	Promokine, Heidelberg
Caspase-3 Staining Kit	Promokine, Heidelberg
Caspase-8 Staining Kit	Promokine, Heidelberg
Caspase-9 Staining Kit	Promokine, Heidelberg
QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Mitochondrial Apoptosis Staining Kit	Promokine, Heidelberg
Proteome Profiler Human Ubiquitin Array	R&D Systems, Minneapolis
REDTaq [®] ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, St. Louis -Aldrich
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden

2.1.5. Laborgeräte

Material	Firma
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Systemec, Puchheim
Dispenser	Eppendorf, Hamburg
Dispenserpipette	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer CyFlow Space	Sysmex Partec, Norderstedt
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M1	Carl Zeiss, Oberkochen
Geldokumentationsanlage	VWR Chemicals, Darmstadt
Gelelektrophoreseapparatur Mini-PROTEAN [®]	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Gelelektrophoresesystem Perfect Blue Mini L	VWR Chemicals, Darmstadt
Heizblock TS1 Thermo Shaker	Biometra, Göttingen
Inkubationsschüttler 3033	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Inkubationsschüttler RM5	CAT Zipperer, Staufen

Inkubator Thermo Electron Corporation HEPA Class 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Küvette µCuvette G1.0	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Mikroskop Labovert FS	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
MiniSpin Plus Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Netzwerkgerät PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR, Lincoln
pH-Meter Multi parameter peqMETER 1.14	VWR Chemicals, Darmstadt
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetierhilfe Pipetboy acu	Integra, Hudson
Pipetten Finnipipette F1	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Sterilbank NSF 49 BS 5726	Telstar, Terrassa
TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Trans-Blot-Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.6. Antikörper

Antikörper	Isotyp	Firma	Verdünnung	Lösungsmittel
α-Tubulin Clone B-5-1-2	M	Sigma-Aldrich, St. Louis	1:4.000	5% MP in TBS/T
Bid	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% MP in TBS/T
Caspase-3	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% MP in TBS/T
c-IAP1 (F-4)	M	Santa Cruz, Dallas	1:100	5% MP in TBS
c-IAP2 (H-85)	K	Santa Cruz, Dallas	1:200	5% MP in TBS
Cleaved Caspase Substrat Motif [DE(T/S/A)D]	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% MP in TBS/T
Cleaved Caspase-8 (D391)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
GAPDH Clone 71.1	M	Sigma-Aldrich, St. Louis	1:4.000	5% MP in TBS/T
Goat-Anti-Mouse 680 RD	Z	LI-COR, Lincoln	1:10.000	5% MP in TBS/T
Goat-Anti-Rabbit 800 CW	Z	LI-COR, Lincoln	1:10.000	5% MP in TBS/T
Goat-Anti-Streptavidin 800CW	Z	LI-COR, Lincoln	1:10.000	5% MP in TBS/T
IκBα	M	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% MP in TBS/T
MLKL	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
NF-κBp65 (D14E12)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
P21 (Waf1/Cip)	M	Cell Signaling, Cambridge	1:2.000	5% BSA in TBS/T
P53	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
PARP	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% MP in TBS/T
Phosph-NF-κBp65 (S536)(93H1)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
Phospho-MLKL	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
PIDD (LRDD)	K	Abcam, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
RIP1 (D94C12)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
RIP3 (E1Z1D)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
TNF-R1 (C35C1)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
TNF-R2	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
XIAP (3B6)	K	Cell Signaling, Cambridge	1:1.000	5% BSA in TBS/T
XIAP (H-202)	K	Santa Cruz, Dallas	1:200	5% MP in TBS

BSA= Bovine Serum Albumin; K=Kaninchen; M=Maus; MP= Milchpulver; Z=Ziege

2.1.7. Oligonukleotide

Zur Validierung der Affymetrix-Analysen wurden für einige Gene Primer verwendet, um in Real-Time-PCR-Analysen die Ergebnisse der Array-Analysen zu bestätigen. Die Primer-Sequenzen wurden durch das Programm *Primer BLAST* entworfen und exonübergreifend ausgewählt. Für alle gegebenen Primer wurde eine Annealing-Temperatur von 55 °C gewählt.

Tabelle 3: Primersequenzen der verwendeten Primer für Real-Time-PCR-Analysen. Die Primer wurden durch das Programm *Primer BLAST* identifiziert und durch die Firma Eurofins Genomics synthetisiert.

Genname	Sequenz (5'→3')	Sequenz (3'→5')	Accession No. (GenBank)
<i>BIRC5</i>	CGGTTGCGCTTTCCTTTCTG	TCCTTTGCAATTTTGTCTTGGC	NM_001012271.1
<i>CCL20</i>	GCGAATCAGAAGCAAGCAACT	TTGCGCACACAGACAACCTT	NM_001130046.1
<i>CDKN1A</i>	GTTTTTCAGGCGCCATGTCAG	CATTAGCGCATCACAGTCGC	NM_001220777.1
<i>CXCL8 (IL8)</i>	CACCGGAAGGAACCATCTCA	TGGCAAAACTGCACCTTCACA	NM_000584.3
<i>DDB2</i>	CTCCAGCAGTCCTTTTGCAC	CAGGCTGCCCTTTGATGA	NM_001300734.1
<i>FAS (CD95)</i>	GTGACCCTTGCACCAAATGT	AGACAAAGCCACCCCAAGTT	NM_152872
<i>GAPDH</i>	ACGGATTGGTTCGTATTGGGCG	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	NM_002046.5
<i>MDM2</i>	GGTGCTGTAACCACCTCACA	TGCCCAAGAAGTCTCTTTCA	NM_006880
<i>MDM4</i>	GGTGCGCAAGGTGAAATGTT	GAGAGGGCTTGGGTCTTTCA	NM_001278516.1
<i>RRM2B</i>	TGCTGTCTAGTTGGAGGTG	ATGATCTCTCATCCTGATCCAGC	NM_015713
<i>TNFRSF10B</i>	GTCCACAAAGAATCAGGCATCA	CCAGGTCGTTGTGAGCTTCT	NM_147187.2

2.1.8. Puffer und Lösungen

Puffer	Molarität	Einwaage	Chemikalien
<u>Asparagin-Arginin-Lösung</u>		1,3 g 5,8 g Ad 1 l	Asparagin Arginin Aqua dest.
		24 Stunden rühren und steril filtrieren	
<u>Hypotonischer PI-Lyse-Puffer</u>		0,2 g 10 mg 2 ml ad 198 ml	Tri-NaCitrat-2-Hydrat Propidiumiodid Triton-X-100 Aqua dest.
<u>Lysepuffer H</u>	pH 7,5 30 mM 150 mM	1% (v/v) 10% (v/v) ad 50 ml	Tris/HCl NaCl Triton-X-100 Glycerin Aqua dest.
<u>Lämmli-Puffer</u>	187 mM 150 mM	5% (w/v) 10% (v/v) 0,03% (w/v)	Tris HCl SDS Glycerol DTT Bromphenolblau
<u>SDS-Laufpuffer</u>		20 g 60 g 288 g ad 2 l	SDS Tris Glycin Aqua dest.
<u>Sammelgelpuffer</u>	pH 6,8 0,5 M	0,4% (w/v)	Tris/HCl SDS
<u>TAE-Puffer (10x)</u>		242 g 57,1 ml 100 ml Ad 1l	Tris Eisessig (100%) EDTA (0,5 M) Aqua dest.

<u>TBS (10x)</u>	pH 7,6		48,4 g 160 g ad 2 l 400 ml	Tris Base NaCl Aqua dest Methanol
<u>Trenngelpuffer</u>	pH 8,8	1,5 M	0,4 % (w/v)	Tris/HCl SDS

2.1.9. *Small Molecules* und Inhibitoren

2.1.9.1. Zelltod-Aktivatoren

Tabelle 4: Zelltod-Aktivatoren und ihre molekulare Masse.

Substanz	Molekulare Masse	Nr.
LBPS01	411,1 g/mol	1
LBPS03	475,96 g/mol	2
LBPS05	509,83 g/mol	3
AT406	561,71 g/mol	
Birinapant	806,94 g/mol	
GDC-0152	498,64 g/mol	

Für die drei Ausgangssubstanzen sowie die Strukturderivate, konnte bereits eine Struktur-Wirkungs-Beziehung in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden (CAROSATI et al., 2015). In der nachfolgenden Tabelle werden die gut wirksamen Strukturderivate mit ihren entsprechenden Molekulargewichten und der entsprechenden Nummerierung aus der Veröffentlichung aufgelistet. Als kommerziell erwerbliche Smac-Mimetika wurden die Substanzen AT406, Birinapant und GCD-0152 verwendet (CAI et al., 2011; KREPLER et al., 2013; ALLENSWORTH et al., 2013; FLYGARE et al., 2012), die von der Firma Selleckchem (San Diego) bezogen wurden.

Tabelle 5: Strukturelle Derivate der Ausgangssubstanzen.

Strukturderivate der Ausgangssubstanzen								
LBPS01			LBPS03			LBPS05		
	Nr.	M (g/mol)		Nr.	M (g/mol)	Nr.	M (g/mol)	
LBPS38	12	394,14	LBPS43	18	459,97	LBPS56	29	509,83
LBPS39	11	393,14	LBPS44	21	489,99	LBPS57	27	462,4
LBPS40	10	468,05	LBPS46	19	494,41	LBPS58	28	506,45
			LBPS47	15	485,13			
			LBPS49	17	447,04			

2.1.9.2. Apoptose- und Nekroptoseinhibitoren

Zur genauen Untersuchung der beteiligten Signalwege, die durch die Substanzen LBPS03 und LBPS05 induziert wurden, werden spezifische Inhibitoren verschiedener Zelltodsignalwege verwendet. Das Peptid Z-VAD-FMK ist ein pan-selektiver Caspaseinhibitor und kann

irreversibel an Caspasen binden und die Apoptose unterdrücken. Die beiden *Small Molecules* Necrostatin-1 (Nec-1) und Necrosulfonamide (NSA) werden als Hemmer des Nekroptose-signalweges eingesetzt. Necrostatin-1 ist in der Lage, RIP1 zu inhibieren, Necrosulfonamide dagegen hemmt die Phosphorylierung von MLKL und verhindert ebenfalls die Aktivierung des nekroptotischen Zelltods.

Tabelle 6: Verwendete molekulare Inhibitoren.

Inhibitoren	Firma	Molare Masse
Pan-Caspase-Inhibitor		
Z-VAD-FMK	R&D Systems, Minneapolis	467,5 g/mol
Inhibitor der Apoptose		
Necrosulfonamide (NSA)		
	Calbiochem San Diego	461,5 g/mol
Inhibitor der Nekroptose		
Necrostatin-1 (Nec-1)	Calbiochem San Diego	259.3 g/mol
Inhibitor der Nekroptose		

2.1.10. Zelllinien

Die klarzellige Nierenzellkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 und die nicht-tumoröse Zelllinie n.N.1860 wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliert und aus dem Gewebe von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom isoliert. Die Zelllinie ClearCa-2 wurde aus dem tumorösen Teil der Niere entfernt, wohingegen die Zelllinie n.N.1860 aus gesundem Nierenepithelgewebe besteht. Die Linie n.N.1860 stellt das „gesunde“ Pendant zu der Zelllinie ClearCa-21 dar.

2.1.11. Software und Webtools

Software	Webtools
<ul style="list-style-type: none"> • FlowJo • Citavi 5 • AxioVision Microscope Software • GraphPadPrism 5.0 • Microsoft Excel, Word, Powerpoint Vers. 2007/10 • LI-COR Image Studio 3.1 	<ul style="list-style-type: none"> • DAVID Bioinformatics Resources 6.7 • NCBI – National Center of Biotechnology Information

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kulturbedingungen

Die beiden verwendeten adhärennten Zelllinien ClearCa-2 und n.N.1860 wurden in DMEM-Medium (10% FCS) bei einer Temperatur von 37 °C und unter einer 5% CO₂-Atmosphäre in 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium setzt sich zusammen aus 500 ml DMEM, 5 ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin und 5 ml L-Asparagin/L-Arginin-Lösung. Das 2%-ige FCS-Medium wurde zusätzlich mit 10 ml FCS versetzt, das 10%-ige FCS-Medium mit 50 ml FCS. Zur Kultivierung wurden die Zellen der Linie ClearCa-2 entsprechend der Wachstums-kinetik passagiert und in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch eine Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Um die Reaktion abzustoppen, musste mindestens das gleiche Volumen Medium zu der Trypsin/EDTA-Lösung gegeben werden. FCS-reiches Medium wurde in eine neue Kulturflasche vorgelegt und ein Teil der Zellen in dieser kultiviert. Nach gleichem Prinzip wurden auch die Zellen der Linie n.N.1860 kultiviert. Durch ihre sehr langsame Wachstumsrate wurde zweimal pro Woche das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und frisches Medium in die Kulturflasche gegeben.

2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Bio-Rad CellCounter

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen wurden diese, wie oben beschrieben, von dem Kulturflaschenboden abtrypsinisiert und die Reaktion mit Medium abgestoppt. Aus der Zellsuspension wurden 10 µl mit gleichem Volumen Tryphanblaulösung (0,4%) versetzt und in die Vertiefung des Objektträgers der Bio-Rad Cell Counter Zellkammer pipettiert. Das Counter Slide wurde in den Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, Hercules) eingeführt und die Zellzahlbestimmung erfolgte automatisiert.

2.2.2. Induktion des Zelltodes

Zur Behandlung von ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen wurden diese in einer definierten Zelldichte, die sich sowohl an der Inkubationsdauer als auch an der Nachweismethode orientierte, ausplattiert. Die Zellen wurden in 10%-reichem FCS-Medium ausgesät und über 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C, in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre und bei 95%

Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Beginn der Behandlung wurde das Medium von dem Zellrasen entfernt und die Substanzen in ihrer finalen Konzentration in 2% FCS-reduziertem Medium auf den Zellrasen pipettiert. Die Inkubationsdauer variierte zwischen 6 bis 96 Stunden. Für Untersuchungen der Wirksamkeit der Substanzen auf das Zellproliferationsverhalten der ClearCa-2-Zellen wurde die Substanz nach einer bestimmten Behandlungsdauer entfernt, der Zellrasen mit 100 µl PBS gewaschen und die Zellen erneut in 10%-igem FCS-Medium kultiviert.

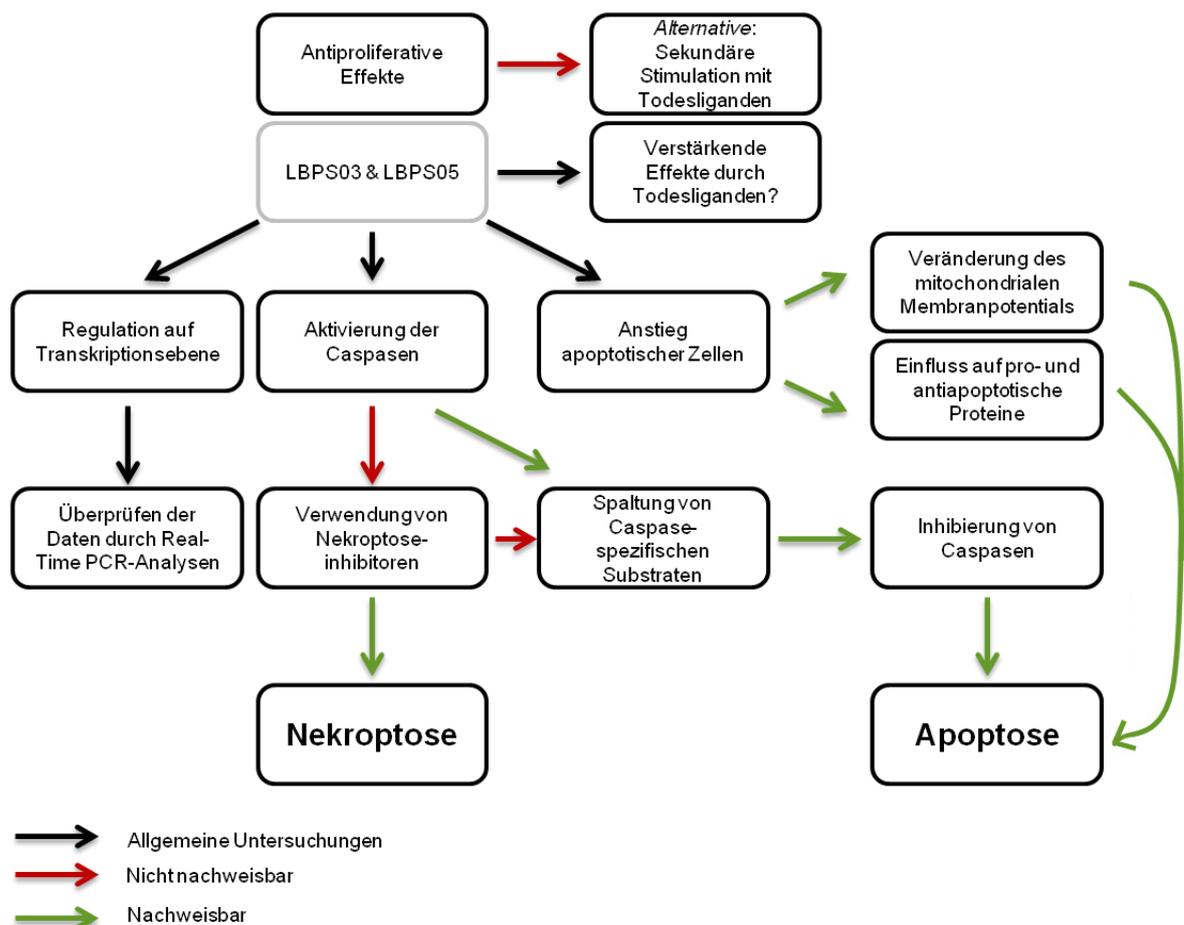


Abbildung 7: Arbeitsablauf zur Identifikation der Signalwege, die durch LBPS03 und LBPS05 aktiviert werden. Nachdem für die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 antiproliferative Effekte nachgewiesen werden konnten, wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um die beeinflussten Signalwege zu identifizieren. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, ob ein Ereignis nachweisbar (grüne Pfeil) beziehungsweise nicht nachweisbar (roter Pfeil) war, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

2.2.3. Quantifizierung des Zelltodes

2.2.3.1. Proliferationsassay durch Bestimmung der Lebendzellzahl mittels DRAQ5®

DRAQ5® ist ein Zell-permeabler DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der zum Färben von lebenden Zellen verwendet werden kann. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl mittels DRAQ5® wurden Zellen der Linie ClearCa-2 und n.N.1860 in definierten Zelldichten entsprechend der Inkubationsdauer in einer 96-Well-Platte ausplattiert und über 24 Stunden in 10% FCS-reichem Medium im Brutschrank kultiviert. Im Folgenden wurden die Zellen über 24 Stunden bis 96 Stunden mit potentiellen Zelltod-induzierenden Substanzen in 2% FCS-reduziertem Medium behandelt. Zum Färben der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit 100 µl PBS gewaschen. Das PBS wurde sofort verworfen und die Zellen mit 50 µl des DRAQ5®-Farbstoffes (10 µM) gefärbt. Nach einer Inkubationsdauer von 20 Minuten im Dunklen konnte das Färbereagenz entfernt werden. Die Visualisierung der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe des LI-COR Odyssey Reader. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität wurde über das generierte Bild ein 96-Well-Gitter gelegt, das die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Wells ermittelt. Aus den Replikaten eines Versuches wurde der Mittelwert bestimmt. Jeder Versuch wurde mit sechs Replikaten pro 96-Well-Platte durchgeführt. Von diesen Mittelwerten wurde die Eigenfluoreszenz der Wellplatte abgezogen und die Mittelwerte der behandelten Zellen auf die der Kontrolle bezogen.

2.2.4. Durchflusszytometrische Analysen

2.2.4.1. Intrazelluläres Caspase-Aktivitätsassay

Die Aktivierung von Caspasen spielt in der Apoptose eine entscheidende Rolle. Die Caspase Staining Kits von PromoKine wurden verwendet, um in lebenden Zellen aktivierte Caspasen nachzuweisen. Das System verwendet spezifische Caspasesubstrate, die zum einen Zell-permeabel, nicht toxisch, höchst sensitiv und irreversibel an aktivierte Caspasen binden können. Die Caspaseinhibitoren sind entweder an den Fluoreszenzfarbstoff FITC oder an Sulfo-Rhodamine gekoppelt. Aktivierte Caspasen spalten das Substrat, sodass der Fluoreszenzfarbstoff frei wird und bei einer entsprechenden Wellenlänge mittels durchflusszytometrischer Analyse im FL-1 (FITC) oder FL-2 (Sulfo-Rhodamin) detektiert werden kann.

Caspasen	Caspase-Inhibitor
Caspase-2	VDVAD-FMK
Caspase-3	DEVD-FMK
Caspase-8	IETD-FMK
Caspase-9	LEHD-FMK

Zur Bestimmung der Caspase-aktivierenden Effekte der neuartigen Zelltod-aktivierenden Substanzen wurden Zellen der Linie ClearCa-2 in einer Zelldichte von 3.000 Zellen/cm² bis 4.500 Zellen/cm² in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen mit definierten Substanzkonzentrationen in 2% FCS-reduziertem Medium behandelt. Nach einer Behandlungsdauer von 48 bis 72 Stunden wurde das Medium von dem Zellrasen entfernt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Zellrasen wurde mit 1 ml PBS gewaschen und das PBS ebenfalls im Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden durch 500 µl einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Wellboden abgelöst. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl FCS-reichen Mediums. Die abgelösten Zellen wurden in das Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 120 µl 10% FCS-reiches Medium, versetzt mit Caspaseinhibitoren, resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Substanz	Pro Probe
Medium (10% FCS)	120 µl
FITC-Caspaseinhibitor	0,4 µl
Sulfo-Rhodamine-Caspaseinhibitor	0,4 µl

Die Zellen wurden zusammen mit dem Caspaseinhibitor mit geöffnetem Deckel für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationsdauer wurden die Zellen bei 100 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 µl Wash Buffer gewaschen. Erneut wurde bei 100 g für 3 Minuten zentrifugiert und der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml Wash Buffer aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Eisbad gehalten. Die Bestimmung der Aktivierung von Caspasen in lebenden Zellen wurde am Durchflusszytometer durchgeführt.

2.2.4.2. Mitochondriale Membranpotentialänderung

Durch die Aktivierung des intrinsischen Signalweges der Apoptose wird das mitochondriale Transmembranpotential verändert und kann über Fluoreszenzmikroskopie sowie durchflusszytometrische Analysen visualisiert beziehungsweise quantifiziert werden. Der

Fluoreszenzfarbstoff MitoCapture der Firma PromoKine besitzt die Eigenschaft, in gesunden Zellen im Zytoplasma grün zu fluoreszieren sowie in gesunden Mitochondrien ein leuchtend rotes Fluoreszenzsignal zu emittieren. Durch die Veränderung des Membranpotentials der Mitochondrien infolge eines Apoptosestimulus wird dieses gestört, sodass sich der Farbstoff MitoCapture nicht mehr in den Mitochondrien akkumulieren kann und nur noch als leuchtend grüner Farbstoff im Zytoplasma der Zellen zu detektieren ist.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Zellen in einer Dichte von 3.000 Zellen/cm² über 24 Stunden in einer 6-Well Platte in 10%-FCS-reichem Medium inkubiert und im Folgenden mit LBPS03 oder LBPS05 in einer Konzentration von 10 µM in 2%-FCS reduziertem Medium über 72 Stunden behandelt. Der Überstand sowie die trypsinierten Zellen wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml vorgewärmtem Inkubationbuffer, versetzt mit 1 µl MitoCapture, aufgenommen und für 20 Minuten im Brutschrank mit geöffnetem Deckel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 g erneut für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml vorgewärmtem Inkubationspuffer resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im FL-1 sowie im FL-2 Kanal des Durchflusszytometers.

2.2.4.3. Propidium-Iodid-Färbung

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist die Fragmentierung der DNA. Durch eine Propidium-Iodid-Färbung nach RICCARDI UND NICOLETTI (2006) kann der DNA-Gehalt einer Zelle mit Hilfe von durchflusszytometrischer Analyse bestimmt werden. Zellen, die der Apoptose unterliegen, sind durch eine degradierte DNA gekennzeichnet und weisen einen erhöhten Anteil an fragmentierter DNA in der Sub-G1-Phase auf. Diese Phase tritt im Histogramm von durchflusszytometrischen Analysen links neben der G1-Phase, die einen einfachen DNA-Gehalt widerspiegelt, auf. Rechts neben der G1-Phase folgen die S-Phase, die zur Replikation der DNA dient, sowie die G2-Phase, in der die Zellen auf die Mitose vorbereitet werden. Zur Detektierung wurde ein Phosphat-Zitrat-Puffer verwendet, der mit Propidium-Iodid einen quantitativen DNA-bindenden Farbstoff beinhaltet. Apoptotische Zellen, die einen Verlust ihres DNA-Gehaltes aufwiesen, zeigten eine verminderte Aufnahme des Farbstoffes und erschienen links neben dem G1-Peak im Histogramm (RICCARDI & NICOLETTI, 2006).

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen mittels PI-Färbung wurden 3.000 Zellen/cm² bis 4.500 Zellen/cm² in einer 12-Well-Platte für 24 Stunden in 10% FCS-Medium inkubiert. Zu Beginn der Behandlung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2% FCS-armem Medium, versetzt mit Zelltod-Induktoren beziehungsweise Signalweg-Inhibitoren, über einen Zeitraum von 48 bis 72 Stunden behandelt. Nach beendeter Behandlungsdauer wurde das Medium in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Zellrasen mit 300 µl PBS gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls kollektiert und die Zellen mit 300 µl einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Abgestoppt wurde dieser Vorgang durch die Zugabe von 300 µl Medium (10% FCS). Die Zellsuspension wurde ebenfalls in das 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl hypotonischem Propidiumiodid-Lysepuffer resuspendiert. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubationsdauer im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit 800 µl Aqua dest. aufgefüllt und der DNA-Gehalt über durchflusszytometrische Analyse im FL2- oder FL3-Kanal bestimmt.

2.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.2.5.1. Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials

Neben der Möglichkeit, die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials über durchflusszytometrische Analyse zu bestimmen, wie in 2.2.4.2. beschrieben, kann die Änderung des Membranpotentials auch über Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 6.000 Zellen/cm² in einer mit einem Deckgläschen ausgelegten 6-Well-Platte ausplattiert und über 24 Stunden in 10% FCS-reichem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in LBPS03 und LBPS05 bei einer Substanzkonzentration von 10 µM über 48 Stunden behandelt. Nach erfolgreicher Behandlungsdauer wurde der Überstand verworfen und der Zellrasen mit 200 µl des vorgewärmten Inkubationspuffers, versetzt mit 0,2 µl MitoCapture-Reagenz, für 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reagenz verworfen und die Zellen mit 500 µl vorgewärmtem Inkubationspuffer gewaschen. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen eines DAPI-haltigen Eindeckelmediums verwendet und das Deckglas mit der Seite der Zellen auf dieses gelegt. Die Visualisierung der Färbung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Mit Hilfe der Mikroskop-Software AxioVision konnten die Bilder generiert werden.

2.2.5.2. Annexin-V/PE-Färbung

Apoptotische Zellen können leicht durch eine Annexin-V-Färbung nachgewiesen werden. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Phospholipidprotein, welches mit einer sehr hohen Affinität an Phosphatidylserine binden kann. Phosphatidylserine werden in Folge eines Apoptosestimulus von der Innenseite der Zelloberfläche nach außen verlagert, die von Phagozyten erkannt werden und apoptotische Zellen eliminieren. Mit Hilfe des Apoptosis/Necrosis/Healthy Cells Staining Kit von PromoKine kann die Externalisierung von Phosphatidylserinen sichtbar gemacht werden, indem das FITC-gekoppelte Annexin V an Phosphatidylserine bindet und ein leuchtend grünes Signal an der Membran der apoptotischen Zellen ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 492/514 \text{ nm}$) emittiert. In nekrotischen Zellen dagegen besteht eine zelluläre Instabilität, in der sowohl die Integrität der Plasmamembran sowie der Organellen gestört beziehungsweise vollständig aufgehoben ist. In toten oder nekrotischen Zellen, nicht aber in gesunden oder apoptotischen Zellen, kann Ethidium-Homodimer III (EthD-III) eindringen, in der DNA interkalieren und ein starkes rotes Fluoreszenzsignal induzieren, welches bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 528/617 \text{ nm}$ gemessen werden kann. Hoechst 33342 wird als membranpermeabler Farbstoff eingesetzt, der die DNA der gesamten Zellpopulation blau färbt. Hoechst bindet an doppelsträngige DNA-Moleküle und fluoresziert bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 350/461 \text{ nm}$. Für die Annexin-V-Färbung wurden Zellen in einer Dichte von 6.000 Zellen/cm² ausplattiert und in 10% FCS-reichem Medium über 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LBPS03 oder LBPS05 in einer Konzentration von 10 µM bei 37 °C in FCS-reduziertem Medium inkubiert. Nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden wurde der Überstand entfernt und der Zellrasen mit 500 µl Binding-Buffer (1x) gewaschen. Der Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Zellen mit 200 µl eines Annexin-FITC/EthD-III/Hoechst-Mix über 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

Substanz	Pro Probe
Binding Buffer (1x)	200 µl
FITC-Annexin	20 µl
Ethidium Homodimer III (EthD-III)	10 µl
Hoechst33342	10 µl

Die Färbelösung wurde verworfen und die Zellen weitere zwei Mal mit 500 µl des Binding Buffers (1x) gewaschen. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen des ProLong[®] Gold antifade Reagenz pipettiert und das Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten aufgelegt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte ebenfalls am Fluoreszenzmikroskop. Die Bilder wurden mit der AxioVision-Software generiert.

2.2.6. Western-Blot-Analysen

2.2.6.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Proteingewinnung aus Gesamtzellextrakten wurden Zellen in einer Dichte von 4.500 Zellen/cm² für eine Behandlungsdauer von 48 Stunden ausplattiert und für eine Inkubation von 24 Stunden wurden Zellen in einer Dichte von 6.000 Zellen/cm² in einer T25-Kulturflasche (25 cm²) ausgesät. Zunächst wurden die Zellen über 24 Stunden im Brutschrank unter normalen Kultivierungsbedingungen inkubiert, bevor die Behandlung mit den Zelltod-Aktivatoren erfolgte. Das Medium wurde vollständig aus der Zellkulturflasche entfernt, der Zellrasen mit dem Zelltod-Induktoren-versetzten Medium (2% FCS) bedeckt und im Brutschrank für weitere 24 bis 48 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Behandlungsdauer wurde das Medium in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls im Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturflaschenboden abgelöst. Diese Reaktion wurde mit 1 ml Medium (10%) abgestoppt und die Zellen ins Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 400 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Erneut folgte ein Zentrifugierungsschritt, bei dem die Zellen für 5 Minuten bei 4 °C und 400 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt. Das PBS wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 25 µl Lysepuffer H resuspendiert. Für eine Inkubationsdauer von 20 Minuten wurde das Zellpellet, versetzt mit Lysepuffer, im Eisbad inkubiert und gelegentlich gevortext, sodass die Zellmembran permeabilisierte. Anschließend wurde bei einer Temperatur von 4 °C bei 14.000 g für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand (Gesamtproteinlysat) in ein frisches 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976). Bei diesem Proteinnachweisverfahren bindet der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G 250 an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen und verursacht eine deutliche Blaufärbung. Diese Verschiebung im Absorptionsspektrum ist im Bereich zwischen 365 nm und 595 nm zu messen. Das Lambert-Beersche-Gesetz wurde zur Absorptionsmessung angewendet. Als Referenzdaten wurde eine Standardkurve aus BSA (1µg/µl) verwendet. Für diese Eichkurve wurde 1 µl bis 10 µl der BSA-Stocklösung in 1 ml des

Bradfordreagenz eingesetzt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde 1 µl des Gesamtproteinlysats in 1 ml Bradfordreagenz pipettiert und die Absorption ermittelt. Der gemessene Wert konnte in die Standardkurve eingesetzt werden, sodass die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden konnte. Zur Vorbereitung für das SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proben mit einer Proteinmenge von 20 µg bis 70 µg des Gesamtproteinlysats vorgelegt, mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Auf ein 8- bis 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurden 20 µg bis 70 µg Gesamtproteinlysats, in einem Volumen zwischen 20 µl und 25 µl, aufgetragen. Zum Auftrennen der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht wurde das Gelelektrophoresesystem „Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell“ von Bio-Rad verwendet. Als Größenstandard wurden 4 µl des „Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder“ von Thermo Scientific auf das Gel aufgetragen. Im SDS-Laufpuffer wurden die Proteine bei einem konstanten Widerstand von 30 mA aufgetrennt.

2.2.6.4. Transfer

Zum Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die beide zu den gleichen Resultaten führten. Zum einen wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System für das Semi-Dry-Verfahren angewandt, zum anderen wurde die Mini-PROTEAN®-Tetra-Vertical-Electrophoresis-Kammer für das Tank-Blot-Verfahren eingesetzt. Für beide Methoden musste die SDS-Page für eine Viertelstunde im Transferpuffer äquilibriert werden. Die Membran wurde ebenfalls für 5 Minuten im Transferpuffer inkubiert.

Semi-Dry-Blot-Verfahren

Der Semi-Dry-Blot ist eine Methode, bei der das SDS-Acrylamidgel zwischen zwei Elektroden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wird. Der Semi-Dry-Blot hat den Vorteil, dass der Transfer gleichmäßig über das gesamte Gel verläuft und nur eine geringe Menge Pufferlösung eingesetzt werden muss. Für das Semi-Dry-Blot-Verfahren wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von Bio-Rad verwendet. Die Anode sowie die Kathode wurden mit Transferpuffer befeuchtet und fünf Whatman-Papiere wurden auf die Anodenseite

platziert. Auf die Whatman-Filterpapiere der Anode wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und anschließend das SDS-Acrylamidgel positioniert. Den Abschluss bildeten wieder fünf Whatman-Filterpapiere. Mit der Kathode, welche als Deckel den Abschluss des Systems bildete, wurde die Kassette verschlossen. Die Kassette wurde in die Vorrichtung des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems eingeführt. Der Transfer der Proteine von der SDS-Page auf die Nitrozellulosemembran erfolgte innerhalb von 40 Minuten bei einem Widerstand von 0,5 A und einer elektrischen Spannung von 25 V.

Tank-Blot-Verfahren

Die Tank-Blot-Methode benötigt im Gegensatz zum Semi-Dry-Blotting eine große Menge Puffer. Eine Art Sandwich-Vorrichtung ermöglicht den vertikalen Transfer der Proteine von einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran. In der Sandwich-Vorrichtung der Bio-Rad-Elektrophoresekammer für das Tank-Blot-Verfahren wurde zunächst auf einer Seite ein befeuchtetes Schwämmchen platziert, gefolgt von zwei Whatman-Filterpapieren. Auf die Filterpapiere folgten die Nitrozellulosemembran und die SDS-Page. Zwei angefeuchtete Filterpapiere wurden auf das Polyacrylamidgel gelegt. Zum Abschluss wurde ein zweites befeuchtetes Schwämmchen aufgelegt und das Sandwich vorsichtig verschlossen. Dieses Sandwich wurde in die Tank-Blot-Vorrichtung der Bio-Rad-Elektrophoresekammer eingeführt und die Kammer bis zum Rand mit Transferpuffer aufgefüllt. Bei einer konstanten elektrischen Spannung von 90 Volt wurden die Proteine über 90 Minuten auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Nach Beendigung beider Transferverfahren wurde die Membran aus den jeweiligen Vorrichtungen entfernt und 5 Minuten mit TBS gewaschen. Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers wurden die Membranen fünf Minuten mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S ist ein roter, reversibel bindender Azofarbstoff, mit dem positiv geladene Aminogruppen der Proteine auf der Nitrozellulosemembran interagieren können. Durch Waschen mit TBS konnte die Färbung wieder rückgängig gemacht werden.

2.2.6.5. Quantitative Western-Blot-Analyse

Mit den Infrarot-fluoreszierenden Sekundärantikörpern der Firma LI-COR können Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mittels Infrarot-Imager detektiert werden. Die Visualisierung erfolgt am LI-COR Odyssey Imager. Die Sekundärantikörper sind sehr sensitiv und ihre Infrarot-Fluoreszenzsignale stehen im Verhältnis zu der Menge der

Antigene, die auf der Membran gebunden sind. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, musste die Membran zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenkschüttler mit einer Blockinglösung inkubiert werden. Anschließend folgte ein 5-minütiger Waschschriff mit TBS, um Milchpulverreste von der Membran zu entfernen. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C auf einem Schwenkschüttler mit dem Primärantikörper in 4 ml Blockingpuffer inkubiert. Nach der abgeschlossenen Inkubationsdauer wurde die Membran drei Mal mit 10 ml TBS für 5 Minuten gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 5 Minuten mit 10 ml TBS gewaschen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des LI-COR Odyssey Readers. Zur Quantifizierung der Banden wurde das Programm LI-COR Image Studio verwendet. Die Proteinexpression wurde in allen Versuchen relativ zu einer Ladungskontrolle (GAPDH oder α -Tubulin) ausgewertet und bezieht sich auf die Proteinexpression der kontrollbehandelten Zelle.

2.2.7. Proteome Profiler™ Antibody Array

Für das Human Ubiquitin Array sowie das Apoptosis Antibody Array Kit der Firma R&D Systems wurden Zellen der Linie ClearCa-2 in einer Zelldichte von 4.500 Zellen/cm² in einer T175-Zellkulturflasche, in 10% FCS-reichem Medium, ausplattiert und über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für das Human Ubiquitin Array wurden die Zellen mit LBPS03 und LBPS05 in einer Konzentration von 30 μ M behandelt, da degradierende Effekte auf ausgewählte Proteine erst in höheren Konzentrationen nachweisbar waren. Für das Apoptosis Antibody Array Kit dagegen wurde eine Konzentration von 10 μ M gewählt, da auf funktioneller Ebene bereits eine Konzentration von 10 μ M die Caspasen aktivierte. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,1% DMSO verwendet. Nach der Behandlungsdauer von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Diese Reaktion wurde mit der Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt und die Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 400 g für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert, in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Erneut wurden die Zellen bei 400 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschriff wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das Zellpellet wurde in 150 μ l Lysisbuffer 6 resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 14.000 g bei 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe von Bradford bestimmt. Für das Proteome Profiler Antibody Array wurden 250 µg Protein mit Array Buffer 1 in ein Gesamtvolumen von 1,5 ml verdünnt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, musste die Membran zunächst mit 2 ml Array Buffer 1 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Der Array Buffer 1 wurde vollständig von der Membran entfernt und die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenkschüttler mit der verdünnten Proteinprobe inkubiert. Die Membran wurde nach der Über-Nacht-Inkubation aus dem Wells entfernt, in separate Schälchen platziert und drei Mal für 10 Minuten mit dem Wash Buffer (1x) gewaschen. Für jedes Array wurden 15 µl des Detection Antibodys in 1,5 ml Array Buffer 2 vorgelegt und die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder in separate Waschbehältnisse überführt und erneut drei Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wurde mit dem Sekundärantikörper Goat-Anti-Streptavidin 800CW, in einer Verdünnung von 1:5.000, in Array Buffer 2 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal 10 Minuten mit Wash Buffer (1x) gewaschen und bei einer Intensität von 8,0 am LI-COR Odyssey Reader gescannt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Image Studio, indem zunächst der Mittelwert aus den beiden Duplikaten eines Antikörpers bestimmt wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch die Bestimmung eines Quotienten, indem der Mittelwert des Zielproteins durch den Mittelwert des Referenzproteins dividiert wurde. Anschließend wurde die relative Proteinexpression berechnet, indem die Ratio zwischen behandelter und unbehandelter Probe ermittelt wurde.

2.2.8. Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Das RNeasy Mini Kit von Qiagen wurde zur Isolierung von Gesamt-RNA aus ClearCa-2-Zellen verwendet. Unter stark denaturierenden Bedingungen wurde die Probe lysiert und homogenisiert. Im weiteren Verlauf wurde die Gesamt-RNA verwendet, um ein Affymetrix „Whole-Transcript Expression Profiling“ durchzuführen sowie die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse über Real-Time PCR zu verifizieren. Dabei sollten die Expressionslevel von ClearCa-2-Zellen im behandelten und unbehandelten Zustand verglichen werden.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden 6.000 Zellen/cm² in einer T75-Zellkulturflasche in 10% FCS-reichem Medium ausplattiert und über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die

Behandlung der Zellen erfolgte mit LBPS03 und LBPS05 in einer Konzentration von 10 μM sowie einer Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO). Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 ml Medium (10% FCS) gestoppt und die Zellen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei einer Geschwindigkeit von 300 g bei Raumtemperatur für 5 Minuten pelletiert und das Zellpellet in 5 ml PBS aufgenommen. Eine Zellzahlbestimmung ist notwendig, um die Zellen in einer entsprechenden Menge RLT-Puffer zu resuspendieren.

Bei einer Zellzahl unterhalb von 1×10^7 Zellen wurde das Pellet in 350 μl RLT-Puffer (mit 1% β -Mercapthoethanol) aufgenommen und gevortext. Die Homogenisierung des Lysats erfolgte mit Hilfe der QIAshredder spin column. Die Säule des QIAshredders wurde in eine Kollektionstube eingesetzt und das Lysat auf die Säule pipettiert. Bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Lysat für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 350 μl Ethanol (70%) versetzt und durch Pipettieren gut vermischt. Das vollständige Probenvolumen wurde in eine RNeasy Mini Speed Column überführt und für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 350 μl RW1-Puffer gewaschen. Erneut wurde bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Um eine Kontamination mit DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durch das RNase-free DNase Kit (Qiagen) auf der Säule durchgeführt. Die lyophilisierte DNaseI wurde zunächst in 550 μl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Je Probe wurde ein Mix von 70 μl RDD-Puffer versetzt mit 10 μl der DNaseI-Lösung vorbereitet und auf die Membran der Säule pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 350 μl des RW1-Puffers auf die Säule gegeben und bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 μl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugierungsschritt von 15 Sekunden bei 8.000 g. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Säule diesmal für eine Minute zentrifugiert. Um Ethanolreste von der Membran zu entfernen, wurde die Säule in eine frische Collection Tube überführt und bei höchster Geschwindigkeit für eine Minute trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA zu eluieren, wurden 30 μl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und bei 8.000 g eine Minute zentrifugiert. Die Ausbeute der RNA-Menge wurde am Photometer bestimmt.

2.2.8.2. Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA-Konzentration der Proben wurde zunächst photometrisch mit Hilfe des Eppendorf Photometer μ Cuvette G1.0 von Eppendorf bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine). Bei 260 nm ist die optische Dichte der Nukleinsäuren ein Maß für die Konzentration. Der Quotient des OD_{260}/OD_{280} -Wert der gemessenen Probe sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde ein denaturierendes RNA-Gel vorbereitet, um die Integrität intakter RNA durch den Nachweis von 18S und 28S rRNA nachzuweisen. Zur Qualitätskontrolle wurde ein 1,5% Agarosegel in TAE-Puffer vorbereitet. Hierfür wurde zunächst die Agarose in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die Agarose abgekühlt war, wurden 4 μ l Peq-Green auf 50 ml Agarose gegeben und das Gel in die Gelgießvorrichtung gegossen. Zwei Mikrogramm RNA der Proben wurden mit RNA-Ladepuffer (2x) versetzt und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Nach vollständigem Abkühlen des Agarosegels wurden ein DNA-Leiter von 1000 kb sowie die RNA-Proben aufgetragen. Die RNA wurde entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Als intakte Gesamt-RNA wurde diejenige identifiziert, die eine klare 18S und 28S rRNA-Bande zeigte. Die Visualisierung erfolgte an der Geldokumentationsanlage von PeqLab (VWR Chemicals, Darmstadt).

2.2.8.3. Affymetrix GeneChip® Human Transcriptom Array 2.0

Microarrays finden Verwendung, um Genexpressionsprofile zu erstellen. Die Affymetrix Genechip-Technologie zählt zu den am weitesten verbreiteten Microarray-Analysen und wird im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, die Veränderungen der Expressionsprofile in LBPS03- und LBPS05-stimulierten Zellen zu untersuchen. Das „GeneChip® Human Transcriptom Array 2.0“-Array wurde am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde die Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Versuchen in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt und durch das RNA 6000 Nano Chip Assay am BioAnalyzer 2100 (Agilent) auf ihre RNA-Integrität getestet. Das Genomics & Transcriptomic Labor des BMFZ führte das Affymetrix-Expressionsarray durch, bei dem mehr als 285.000 Full-length-Transkripte untersucht und mit Hilfe der Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software analysiert wurden. Das BMFZ stellte eine Liste mit Genen zusammen, die um den Faktor 1,5 rauf- beziehungsweise runterreguliert wurden. Diese Untersuchungen geben einen ersten Überblick über das Expressionsprofil einer Zelle unter dem Einfluss der neuartigen Zelltod-Aktivatoren.

2.2.8.4. cDNA-Synthese

Zur Verifizierung der Affymetrix-GeneChip[®]-Human-Transcriptom-Array-2.0-Daten wurden einige interessante Gene ausgewählt und mit Hilfe einer Real-Time PCR semiquantitativ bestimmt. Um eine Real-Time PCR durchzuführen, muss die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific verwendet. In dem Verfahren der reversen Transkription wird eine enzymatische Reaktion mRNA in einzelsträngige cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase umschrieben. Da cDNA deutlich stabiler ist als mRNA, kann dieses besser durch die DNA-Polymerase in einer PCR amplifiziert werden. Die Gesamt-RNA aus den Nierenkarzinom-Zellen der Linie ClearCa-2 im LBPS03 beziehungsweise LBPS05 und unbehandelten Zellen wurde in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden durch Random Hexamer Primer transkribiert. Random Hexamer Primer sind einzelsträngige unspezifische Hexanukleotide mit einer 5'- und 3'-Hydroxylgruppe und dienen der Synthese von unspezifischen DNA-Sequenzen. Folgende Komponenten wurden in der dargestellten Reihenfolge pipettiert.

Template RNA	Total RNA	1 µg
Primer	Random Hexamer Primer	1 µl
Wasser, Nuklease-frei		Auf 12 µl
Gesamtvolumen		12 µl

Um vorhandene Sekundärstrukturen und GC-reiche RNA-Templates zu eliminieren, wurde das Gemisch vorsichtig vermischt, zentrifugiert und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die folgenden Komponenten in angegebener Reihenfolge dazu pipettiert.

5x Reaction Buffer	4 µl	
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl	
10 mM dNTP Mix	2 µl	
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl	
Gesamtvolumen		20 µl

Die Probe wurde vorsichtig gemischt, zentrifugiert und für 5 Minuten bei 24 °C inkubiert. Es folgte ein Inkubationsschritt über 60 Minuten bei 42 °C. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Probe für 5 Minuten bei 70 °C erhitzt. Zur Verwendung der cDNA für die Real-Time PCR musste diese 1:5 in DEPC-H₂O verdünnt werden.

2.2.8.5. Semiquantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine quantitative Methode zur Amplifikation von DNA-Produkten in Echtzeit (*real time*). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I ist ein in doppelsträngiger DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff und wird zum Nachweis von Amplifikaten verwendet. Durch die Denaturierung der cDNA liegt das Molekül nur noch einzelsträngig vor, sodass kein Fluoreszenzfarbstoff binden kann. Durch die Anlagerung der Primer und die Elongation der PCR-Produkte können sich in den neu entstandenen Doppelsträngen Fluoreszenzmoleküle anlagern. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Menge der dsDNA, die durch die Amplifikation generiert wird. Die Schmelzkurvenanalyse wurde zur Bestimmung der Amplifikate genutzt.

Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte über den Ct-Wert (*cycle threshold*), welcher eine theoretische Größe angibt, die den Beginn der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation beschreibt. Ist das Zielprodukt bereits zu Beginn der Amplifikation höher, wird der Ct-Wert bereits zu einem früheren Zeitpunkt erreicht. Zur semiquantitativen Analyse der mRNA-Genexpression wurde der QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix verwendet.

QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (2x)	10 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
RNAse freies Wasser	4 µl
cDNA	4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der Mix wurde in eine iQ™ 96-Well-Semi-Skirted-PCR-Platte pipettiert und im folgenden PCR-Programm gestartet. Für jedes Gen, das nachgewiesen werden sollte, wurde ein Duplikat angefertigt.

Zyklusnummer	Temperatur	Dauer (Minuten)	Zyklusanzahl
Zyklus 1	95 °C	3:00	1x
Zyklus 2			
Schritt 1:	95 °C	0:20	40x
Schritt 2:	55 °C	0:20	
Schritt 3:	72 °C	0:20	
Zyklus 3	55 °C-98 °C	0:30	87x
	0,5 °C	∞	

Die relative Quantifizierung der Real-Time PCR wird nach LIVAK UND SCHMITTGEN (2001) durchgeführt, indem die Expression des Zielgenes mit einem nicht-regulierten Housekeeping-Gen, in diesem Fall GAPDH, normalisiert wird.

Die Expression kann mit Hilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Werts bestimmt werden. Zunächst einmal muss der ΔCt -Wert ermittelt werden, indem der Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des

Zielgenes subtrahiert wird. Anschließend wird von diesem ΔCt -Wert ein definierter Wert abgezogen (22). Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert beschreibt die relativen Expressionsunterschiede von Behandlungen zur Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, sodass sich die folgende Formel ergibt: $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

2.2.9. Signifikanzen

Die Signifikanzen wurden mit Hilfe der Student'schen t-Verteilung berechnet und bei p -Werten von $\leq 0,05$ mit [*], $p \leq 0,01$ mit [**] und $p \leq 0,001$ mit [***] gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Die Tatsache, dass XIAP entscheidend an der Resistenzvermittlung in Nierenzellkarzinomen beteiligt ist, macht eine Verwendung von neuen IAP-Inhibitoren sinnvoll. In eigenen Vorarbeiten konnte die gute Wirksamkeit neuer potentieller IAP-Antagonisten auf die TRAIL-resistente Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2, bereits nachgewiesen werden. Im Rahmen meiner Masterarbeit konnten 3 sehr wirksame Substanzen (LBPS01, LBPS03 und LBPS05) identifiziert werden. Die neuartigen Zelltod-Aktivatoren LBPS01 und LBPS03 zeigten Caspaseaktivierung und PARP-Spaltung, was auf eine Induktion des Apoptose-signalwegs hindeutete, wohingegen LBPS05 weder Caspase reaktivierte noch PARP spaltete (STEVENS et al., 2014). Erste Hinweise in Bezug auf die Regulation der IAPs konnten während der Masterarbeit gesammelt werden, indem alle drei Substanzen XIAP geringfügig degradierten, wohingegen die zellulären IAPs zum Teil stabilisiert beziehungsweise induziert werden konnten. Es bleibt zu klären: 1) Über welchen Zelltod-Signalweg Nierenkarzinom-Zellen durch die neuartigen Zelltod-Aktivatoren bevorzugt sterben und 2) welche Moleküle eine zentrale Rolle in der Zelltodmaschinerie spielen.

3.1. Neuartige Zelltod-Aktivatoren induzieren tumorspezifischen in Nierenkarzinomzellen den Zelltod

Um die Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren auf das Zellüberleben zu testen, wurden Proliferationsanalysen durchgeführt. Die neuen Substanzen wurden in einer Substanzkonzentration von 10 μ M über 96 Stunden auf klarzellige Nierenkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 und normale Nierenepithelzellen der Linie n.N.1860 appliziert. Das Zellüberleben wurde mittels DRAQ5-Proliferationsassay bestimmt, indem die Zellkerne der Zellen durch den Infrarot-fluoreszierenden Farbstoff DRAQ5 angefärbt und die Zelldichte mit Hilfe des Infrarot-Imagers bestimmt wurden. Das Balkendiagramm in Abb. 8 A zeigt die antiproliferativen Effekte der Substanzen LBPS01, LBPS03 und LBPS05 auf ClearCa-2-Zellen. Als stärkster Zelltod-Aktivator konnte die Substanz LBPS03 identifiziert werden. In ClearCa-2-Zellen bewirkte LBPS03 eine Reduktion des Zellüberlebens um $80,8 \pm 3,4\%$ im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen. Zugleich wurden nur marginale antiproliferative Effekte durch LBPS03 in normalen Nierenepithelzellen beobachtet. Für die beiden Substanzen LBPS01 und LBPS05 konnten ebenfalls wachstumshemmende Effekte in ClearCa-2-Zellen nachgewiesen werden. Das Zellüberleben wurde signifikant um

53,7±11,1% und 39,3±6,7% reduziert. Für beide Zelltod-Aktivatoren wurden auch hier nur sehr geringe Zelltod-induzierende Effekte in normalen Nierenepithelzellen beobachtet.

Das antiapoptotische Protein XIAP, welches in ClearCa-2 im Wesentlichen an einer Resistenzvermittlung gegenüber TRAIL-Induktion beteiligt ist, besitzt in ClearCa-2-Zellen eine Art Schalterfunktion für die Apoptose. Durch die Verwendung der Zelltod-Aktivatoren, die potentiell an die BIR3-Domäne von XIAP binden, soll dieser molekulare „Schalter“ zu Gunsten der Apoptose umgelegt werden, indem IAPs inhibiert werden. Als gegeben betrachtet werden muss dann das Vorhandensein dieser Zielstruktur in Tumorzellen, damit die Zelltod-Aktivatoren XIAP inhibieren und den Zelltod induzieren können. Angesichts dieser Hypothese wurden Western-Blot-Analysen zur XIAP-Basalexpression von ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen durchgeführt.

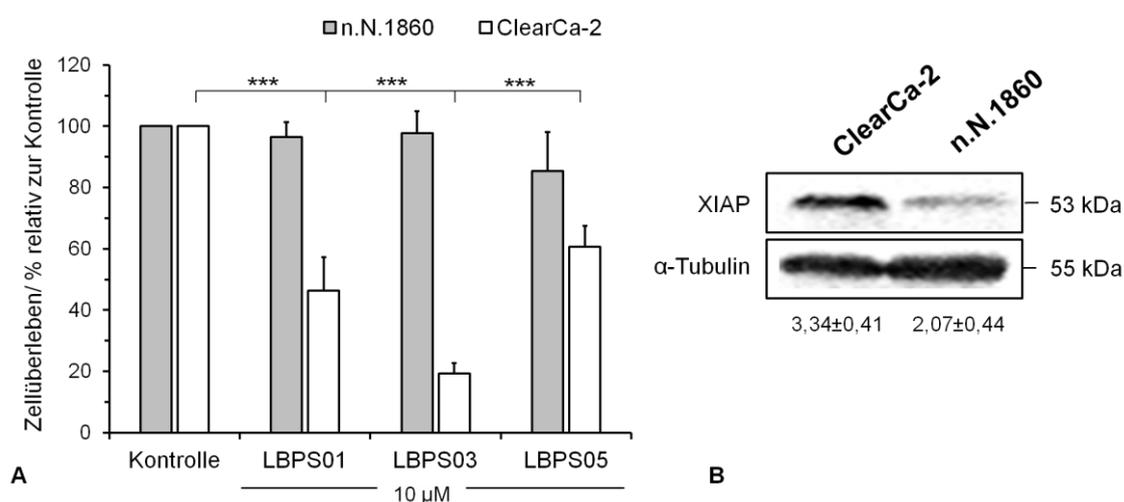


Abbildung 8: Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren auf die Zellproliferation in ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen und Western-Blot-Analysen zur XIAP-Basalexpression in den beiden Zelllinien.

A) Klarzellige Nierenzellkarzinom-Zellen der Linie ClearCa-2 und normale Nierenepithelzellen der Linie n.N.1860 wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden mit den Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05 in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Die Ergebnisse zum Zellüberleben der ClearCa-2 wurden im Rahmen meiner Masterarbeit generiert und zur Veranschaulichung dargestellt. Die Wirksamkeit der Substanzen auf die Linie n.N.1860 wurde in einem Versuchsdurchlauf ebenfalls während der Masterarbeit produziert. Zwei unabhängige Versuchsdurchläufe wurden im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt. Die Auswertung der Proliferationsanalyse erfolgte mit Hilfe des DRAQ5-Verfahrens. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. **B)** Western-Blot-Analysen zur Basalexpression von XIAP in ClearCa-2- und n.N.1860-Zellen. Auf einer 12%-igen SDS-PAGE wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. α-Tubulin wurde zur Quantifizierung der Proteinexpression verwendet. Die relative Expression der Zelllinie aus drei unabhängigen Versuchen wurde unter dem Blot aufgeführt (n=3).

Die Western-Blot-Untersuchungen in Abbildung 8 B zeigen repräsentativ, dass in ClearCa-2-Zellen das Protein XIAP um den Faktor 1,6 stärker exprimiert wurde als vergleichsweise in n.N.1860-Zellen. Unter Berücksichtigung der tumorselektiven Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren sowie des unterschiedlichen Expressionsverhaltens von XIAP in Tumorzellen und normalen Nierenzellen könnte die Annahme bestätigt werden, dass

das Zielprotein der IAP-Antagonisten in den Zellen vorhanden sein muss, damit der Zelltod induziert werden kann.

3.2. Erstellung von Struktur-Wirksamkeits-Beziehungen aufgrund der Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren und ihrer abgeleiteten Derivate

Die Untersuchungen von CAROSATI und Kollegen (2015) identifizierten 31 potentielle pan-IAP-BIR3-Antagonisten, von denen die drei Substanzen LBPS01, LBPS03 sowie LBPS05 gute antiproliferative Effekte auf Nierenkarzinomzellen sowie Leukämiezellen aufwiesen. Um in Zukunft die Suche nach weiteren Kandidaten effektiver zu gestalten, wurden in einem zweiten Screening weitere Kandidaten ausfindig gemacht, die strukturelle Derivate der drei Substanzen darstellen und Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichten. Für jeden der drei Kandidaten wurden neun strukturelle Derivate identifiziert und bereits im Rahmen meiner Masterarbeit in Hinsicht auf ihre antiproliferative Wirksamkeit getestet (Abb. 9; verändert nach CAROSATI et al., 2015).

Der linke Teil der Abbildung 9 zeigt die Proliferationsanalysen der drei wirksamen Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05 sowie der 27 neu identifizierten strukturellen Derivate in ClearCa-2-Zellen. Im rechten Teil sind die Strukturen der Substanzen hinsichtlich ihres chemischen Aufbaus und ihrer Wirksamkeit abgebildet (CAROSATI et al., 2015). In ClearCa-2-Zellen induzierten die strukturellen Derivate LBPS38, LBPS39 und LBPS40 der Ausgangssubstanz LBPS01, vergleichbar effektiv wie in Jurkat-Zellen, den Zelltod. Neben LBPS05 erzielten auch seine strukturellen Derivate LBPS56, LBPS57 und LBPS58 gute antiproliferative Effekte in ClearCa-2- sowie Jurkat-Zellen (CAROSATI et al., 2015). Mit drei Ausnahmen deckten sich die Wirksamkeiten der LBPS03-Derivate in ClearCa-2-Zellen mit den Untersuchungen in Jurkat-Zellen. Abweichend von der antiproliferativen Wirkung der Substanz LBPS45 in Jurkat-Zellen konnten in ClearCa-2-Zellen keine wachstumshemmenden Effekte beobachtet werden. Stattdessen zeichneten sich LBPS47 und LBPS49 durch gute Zelltod-induzierende Effekte in ClearCa-2-Zellen aus, die nicht in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden konnten.

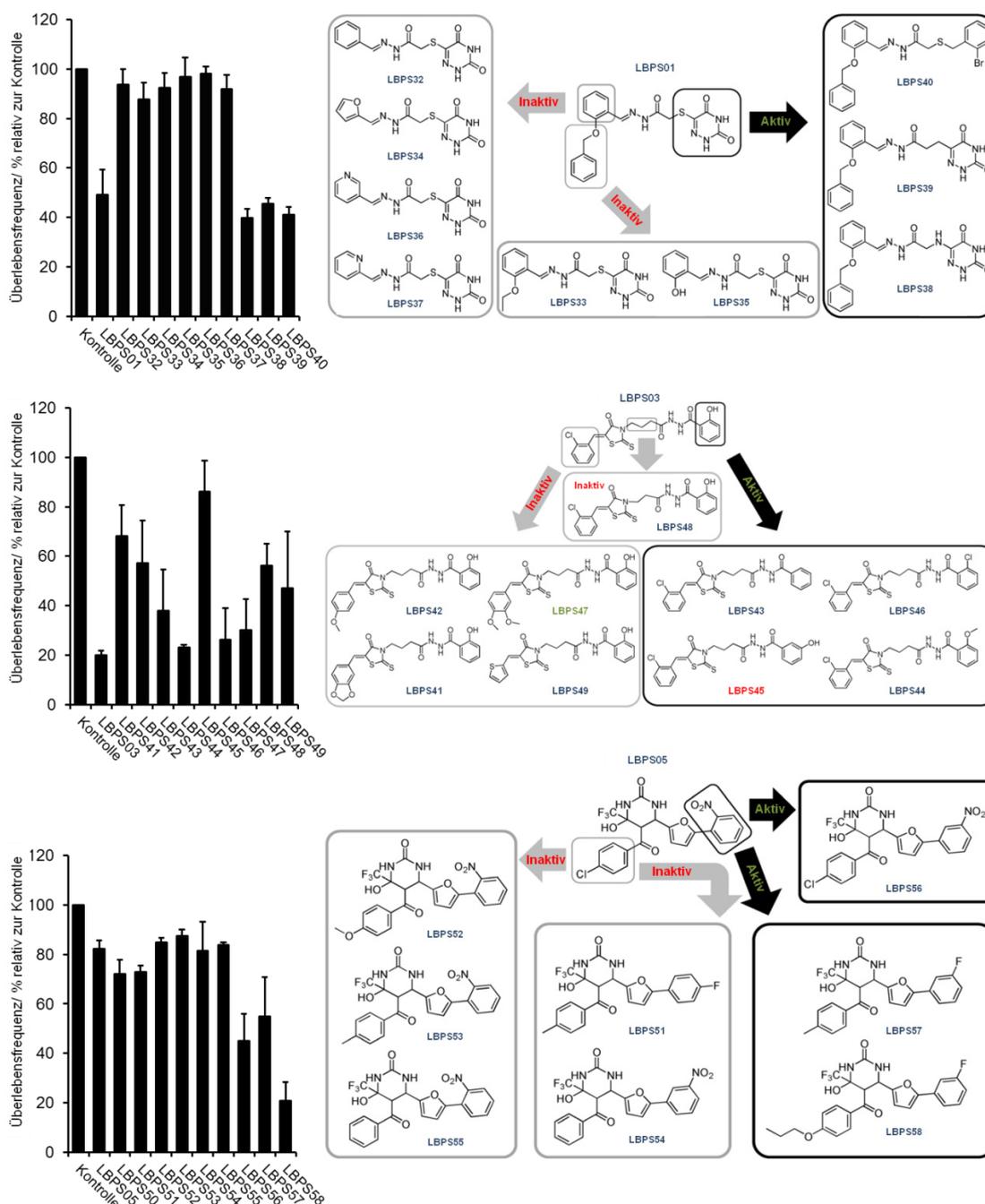


Abbildung 9: Struktur-Wirkungs-Beziehung der drei Ausgangssubstanzen und ihrer strukturellen Derivate. Die Wirksamkeit der Ausgangssubstanzen LBPS01, LBPS03 und LBPS05 sowie ihrer strukturellen Derivate wurde im Rahmen meiner Masterarbeit generiert und diente zur Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit Bezug auf die Veröffentlichung von CAROSATI und Kollegen. (2015) nehmen.

In der Tabelle 7 sind die IC_{50} -Werte der drei Ausgangssubstanzen sowie ihrer wirksamen Strukturderivate aufgelistet. Vergleichend wurden die IC_{50} -Werte von kommerziell zu erwerbenden und in klinischen Studien verwendeten Smac-Mimetika bestimmt. Der IC_{50} -Wert beschreibt die mittlere inhibitorische Konzentration, in der eine halbmaximale Hemmung des Tumorwachstums gemessen werden konnte. Die Kalkulation der IC_{50} -Werte erfolgte mit Hilfe der Graphpad Prism-Software.

Tabelle 7: IC₅₀-Werte der Zelltod-Aktivatoren im Vergleich zu kommerziell erwerblichen Smac-Mimetika. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden ClearCa-2-Zellen mit sechs bis acht verschiedenen Substanzkonzentrationen über einen Zeitraum von 96 Stunden behandelt. Die Proliferationsanalysen erfolgten mit Hilfe des DRAQ5-Verfahrens. Die Software Graphpad Prism wurde zur Kalkulation des IC₅₀-Wertes verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

IC ₅₀ -Werte							
Derivate von LBPS01 Konzentration [µM]		Derivate von LBPS03 Konzentration [µM]		Derivate von LBPS05 Konzentration [µM]		Auswahl kommerzieller Smac-Mimetika Konzentration [µM]	
LBPS01	9,5 ± 2,3	LBPS03	1,5 ± 0,4	LBPS05	17,2 ± 2,5	AT406	78,8±12,7
LBPS38	11,9 ± 2,9	LBPS43	4,3 ± 2,1	LBPS56	8,9 ± 1,1	Birinapant	42,5±2,3
LBPS39	13,5 ± 2,3	LBPS44	3,9 ± 2,4	LBPS57	7,9 ± 4,1	GDC-0152	9,9±1,6
LBPS40	16,7 ± 3,3	LBPS46	2,8 ± 1,4	LBPS58	5,8 ± 0,8		
		LBPS47	1,6 ± 0,9				
		LBPS49	1,7 ± 0,6				

Der vergleichsweise geringste IC₅₀-Wert wurde durch LBPS03 erzeugt, was die höchste Wirkungsweise repräsentiert. Eine halbmaximale Hemmung des Tumorwachstums von ClearCa-2-Zellen wurde bei einer Konzentration von 1,5±0,4 µM erzielt. Seine strukturellen Derivate wiesen ebenfalls geringe IC₅₀-Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf. Der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS03 und seine gut wirksamen Strukturderivate bilden somit die Gruppe der effektivsten Zelltod-Aktivatoren für das Nierenzellkarzinom. Die Substanz LBPS01 induzierte bei einer Konzentration von 9,5±2,3 µM eine halbmaximale Inhibierung des Tumorwachstums. Für seine Strukturderivate lagen die ermittelten IC₅₀-Werte im Bereich zwischen 11,9 µM und 16,7 µM. Der höchste IC₅₀-Wert der getesteten Zelltod-Aktivatoren wurde für LBPS05 mit 17,2±2,5 µM ermittelt. Seine Strukturderivate wiesen etwas geringere IC₅₀-Werte zwischen 5,8 µM und 8,9 µM auf. Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde die Wirkung von kommerziell erhältlichen Smac-Mimetika auf das Zellüberleben von ClearCa-2 Zellen getestet. Von den drei kommerziellen Smac-Mimetika wies GDC-0152 mit einer Konzentration von 9,9±1,6 µM den niedrigsten IC₅₀-Wert auf. Für AT406 und Birinapant führten die Konzentrationen von 78,8±2,3 µM und 42,5±2,3 µM zu einer halbmaximalen Inhibierung des Tumorwachstums. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse konnten die Zelltod-Aktivatoren als deutlich effektiver eingestuft werden als bereits etablierte Smac-Mimetika. Berücksichtigt werden muss dabei jedoch, dass hier die Wirkung der kommerziellen Smac-Mimetika per se getestet wurde. In der Regel werden diese Substanzen in Kombination mit Zytokinen eingesetzt, sodass in kombinatorischen Anwendungen deutlich geringere Substanzmengen notwendig sind, um Zelltod-induzierende Effekte in Tumorzellen hervorzurufen.

3.3. Die Zelltod-Aktivatoren LBPS01 und LBPS03 sowie ihre Strukturderivate liefern erste Hinweise auf einen Apoptose-ähnlichen Zelltodsignalweg

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen wurde der Einfluss der Zelltod-Aktivatoren auf die Apoptoserate durch die Anzahl hypodiploider Zellen bestimmt. Über eine Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden wurden ClearCa-2-Zellen mit den drei Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03, LBPS05 und ihren strukturellen Derivaten in einer Konzentration von 10 μ M inkubiert. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Substanzen zu ermöglichen, wurde eine äquimolare Konzentration eingesetzt. Diese Konzentration bietet zudem den Vorteil, dass regulatorische Effekte deutlich stärker, auch zu früheren Inkubationszeitpunkten, detektiert werden konnten. Apoptotische Zellen, die durch Endonukleaseaktivität die Integrität ihrer DNA verloren haben, weisen einen hypodiploiden DNA-Gehalt auf, der über eine Propidium-Iodid-Färbung nach RICCARDI UND NICOLETTI (2006) durchflusszytometrisch bestimmt werden kann.

In Abbildung 10 A ist die zeitabhängige Zunahme der Apoptoserate durch die verwendeten Substanzen dargestellt. Unter Kontrollbedingungen wurden nach 48 Stunden nur $4,8 \pm 1,8\%$ und nach 72 Stunden $4,8 \pm 1,5\%$ apoptotische Zellen detektiert. Die Applikation von LBPS03 rief in ClearCa-2-Zellen die stärkste Apoptoserate hervor. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in LBPS03-stimulierten Zellen lag nach 48 Stunden bei $42,2 \pm 1,6\%$ und nach 72 Stunden bei $45,4 \pm 1,1\%$. Seine strukturellen Derivate konnten größtenteils vergleichsweise effektiv die Apoptose induzieren. Eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde des Weiteren durch LBPS01 beobachtet. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg die Anzahl der Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt nach 48 Stunden auf $15,4 \pm 2,7\%$ und nach 72 Stunden auf $32,1 \pm 3,9\%$ an. Für seine Strukturderivate wurden etwas geringere Effekte nachgewiesen, die auf die schwächeren antiproliferativen Wirkungen der Substanzen im Vergleich zur Ausgangssubstanz zurückzuführen sind. Der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS05 und seine strukturellen Derivate konnten unter den verwendeten Versuchsbedingungen die Apoptose nicht induzieren, trotz hohem Zellsterben. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen stieg die Anzahl apoptotischer Zellen durch LBPS05 nach 48 Stunden um $2,7 \pm 0,5\%$ und nach 72 Stunden um $4,0 \pm 2,7\%$.

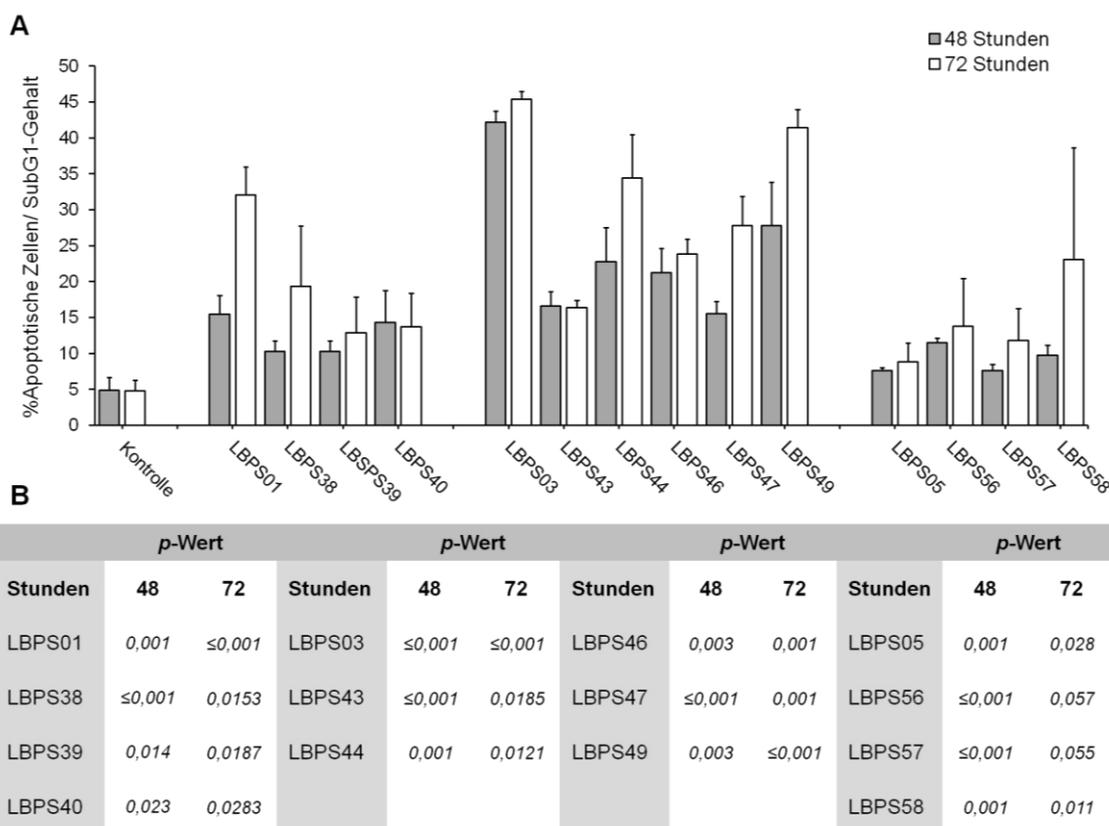


Abbildung 10: Bestimmung der Apptoserate der Zelltod-Aktivatoren wurde nach Nicoletti durchgeführt. A) ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 bis 72 Stunden mit Zelltod-Aktivatoren in einer Konzentration von 10 μ M behandelt. Die Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analysen von PI-gefärbten Zellkernen. Als Kontrolle wurden ClearCa-2-Zellen mit 0,1% DMSO behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. **B)** Die statistische Auswertung wurde mittels Student's t-test durchgeführt und wird tabellarisch unterhalb des Graphen abgebildet.

Da die bisherigen Experimente darauf hindeuten, dass LBPS01 und LBPS03 einen ähnlichen Zelltodsignalweg beeinflussen, wurde für weitere Untersuchungen zur Aufklärung der beteiligten Komponenten der Signalwege auf die Substanz LBPS03 fokussiert, da sie im Vergleich zu LBPS01 in geringeren Dosen wirksamer ist einen apoptotischen Zelltod zu induzieren. Demgegenüber stehen die Erkenntnisse für den Zelltod-Aktivator LBPS05, der offensichtlich einen vollständig anderen Signalweg beeinflusst. Die nachfolgenden Untersuchungen sollen zur Aufklärung der beteiligten Signalwege unter Einfluss von LBPS03 und LBPS05 in ClearCa-2-Zellen dienen.

3.4. LBPS03 aktiviert sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen

Das antiapoptotische Protein XIAP besitzt als natürlicher Inhibitor der Apoptose die Fähigkeit, über seine BIR2- beziehungsweise BIR3-Domäne Caspase-3/-7 und Caspase-9 direkt zu binden und eine Caspase-vermittelte Aktivierung zu inhibieren. Durch den Einsatz dieser Zelltod-Aktivatoren mit dem Ziel, an die XIAP-BIR3-Domäne zu binden und somit die

Inhibierung der Caspasen aufzuheben, könnte ihre intrazelluläre Aktivierung initiiert werden. Um den Einfluss der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 auf die Aktivierung von Caspasen zu bestimmen, wurden intrazelluläre Caspaseassays durchgeführt, die quantitativ durchflusszytometrisch ausgewertet werden konnten. Klarzellige Nierenkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 wurden über 48 und 72 Stunden unter LBPS03- und LBPS05-Zugabe stimuliert und die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen durchflusszytometrisch bestimmt.

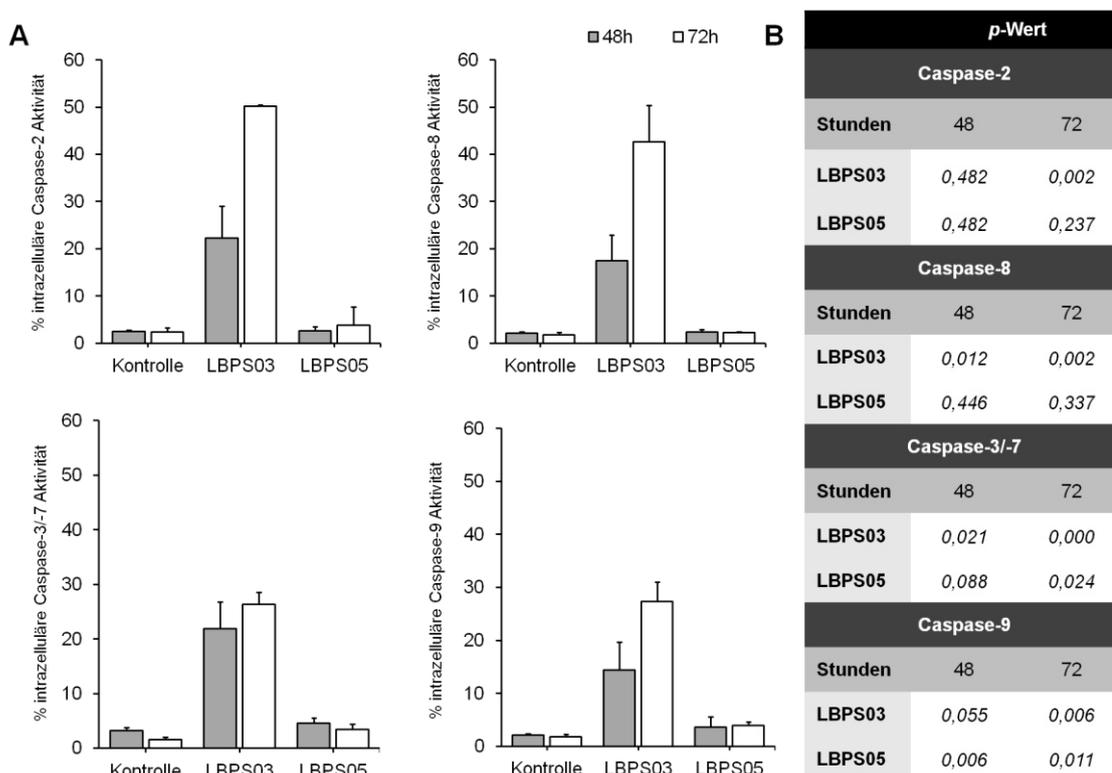


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspaseaktivierung in LBPS03- und LBPS05-behandelten ClearCa-2-Zellen. A) Klarzellige Nierenzellkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 wurden über einen Zeitraum von 48 bis 72 Stunden mit einer 10 μ M LBPS03- bzw. LBPS05-Lösung inkubiert. Der Nachweis der intrazellulären Aktivierung der Caspasen -2, -3/-7, -8 und -9 erfolgte mit Hilfe des Caspase-Staining-Kits von Promokine am Durchflusszytometer. Die Initiierung der Caspase-3/-7 sowie der Caspase-9 wurde im Rahmen meiner Masterarbeit generiert und zum Zweck der Veranschaulichung aufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. B) Die statistische Auswertung wurde mittels Student's t-test durchgeführt und wird tabellarisch rechts neben dem Graphen abgebildet.

Die Abbildung 11 A zeigt einen zeitabhängigen Anstieg der intrazellulären Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -9 sowie der Effektorcaspasen-2 und -3/-7 in LBPS03-behandelten Zellen. Die stärkste intrazelluläre Caspaseaktivierung wurde für die Caspasen-2 und -8 gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden stieg die Aktivität im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen für Caspase-2 von unter 3% signifikant auf $50,2 \pm 3,9\%$ und für Caspase-8 auf $42,7 \pm 7,7\%$ an. Eine Zunahme der Caspase-3/-7- sowie der Caspase-9-Aktivität auf $26,4 \pm 2,1\%$ und $27,3 \pm 3,7\%$ wurde nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden durch LBPS03 detektiert. In Abbildung 11 wird deutlich, dass unter den verwendeten

Versuchsbedingungen LBPS05 nur einen marginalen Einfluss auf die Aktivierung von Initiator- als auch Effektorcaspasen besitzt.

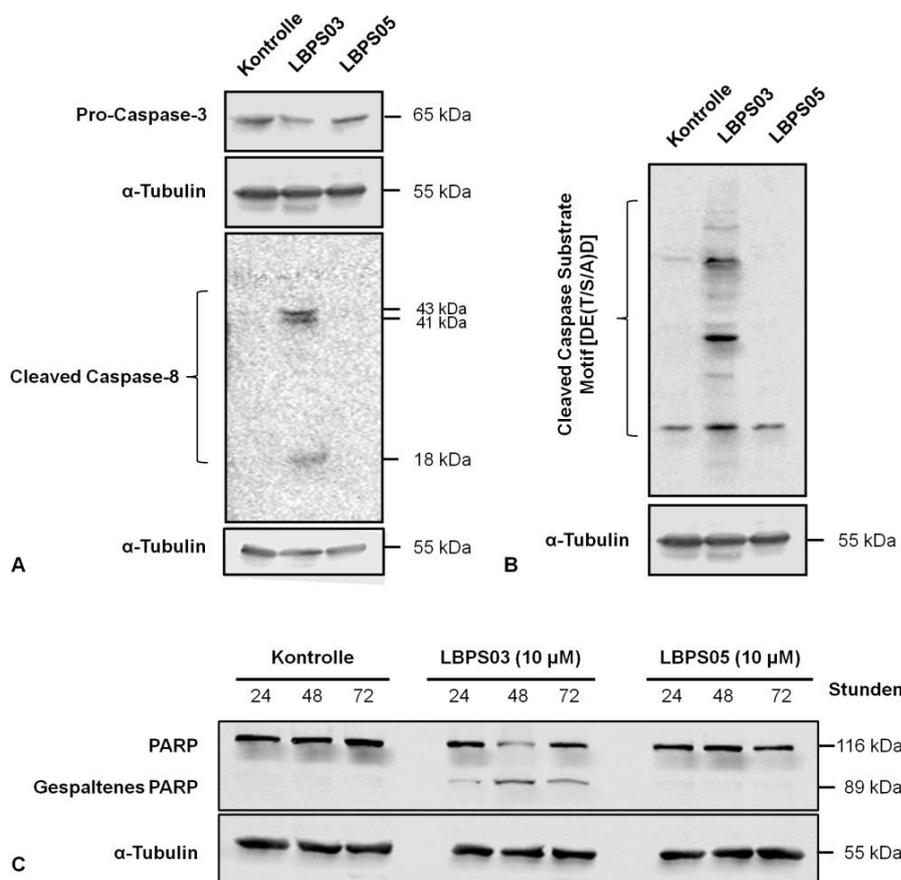


Abbildung 12: Western-Blot-Analysen zur Spaltung von Caspasen und Caspase-spezifischen Substraten durch LBPS03. ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit einer 10 μ M-LBPS03- oder LBPS05-Lösung stimuliert und die Proteine isoliert. Auf einer 12%-igen SDS-PAGE wurden 70 μ g Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot konnte **A)** die LBPS03-induzierte Spaltung von Caspase-8 und die Abnahme des Proteinniveaus der Pro-Caspase-3 sowie **B)** die Spaltung von spezifischen Caspasesubstraten detektiert werden (n=2). **C)** ClearCa-2-Zellen wurden mit LBPS03 und LBPS05 über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden behandelt und die Proteine isoliert. Auf einer 8%-igen SDS-PAGE wurden 20 μ g Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis für α -Tubulin diente als Ladungskontrolle (n=3).

Caspasen werden als katalytisch inaktive Zymogene synthetisiert. Infolge eines Apoptosestimulus wird die Procaspase in ihre aktive Form enzymatisch gespalten. Aktivierte Effektorcaspasen erkennen eine Vielzahl von Substraten, die in einer Kaskade ebenfalls gespalten werden. Beide Ereignisse lassen sich mittels Western-Blot-Analysen nachweisen. Dafür wurden ClearCa-2-Zellen über 72 Stunden mit LBPS03 oder LBPS05 stimuliert und hinsichtlich ihrer Pro-Caspase-3-Expression (Abb. 12 A), Caspase-8-Spaltung (Abb. 12 A) und des proteolytischen Abbaus Caspase-spezifischer Substrate (Abb. 12 B) untersucht. Die Detektion der 43 kDa, 41 kDa und 18 kDa großen Caspase-8-Fragmente in Abbildung 12 A) weisen auf eine LBPS03-abhängige Aktivierung der Caspase-8 hin und unterstützt die Resultate des intrazellulären Caspaseassays. Eine Reihe von Caspase-spezifischen Substraten

mit der Erkennungssequenz DE(T/S/A)D konnte unter Zugabe des Zelltod-Aktivators LBPS03 prozessiert werden (Abb. 12 B). Zudem wurde unter LBPS03-Einfluss die Expression der 65 kDa großen Pro-Caspase-3-Form verringert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die inaktive Form der Caspase-3 durch proteolytische Spaltung verringert wurde, wohingegen die aktive Form zunehmen konnte. Des Weiteren bewirkte der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS03 eine zeitabhängige Spaltung des Caspase-3-Substrats PARP (Abbildung 12 C).

Zum Nachweis einer PARP-Spaltung wurden ClearCa-2-Zellen mit LBPS03 und LBPS05 über 24 bis 72 Stunden behandelt. In Übereinstimmung mit den Resultaten der PI-Färbung förderte LBPS03 nicht nur die Zunahme eines hypodiploiden DNA-Gehalts, sondern induzierte mit voranschreitender Behandlungsdauer eine Caspase-abhängige PARP-Spaltung. Unter Kontrollbedingungen lag PARP in seiner nativen Form vor und konnte bei einer Bandenhöhe von 116 kDa detektiert werden. Bereits 24 Stunden nach Zugabe des Zelltod-Aktivators LBPS03 wurde in Western-Blot-Analysen bei einer Bandenhöhe von 89 kDa eine schwache Bande für das Spaltprodukt von PARP dokumentiert. Eine zunehmende Inkubationsdauer verstärkte den Effekt der PARP-Spaltung, sodass nach 48 Stunden eine sehr intensive Bande bei 89 kDa nachgewiesen werden konnte. Nach einem Behandlungszeitraum von 72 Stunden wurde immer noch eine PARP-Spaltung detektiert, die im Vergleich zum Vortag aber etwas schwächer ausfiel. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass LBPS03 Caspase-abhängig die Apoptose induziert.

Unter den verwendeten Versuchsbedingungen bewirkte LBPS05 weder die Prozessierung der Caspase-8 in ihre aktive Form, noch wurden Caspase-spezifische Substrate proteolytisch gespalten. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse die Vermutung, dass LBPS05 einen Caspase-unabhängigen Zelltod induziert.

3.5. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 reprimiert möglicherweise die Expression einiger antiapoptotischer Proteine in ClearCa-2

Um den Einfluss von LBPS03 und LBPS05 auf eine Vielzahl von Apoptose-relevanten Proteinen zu untersuchen, wurde ein „Human Apoptosis Antibody Array“ (R&D Systems) durchgeführt. Über 48 Stunden wurde die ClearCa-2-Zelllinie unter Zugabe der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 stimuliert, anschließend die Proteine isoliert und mittels Dot-Plot-Analysen die relative Expression Apoptose-relevanter Proteine ermittelt.

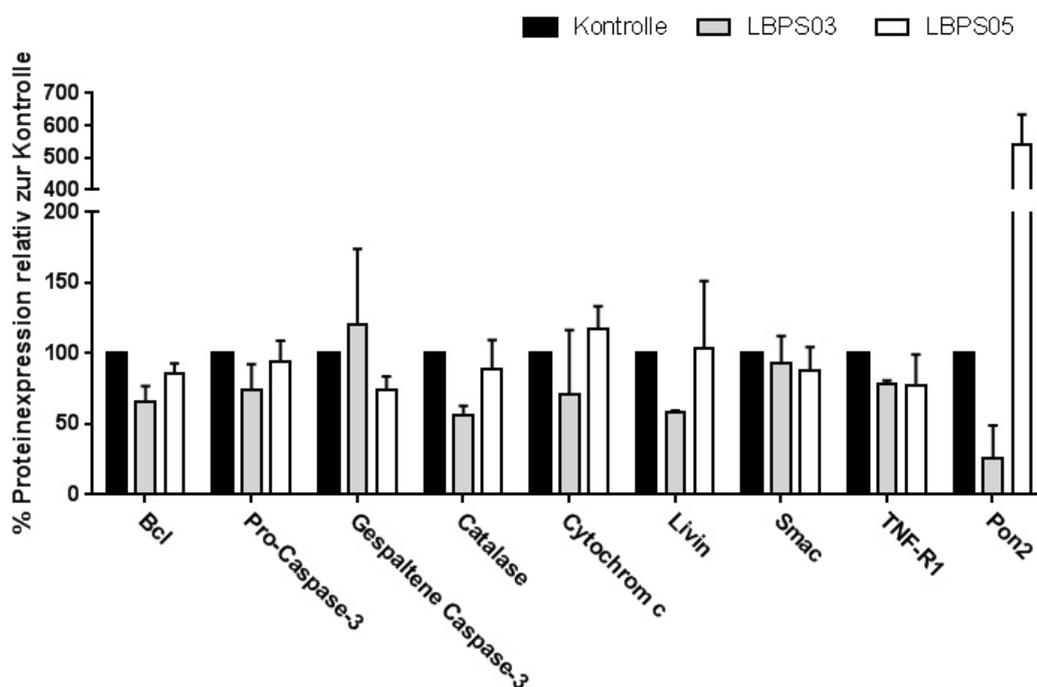


Abbildung 13: Dot-Plot-Analysen geben erste Hinweise auf den Einfluss der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 auf die Proteinlevel Apoptose-relevanter Proteine in ClearCa-2-Zellen. Klarzellige Nierenzellkarzinom-Zellen der Linie ClearCa-2 wurden mit einer 10 μ M-LBPS03- beziehungsweise LBPS05-Lösung behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurden die Proteine isoliert und 250 μ g Gesamtproteinlysat für das Human Apoptosis Antibody Array Kit (R&D Systems) eingesetzt. Die densitometrische Auswertung des Dot Blot wurde am Infrarot-Imager (LI-COR) durchgeführt. Die Quantifizierung der relativen Expression erfolgte, indem die Pixelintensität des Zielproteins auf den Wert eines Assay-spezifischen Referenzproteins bezogen wurde und anschließend die relative Expression auf die Kontrolle (0,1% DMSO) normalisiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Das Diagramm in Abbildung 13 zeigt die relative Expression ausgewählter Proteine in LBPS03- und LBPS05-stimulierten Zellen. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 wirkte sich leicht degradierend auf einige antiapoptotische Proteine aus. Die quantitativen Untersuchungen ergaben erste Hinweise, dass bevorzugt Proteine, die den Ablauf der Apoptose negativ beeinflussen, vermindert exprimiert wurden anders als in kontrollbehandelten Zellen. Unter anderem wurde das Proteinniveau der antiapoptotischen Proteine Bcl und Livin auf $66,0 \pm 10,9\%$ und $57,9 \pm 1,7\%$ reduziert. In Übereinstimmung mit den Analysen auf Western-Blot-Ebene konnte im „Human Apoptosis Antibody Array“ eine Verringerung der Pro-Caspase-3 beobachtet werden. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen nahm die Expression um $26,7 \pm 18,0\%$ ab und die der gespaltenen Form der Caspase-3 um $20,5 \pm 53,8\%$ zu. Unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 wurde das Expressionsniveau der Katalase auf $56,7 \pm 6,2\%$ reduziert.

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, besitzt der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS05 nur marginale Einflüsse auf die Proteinlevel Apoptose-relevanter Proteine. Ähnlich wie LBPS03 bewirkte LBPS05 eine leichte Abnahme der TNF-R1-Expression. Beide Zelltod-Aktivatoren wiesen jedoch keinen regulatorischen Effekt auf das proapoptotische Protein Smac auf.

LBPS05 fördert eine starke Zunahme des Proteins Pon2. Die Proteinmenge nahm im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen um das 5-fache zu. Ein vollständig divergentes Muster der Pon2-Proteinexpression wurde durch LBPS03 hervorgerufen. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen wurde das Proteinniveau auf $26,2 \pm 23,0\%$ herabgesetzt. Auch diese Erkenntnisse deuten sehr stark darauf hin, dass LBPS03 einen apoptotischen Zelltod induziert, indem antiapoptotische Proteine degradiert werden. LBPS05 dagegen scheint unwesentlich den Signalweg der Apoptose zu beeinflussen.

3.6. Zunehmende Inkubationsdauer steigert die antiproliferativen Effekte der Zelltod-Aktivatoren in ClearCa-2-Zellen

Für die beiden Zelltod-Aktivatoren wurde im Folgenden die Abhängigkeit der Substanzen von der Behandlungsdauer untersucht, um zu überprüfen, ob die Inkubationsdauer die Wirkeffektivität beeinflusst. In Abbildung 14 wird die Wirkung der Zelltod-Aktivatoren in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer analysiert. Hierfür wurden die Substanzen zum Inkubationszeitpunkt 0 appliziert und nach definierten Zeitpunkten vom Zellrasen entfernt, mit PBS gewaschen und für eine Gesamtdauer von 96 Stunden in frischem Medium kultiviert. Das Zellüberleben wurde mit Hilfe von Proliferationsanalysen durchgeführt. Das relative Zellüberleben bezieht sich auf die Lösungsmittelkontrolle.

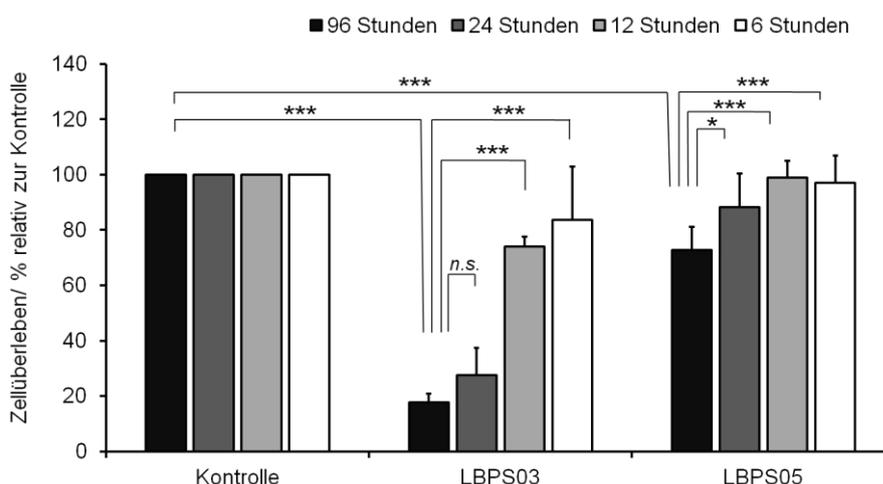


Abbildung 14: Wirkung der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 auf das Proliferationsverhalten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer von ClearCa-2-Zellen. Die Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 wurden in einer Substanzkonzentration von $10 \mu\text{M}$ zum Behandlungszeitpunkt 0 h auf ClearCa-2-Zellen appliziert. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h, 12 h und 24 h wurden die Substanzen von dem Zellrasen entfernt, mit PBS gewaschen und mit frischem 2%-igen FCS-Medium versetzt. Die Quantifizierung der Überlebensrate mittels Proliferationsanalysen erfolgte nach einer Gesamtkubationsdauer von 96 Stunden nach Applikationsbeginn. Als Kontrolle wurden ClearCa-2-Zellen mit 0,1% DMSO behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Bereits bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zeigte LBPS03 eine vergleichbare Wirksamkeit in ClearCa-2-Zellen wie nach einer 96-stündigen Behandlung. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde das Zellüberleben um $72,5 \pm 10,0\%$ reduziert, nur 9,6% weniger Zellen als im Vergleich zu einer 96-stündigen Behandlung. Kürzere Inkubationszeiten von 6 Stunden oder 12 Stunden verschlechterten die Wirksamkeit von LBPS03 signifikant. Beide verwendeten Zeitpunkte reduzierten das Zellüberleben nur um etwa 20%. Auch die antiproliferativen Effekte des Zelltod-Aktivators LBPS05 blieben mit verkürzten Inkubationszeiten aus. Nur eine 24-stündige Behandlungsdauer konnte annähernd vergleichbare Zelltod-induzierende Effekte wie nach einer 96-stündigen Inkubation hervorrufen.

3.7. Die kombinatorische Anwendung der Zelltod-Aktivatoren mit TNF α oder TRAIL führen zu keinen verstärkten Wirkeffekten

Einige bekannte Smac-Mimetika zeigen per se erst in sehr hohen Dosen antiproliferative Effekte in Tumorzellen. Werden diese Smac-Mimetika hingegen zusammen mit einem Zytokine, zum Beispiel TRAIL oder TNF α , appliziert, wird effektiv der Zelltod induziert. Durch RAMP und Kollegen (2003) wurde bereits eine TRAIL-Resistenz in ClearCa-2-Zellen beschrieben, obwohl beide TRAIL-Rezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, exprimiert werden. Im folgenden Experiment soll die Wirksamkeit des Zytokines TNF α auf das Proliferationsverhalten von ClearCa-2-Zellen analysiert werden, unter Berücksichtigung des Aspekts, dass auch beide TNF-Rezeptoren TNF-R1 sowie TNF-R2 exprimiert werden.

Die Expression der beiden TNF-Rezeptoren wurden mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Ein Blick auf Abbildung 15 A+B zeigt den Nachweis des TNF-R1- und TNF-R2-Rezeptors in ClearCa-2. Das Protein TNF-R1 wurde bei einer Höhe von 55 kDa und 30 kDa im Western Blot detektiert (Abb. 15 A). Bei einer Bandenhöhe von 65 kDa und 35 kDa konnte der Antikörper gegen TNF-R2 binden und die Expression des Rezeptors bestätigen (Abb. 15 B). Bei den beiden kleineren Fragmenten der beiden TNF-Rezeptoren handelt es sich vermutlich um proteolytisch gespaltene lösliche Rezeptoren (XANTHOULEA et al., 2004). Obwohl die Expression beider Rezeptoren in ClearCa-2-Zellen nachgewiesen werden konnte, beeinflusste eine TNF α -Behandlung das Proliferationsverhalten nicht (Abb. 15 C). Die Applikation des Todesliganden TNF α verringerte das Zellüberleben in ClearCa-2-Zellen um $9,2 \pm 5,9\%$ im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen.

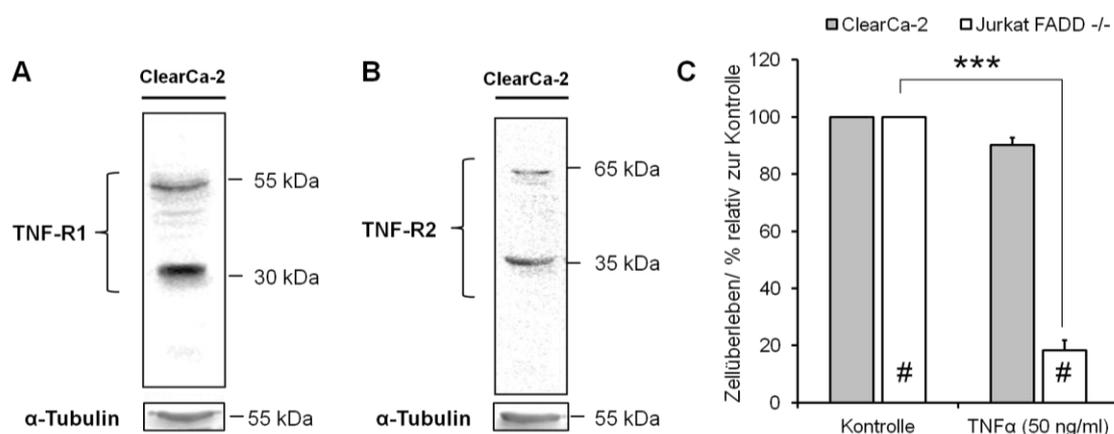


Abbildung 15: ClearCa-2-Zellen weisen eine Resistenz gegenüber TNF α auf, trotz vorhandener TNF-Rezeptoren. Western-Blot-Analyse zur Basalexpression des TNF-R1 (A) und TNF-R2 (B) in ClearCa-2-Zellen. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 50 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. C) ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 50 ng/ml TNF α behandelt. Die Überlebensfrequenz der Zellen wurde mittels Proliferationsanalysen ermittelt. Die antiproliferative Wirkung von TNF α wurde durch die Behandlung von FADD-defizienten Jurkat-Zellen als Positivkontrolle verwendet, indem über eine Behandlungsdauer von 72 Stunden FADD-defiziente Jurkat-Zellen mit einer 50 ng/ml TNF α -Lösung inkubiert und die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Die Daten der Jurkat-Zellen wurden durch N. van den Höfel im Rahmen ihrer Doktorarbeit generiert und sind mit # markiert. Die Ergebnisse dienen zum Nachweis der Wirksamkeit von TNF α . Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Um die Wirksamkeit von TNF α zu bestätigen, wurden FADD-defiziente Jurkat-Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen durch TNF α stimuliert und die Zellzahl mittels durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Nach 72 Stunden wurde das Zellüberleben der FADD-defizienten Jurkat-Zellen signifikant um $83,2 \pm 3,6\%$ reduziert. Diese Western-Blot-Untersuchung dient ausschließlich zum Expressionsnachweis und erlaubt keine Aussage über die Lokalisation der Rezeptoren. Anzunehmen ist, dass die Rezeptoren zytoplasmatisch vorliegen und eine Signalweiterleitung im Fall eines TNF α -Stimulus nicht aktiviert werden kann. Eine grundsätzliche Expression der Rezeptoren ist jedoch gegeben und würde den Zellen theoretisch die Aktivierung der Signalwege über ihren Rezeptor ermöglichen. Die Weiterleitung von Todessignalen über TNF-Rezeptoren wird jedoch häufig durch die fehlgeleitete Expression von antiapoptotischen Proteinen in Tumorzellen unterbunden.

Das antiapoptotische Protein XIAP wurde bereits in ClearCa-2-Zellen als wichtiges „Schaltermolekül“ in der Apoptose identifiziert (vgl. Kapitel 1.10). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass XIAP in ClearCa-2-Zellen durch siRNA ausgeschaltet werden konnte, das wiederum Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitiviert. Da für die beiden Substanzen LBPS03 und LBPS05 eine mögliche Interaktion mit der XIAP-BIR3-Domäne vorhergesagt wurde, wurde in Betracht gezogen, dass beide Zelltod-Aktivatoren ebenfalls ClearCa-2 gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitivieren.

Im nachfolgenden Experiment wurde die Wirkung der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit TRAIL und TNF α untersucht. Die beiden Zytokine TNF α und TRAIL wurden in einer Konzentration von 50 ng/ml appliziert, wohingegen die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 in drei verschiedenen Konzentrationen getestet wurden.

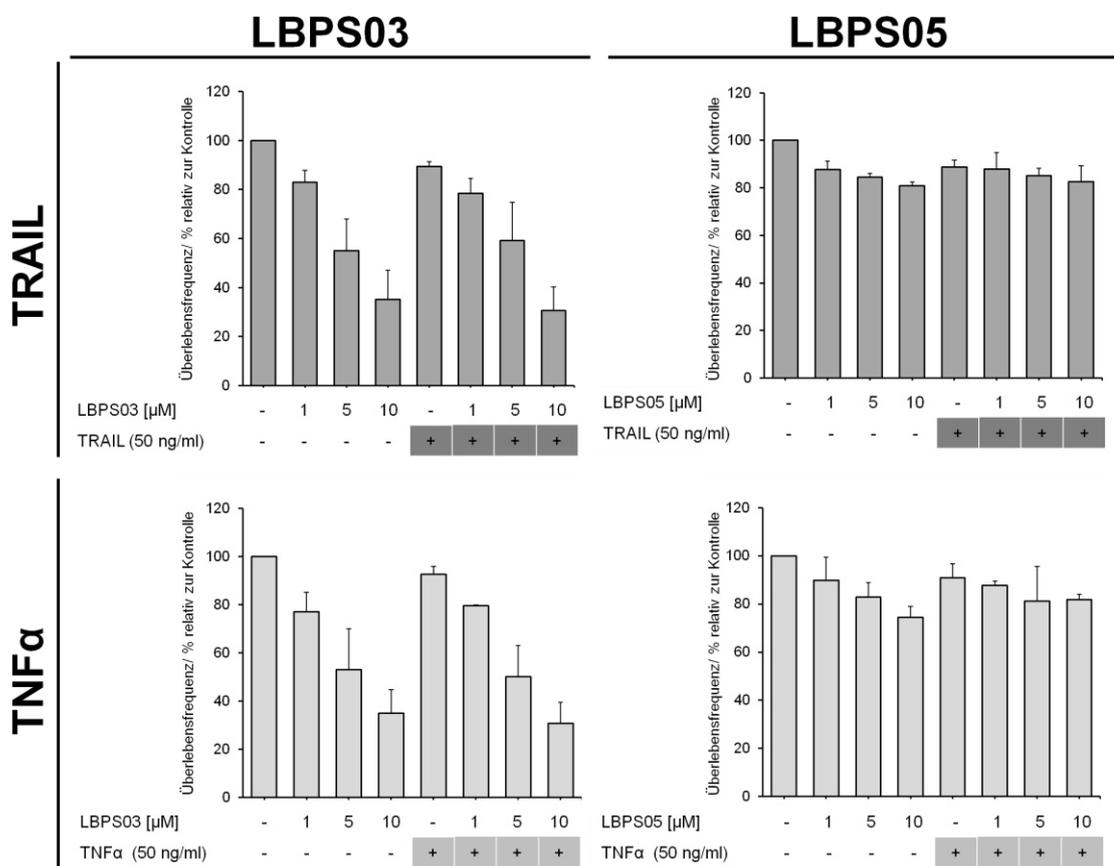


Abbildung 16: Proliferationsanalysen zur Wirksamkeit der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit TNF α oder TRAIL geben erste Hinweise darauf, dass die Wirkeffekte nicht verstärkt werden können.

Auf der x-Achse werden die verwendeten Konzentrationen der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 sowie die von TNF α oder TRAIL aufgetragen. Die y-Achse stellt die Überlebensfrequenz von ClearCa-2-Zellen nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden dar. Das relative Zellüberleben bezieht sich auf die Zelldichte der kontrollbehandelten Zellen (0,1% DMSO + 0,1% PBS). Die Bestimmung des Zellüberlebens wurde mittels DRAQ5 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 16 wird die Wirkung der Substanzen auf das Zellüberleben von ClearCa-2-Zellen allein und in Kombination dargestellt. Konzentrationsabhängig verringerten beide Zelltod-Aktivatoren das Zellüberleben, wobei LBPS03 deutlich effektiver wirkte als LBPS05 in gleichen Konzentrationen. Unter Einfluss der beiden Todesliganden TRAIL und TNF α sank das Zellüberleben marginal um $11,2 \pm 2,8\%$ und $9,2 \pm 5,9\%$. Eine Kombinationstherapie aus einem Zelltod-Aktivator mit TRAIL oder TNF α wies auf keine wirkverstärkenden antiproliferativen Effekte der Zelltod-Aktivatoren hin.

3.8. LBPS03 wirkt als Apoptose-Induktor

3.8.1. Identifikation von XIAP als Zielmolekül des Zelltod-Aktivators LBPS03, das durch eine mögliche Interaktion die Aktivierung der Caspasen fördert

Zur Identifikation potenzieller Zielstrukturen des Zelltod-Aktivators LBPS03 wurden Western-Blot-Analysen für die drei prominentesten IAPs XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 durchgeführt. Sowohl LBPS03 als auch LBPS05 wurden identifiziert, um mit der BIR3-Domäne der IAPs zu interagieren. Die konzentrationsabhängigen Effekte des Zelltod-Aktivators LBPS03 werden in Abbildung 17 dargestellt. Die relative Expression der IAPs bezieht sich auf das Expressionsniveau von kontrollbehandelten Zellen und wurde nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bestimmt. LBPS03 bewirkte eine starke Degradierung seines potentiellen Zielmoleküls XIAP, wohingegen für die beiden untersuchten zellulären IAPs eine signifikante Zugabe des Proteinniveaus unter Einfluss des Zelltod-Aktivators beobachtet werden konnte. Die hohen angewandten Dosen des Zelltod-Aktivators sind aus pharmakologischer Sicht kritisch, sollten aber dazu dienen, das Potential der Substanz zu erkennen und Tumorzellen erheblich zu stressen.

In Abbildung 17 A wird die signifikante Abnahme des XIAP-Expressionsniveaus in der Abhängigkeit der applizierten LBPS03-Konzentrationen ersichtlich. ClearCa-2-Zellen exprimierten unter Kontrollbedingungen sehr stark das antiapoptotische Protein XIAP, welches in Western-Blot-Analysen bei 53 kDa detektiert wurde. Die Verwendung einer 10 μM LBPS03-Lösung verringerte das XIAP-Expressionslevel um $24,7 \pm 11,5\%$. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen wurde die stärkste Reduktion durch eine Konzentration von 40 μM erzielt. Das Proteinniveau wurde um $51,5 \pm 11,0\%$ im Vergleich zur Kontrolle verringert. Die konzentrationsabhängige Abnahme des XIAP-Proteingehalts ging mit einer verstärkten Expression einer XIAP-Variante einher, die bei etwa 70 kDa nachgewiesen werden konnte. Die Variante und ihre Entstehung konnten im Rahmen meiner Dissertation nicht aufgeklärt werden. Vermutlich handelt es sich jedoch um eine posttranslationale Modifikation von XIAP, zum Beispiel durch Ubiquitinierung, was für einen proteosomalen Abbau des Proteins sprechen würde.

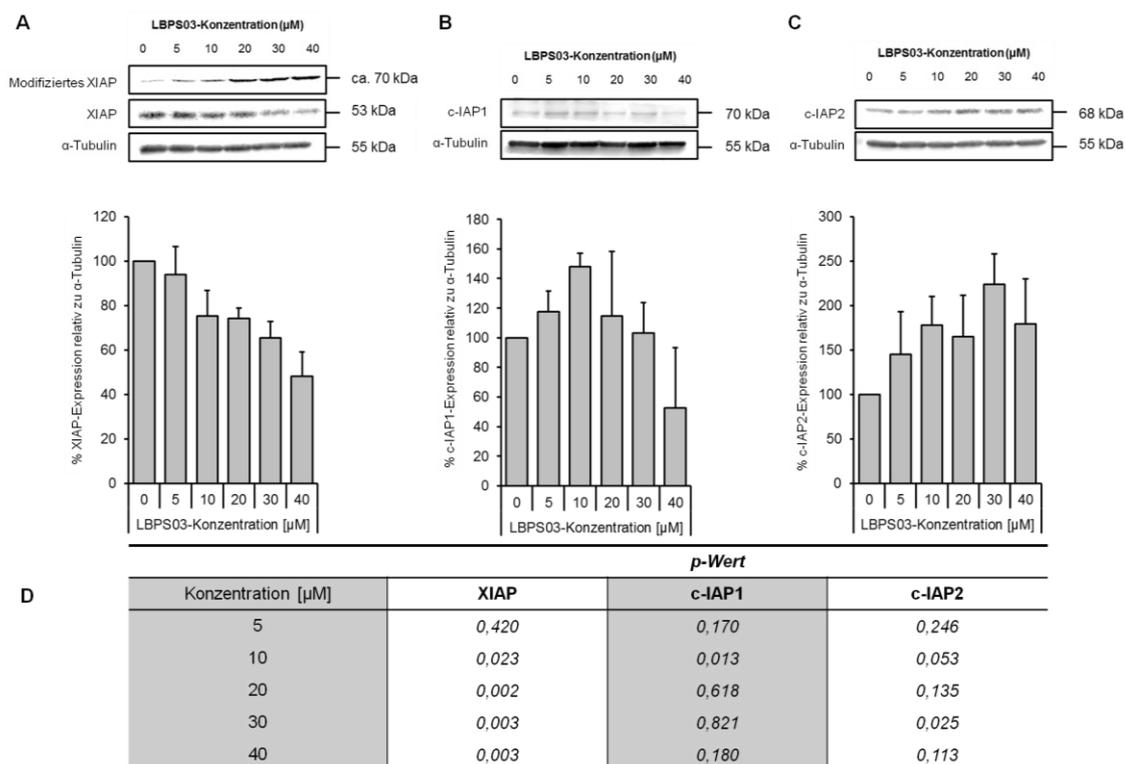


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse zur Regulation der IAPs durch den Einfluss von LBPS03. Auf den x-Achsen sind die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen des Zelltod-Aktivators LBPS03 abgebildet. Die y-Achse beschreibt die relative Expression des Zielproteins zur Expression in kontrollbehandelten Zellen (0,1% DMSO). ClearCa-2-Zellen wurden über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden mit verschiedenen LBPS03-Konzentrationen inkubiert und die Proteine isoliert. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 50 µg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetragen und der Western Blot mit Primärantikörpern für **A**) XIAP, **B**) c-IAP1 und **C**) c-IAP2 (Santa Cruz) durchgeführt. Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte durch die Expression des Proteins relativ zur Ladungskontrolle (α-Tubulin). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. **D**) Die statistische Auswertung wurde mittels Student's t-test durchgeführt und wird tabellarisch unterhalb der Graphen abgebildet.

In Abbildung 17 B und 17 C werden die konzentrationsabhängigen Einflüsse des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf das Expressionsniveau der beiden IAPs c-IAP1 und c-IAP2 analysiert. Unter Zugabe von LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM nahm die Expression von c-IAP1 um $47,8 \pm 9,4\%$ zu. Die konzentrationsabhängige Zunahme der Expression von c-IAP1 blieb in höheren Dosen dagegen aus. Eine 10 µM-LBPS03-Lösung förderte den Anstieg des Proteinniveaus von c-IAP2 um $78,2 \pm 32,4\%$. Eine Konzentration von 30 µM ermöglichte eine Verstärkung der c-IAP2-Expression um $123,8 \pm 34,2\%$ im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen.

Diese Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass die Interaktion von LBPS03 mit XIAP eine Inhibierung beziehungsweise Degradierung von XIAP fördert und eine Aktivierung der Caspasen ermöglicht. Im nachfolgenden Experiment soll die LBPS03-abhängige Aktivierung der Caspasen durch den Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK aufgehoben werden, um Apoptose zu unterdrücken.

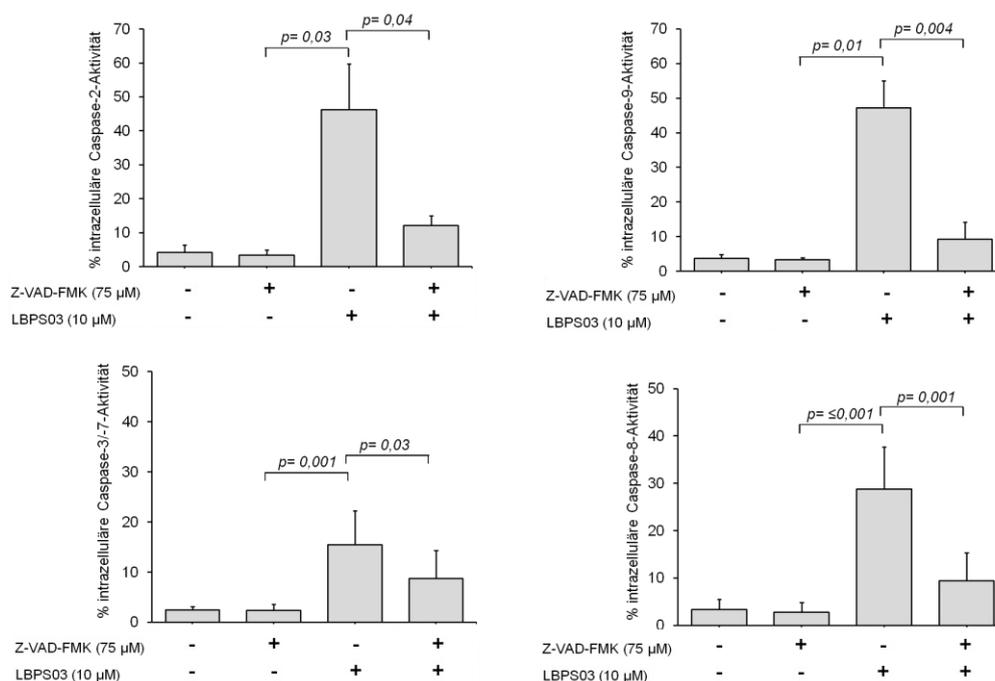


Abbildung 18: Nachweis der Caspaseinhibierung in LBPS03-stimulierten Zellen durch den Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK. Auf der x-Achse werden die verwendeten Substanzen mit den entsprechenden Konzentrationen aufgeführt. Die y-Achse stellt die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen-2, -3/-7, -8 und -9 dar. Klarzellige Nierenzellkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 wurden über einen Inkubationszeitraum von 72 Stunden mit entsprechenden Substanzen behandelt und die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen mit Hilfe des Caspase-Staining-Kits von Promokine am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie bereits in Kapitel 3.4. beschrieben wurde, besitzt LBPS03 das Potential, Caspasen zu aktivieren und den Zelltod zu induzieren. Zu den LBPS03-behandelten Zellen wurden für diese Versuche analoge Proben unter Zugabe des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK generiert. Die intrazelluläre Caspaseaktivität wurde nach 72 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 18 wird die Inhibierung der Caspasen durch Z-VAD-FMK in LBPS03-stimulierten Zellen dargestellt. Der Caspaseinhibitor besitzt das Potential, die Aktivierung der Initiator- als auch Effektorcaspasen durch LBPS03 aufzuheben. Unter Kontrollbedingungen wurden in 2,7% bis 4,18% der Zellen aktivierte Caspasen detektiert. Eine alleinige Applikation des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK bewirkte keine Veränderung im Aktivierungspotential der Caspasen. Abermals konnte die Initiierung der Initiatorcaspasen-8 und -9 wie der Effektorcaspasen-2 und -3/-7 durch LBPS03 im intrazellulären Caspasenassay bestätigt werden. Die kombinatorische Applikation von LBPS03 und Z-VAD-FMK reduzierte signifikant die LBPS03-induzierte Caspaseaktivität. Die Aktivität der Caspase-2 nahm von $46,1 \pm 13,5\%$ auf $12,1 \pm 2,9\%$ ab, der Caspasen-3/-7 von $18,2 \pm 6,3\%$ auf $9,6 \pm 5,2\%$ und der Caspase-8 von $30,3 \pm 8,8\%$ auf $10,4 \pm 5,9\%$. Eine weitere signifikante Verringerung der Caspase-9-Aktivität wurde durch Z-VAD-FMK in LBPS03-behandelten Zellen nachgewiesen, indem die Aktivität von $47,1 \pm 7,9\%$ auf $9,3 \pm 4,9\%$ herabgesetzt wurde.

3.8.2. Aktivierung von p53 durch den Zelltod-Aktivator LBPS03 in ClearCa-2-Zellen

Neben den Komponenten, die auf Proteinebene an der Vermittlung der Apoptose durch LBPS03 eine Rolle spielen, sollte im folgenden Experiment ein analytischer Schwerpunkt auf das mRNA-Expressionslevel LBPS03-stimulierter Zellen gelegt werden. Um eine Vielzahl von Genen abzudecken, die auf Transkriptionsebene durch LBPS03 beeinflusst werden, wurde ein „GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0“ in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die Stimulation durch den Zelltod-Aktivator erfolgte über 24 Stunden. Für die Analyse wurde Gesamt-RNA aus kontrollbehandelten und LBPS03-stimulierten Zellen in drei unabhängigen Versuchen gewonnen und in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt. Die RNA-Integrität wurde durch ein RNA-Agarosegel und durch Analysen des BMFZ bestätigt (Daten nicht dargestellt).

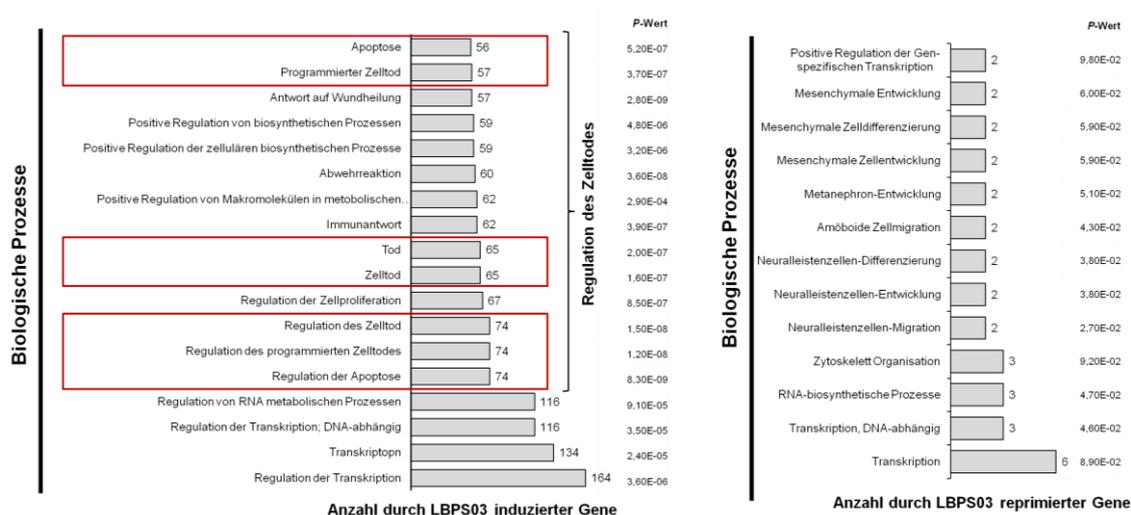


Abbildung 19: "Gene Ontology (GO)"-Kriterien der biologischen Prozesse durch den Einfluss von LBPS03. Auf der x-Achse wird die Anzahl der durch LBPS03-induzierten beziehungsweise reprimierten Gene dargestellt. Auf der y-Achse sind verschiedene biologische Prozesse nach der Anzahl der beteiligten Gene aufgelistet. ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einer 10 µM-LBPS03-Lösung inkubiert und die Gesamt-RNA isoliert. Aus drei unabhängigen Versuchen wurde die Gesamt-RNA in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt und das Probenmaterial an das BMFZ versandt, das eine Affymetrix-Whole-Transcript-Expression-Profiling-Analyse durchführte. Gene, die im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 1,5 induziert oder reprimiert wurden, wurden zur Identifikation der GO-Kriterien mittels *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* Software verwendet. In Rot werden durch LBPS03 induzierte biologische Prozesse hervorgehoben, die mit dem Zelltod assoziiert werden.

Das GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 ermöglicht den Nachweis der Expression von mehr als 285.000 *full-length*-Transkripten. Unter allen möglichen Transkripten wurden 1.232 Gene identifiziert, die um den Faktor 1,5 durch LBPS03 induziert und 1.940 Gene, die reprimiert wurden. Der Cut-off der regulierten Gene wurde bei 1,5 gesetzt, um möglichst einen großen Überblick der regulierten Gene zu ermöglichen. Die GO-Term-Analyse der LBPS03-induzierten Gene wies in mehreren biologischen Prozessen auf die Regulation des

Zelltodes hin. In Abbildung 19 sind die biologischen Prozesse der GO-Term-Analyse der LBPS03-induzierten Gene in ClearCa-2-Zellen dargestellt, die eine Beteiligung von mindestens 55 Genen aufwiesen. Neben der Regulation des Zelltodes, insbesondere der Apoptose, konnte ein Einfluss auf die Faktoren, die im Kontext mit der Regulation der Zellabwehr und der Immunantwort stehen, beobachtet werden. Reprimiert wurden dagegen Gene, die der mesenchymalen Zelldifferenzierung und RNA-Biosyntheseprozessen zugeordnet werden konnten.

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Datenbank findet Verwendung, um ein höheres Verständnis von komplexen Strukturen in biologischen Prozessen zu erlangen. Die KEGG-Signalweganalyse wurde mit Hilfe der *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* Software für LBPS03-induzierte Gene durchgeführt. Für LBPS03 konnte festgestellt werden, dass der p53-Signalweg signifikant induziert wird, in dem 18 Gene direkt am Signalweg beteiligt sind. Unter den 18 p53-induzierbaren Genen wurden auch Gene identifiziert, die in einem negativen Feedback-Loop ebenfalls zu einer verstärkten Expression von p53-Inhibitoren wie *MDM2* und *MDM4* führen. Das Gen *Damage specific DNA binding protein 2 (DDB2)*, welches bei der DNA-Reparatur von UV-induzierter DNA-Schädigung eine wichtige Funktion übernimmt (KEENEY et al., 1993), wurde unter LBPS03-Einfluss im Affymetrix Array um den Faktor 1,56 induziert (vgl. Tab. 7). Das *Ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B (RRM2B)*-Gen sowie *Fas* und *CDKN1A* wurden ebenfalls durch LBPS03 verstärkt exprimiert. Das Gen *Fas* kodiert für das Fas-beziehungsweise CD95-Rezeptorprotein. Das LBPS03-induzierte Gen *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b (TNFRSF10B)*, welches für das Protein TRAIL-R2 kodiert, besitzt eine intrazelluläre Todesdomäne und vermittelt die Apoptose. Das Protein ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und induziert Apoptose durch Bindung eines Liganden (TNFSF10/TRAIL/APO-L2) an seinen Rezeptor (WALCZAK et al., 1997).

In Abbildung 20 wird schematisch der p53-Signalweg abgebildet. Die roten Sterne markieren die Gene, die unter LBPS03-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle induziert wurden. Die verstärkte Expression der Gene fördert verschiedenste Zellprozesse wie Apoptose oder DNA-Reparatur. Die Expression der Gen *CDKN1A* und *Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (Gadd45)* leiten dagegen den Zellzyklus-Arrest ein.

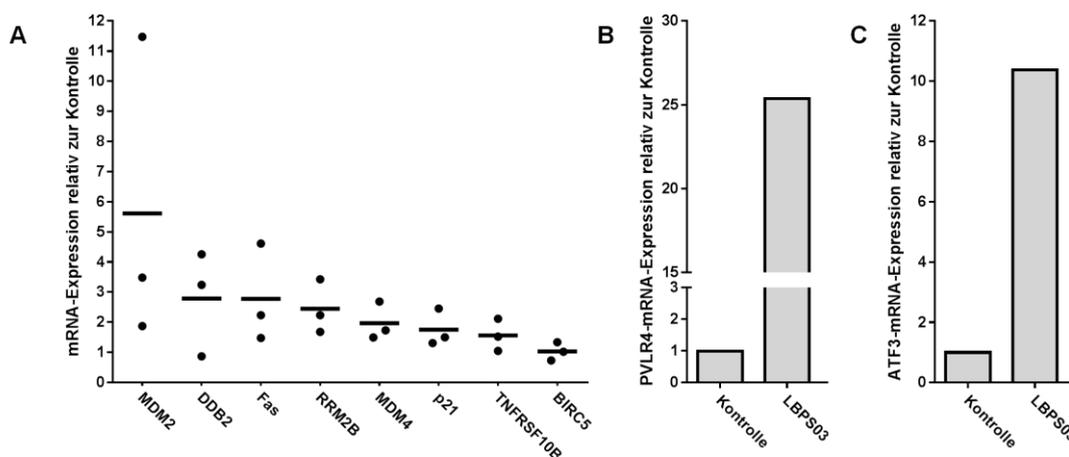


Abbildung 21: Relatives mRNA-Expressionsprofil in LBPS03-behandelten ClearCa-2-Zellen. **A)** Die relative mRNA-Expression der durch LBPS03-induzierten Gene ergibt sich aus dem $\Delta\Delta C_t$ -Wert und bezieht sich auf die Expression des „Housekeeping“-Gens GAPDH. Für die Real-Time-PCR-Analysen wurde dieselbe Gesamt-RNA verwendet wie für die Affymetrix-Analysen. ClearCa-2-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (0,1% DMSO) und unter LBPS03-Einfluss (10 μ M) über 24 Stunden kultiviert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Gesamt-RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben und in drei unabhängigen Versuchen, die relative mRNA im Vergleich zur Kontrolle, durch Real-Time-PCR-Analysen verifiziert. **A)** Im Dot Plot sind auf der x-Achse die untersuchten Gene aufgeführt, die y-Achse beschreibt die x-fache Zunahme der relativen Expression der mRNA im Vergleich zur Kontrolle. Die drei Messpunkte jedes Gens stehen für je einen unabhängig durchgeführten Versuch. Der Strich symbolisiert den ermittelten Mittelwert ($n=3$). **B)** mRNA-Expressionslevel von zwei Kontrollgenen, die durch LBPS03 in ClearCa-2 besonders stark exprimiert wurden. Die Gene ATF3 und PVLR4 wurden als interne Kontrolle verwendet ($n=1$).

Der Zelltod-Aktivator LBPS03 förderte den Anstieg der *MDM2*-Expression um den Faktor 5,6. Für die beiden p53-induzierbaren Gene *RRM2B* und *Fas* konnte das Expressionsniveau auf 2,78 angehoben werden. Mit Ausnahme von *BIRC5* konnte für alle untersuchten Gene ein Anstieg im mRNA-Expressionsniveau nachgewiesen werden. Ziel der semiquantitativen Untersuchungen war die Verifizierung der Affymetrix-Daten. In Real-Time-PCR-Analysen konnte die Beobachtung bestätigt werden, dass *PVLR4* und *ATF3* um den Faktor 25,8 und 10,8 induziert wurden (Abbildung 21 B + C).

Da beide verwendeten Methoden mit derselben Gesamt-RNA arbeiteten, konnten die Daten miteinander verglichen werden. Die Tabelle 8 stellt vergleichend die Ergebnisse der Expressionsanalysen beider verwendeten Methoden aus LBPS03-behandelten Zellen dar. Die LBPS03-induzierten Gene werden absteigend nach ihrer x-fachen Zunahme im Expressionsniveau basierend auf den Ergebnissen der Real-Time PCR aufgelistet. Beide Methoden bestätigen den regulatorischen Einfluss durch LBPS03 auf Apoptose-relevante Gene. Zwei weitere interessante Gene, die im Affymetrix Array als LBPS03-induzierbar identifiziert wurden, sind die Gene *Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3 (TNFAIP3)*, welches für das antiapoptotische Protein A20 kodiert, und *PIDD*.

Tabelle 8: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus der LBPS03-induzierten Gene durch die beiden verwendeten Methoden der Affymetrix-Whole-Transcript-Expression-Profilierung-Analyse sowie der Real-Time-PCR-Untersuchungen. In der Tabelle werden die mRNA-Expressionslevel, die durch LBPS03 in ClearCa-2-Zellen um das x-fache höher reguliert wurden als in kontrollbehandelten Zellen dargestellt, für die Affymetrix-Analyse wurde der höchste ermittelte Wert aufgeführt (n=1), für die Real-Time-PCR-Daten der Mittelwert (n=3); *n.d.* = not done

Gen	Affymetrix (höchster Wert)	Real-Time PCR (Mittelwert)
<i>MDM2</i>	5,12	5,61
<i>DDB2</i>	1,65	2,79
<i>Fas (CD95)</i>	1,89	2,77
<i>RRM2B</i>	1,63	2,45
<i>MDM4</i>	1,88	1,96
<i>PIDD</i>	1,88	<i>n.d.</i>
<i>CDKN1A</i>	3,36	1,75
<i>TNFRSF10B</i>	1,59	1,56
<i>TNFAIP3</i>	3,77	<i>n.d.</i>
<i>BIRC5</i>	1,76	1,03
Positivkontrollen		
<i>ATF3</i>	12,00	10,36
<i>PVRL4</i>	22,94	25,37

Basierend auf den Erkenntnissen, dass LBPS03 einen beträchtlichen Einfluss auf die Induktion proapoptotischer Gene und insbesondere auf p53-induzierbare Gene besitzt, wurden Western-Blot-Analysen zum Nachweis des Proteinniveaus des Tumorsuppressors p53 durchgeführt. Die Stimulation mit LBPS03 erfolgte über 24 Stunden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

In Abbildung 22 A wird die konzentrationsabhängige Zunahme von p53 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 abgebildet. Unter Kontrollbedingungen wurde p53 sehr gering in ClearCa-2-Zellen exprimiert, sodass nur eine sehr schwache Bande im Western Blot bei 53 kDa detektiert werden konnte. Konzentrationsabhängig bewirkte LBPS03 einen signifikanten Anstieg des p53-Proteinlevels. Bereits eine Konzentration von 10 μM führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression auf $621,5 \pm 178,6\%$. Eine LBPS03-Konzentration von 30 μM induzierte eine knapp 10-fache Verstärkung der p53-Expression im Vergleich zur Kontrolle, sodass bereits nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden die Expression auf $997,6 \pm 190,7\%$ anstieg.

Obwohl eine p53-Aktivierung die transkriptionelle Induktion von p21 in LBPS03-behandelten Zellen förderte, wurde in Western-Blot-Analysen die signifikante Abnahme der p21-Proteinexpression in Folge eines LBPS03-Stimulus nachgewiesen. Eine LBPS03-Konzentration von 10 μM verminderte das p21-Expressionsniveau signifikant um $53,2 \pm 11,5\%$, eine Konzentration von 30 μM reduzierte den Proteinlevel um $60,0 \pm 7,0\%$.

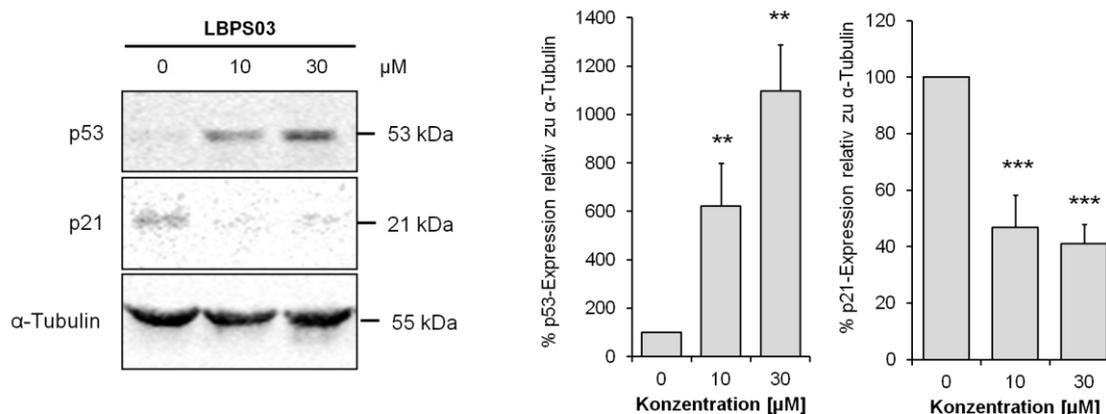


Abbildung 22: Western-Blot-Analysen zur Expression von p53 und p21 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 in ClearCa-2-Zellen. ClearCa-2-Zellen wurden mit einer 10 μM- und einer 30 μM-LBPS03-Lösung behandelt. Die Zellyse und Proteinextraktion erfolgten nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden. Auf einer 12%-igen SDS-PAGE wurden 50 μg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch Western-Blot-Analysen detektiert. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der ImageStudio Software von LI-COR. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin verwendet. Die Quantifizierung der Proteinbande bezieht sich auf die Expression des Zielproteins in kontrollbehandelten (0,1% DMSO) ClearCa-2-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Affymetrix-Daten wiesen darauf hin, dass das Gen *P53-induced protein with a death domain (PIDD)* durch LBPS03 um den Faktor 1,88 induziert werden konnte (vgl. Tab. 8). Da intrazelluläre Caspaseassays darauf hindeuteten, dass LBPS03 die Aktivierung der Effektorcaspasen-2 hervorruft (vgl. Abb. 11), sollte in Western-Blot-Analysen der potentielle Einfluss von LBPS03 auf die Expression von PIDD und damit eine mögliche Aktivierung über den PIDDosom-Komplex untersucht werden. In kontrollbehandelten Zellen konnten zwei PIDD-Formen detektiert werden. Eine PIDD-Form wurde bei etwa 75 kDa nachgewiesen, eine weitere bei 60 kDa.

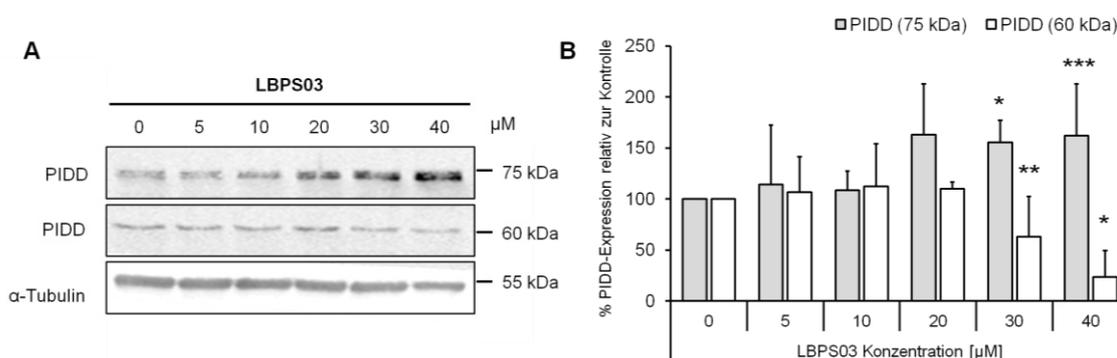


Abbildung 23: Western-Blot-Analysen zum Einfluss von LBPS03 auf die PIDD-Expression in ClearCa-2-Zellen. A) Die klarzellige Nierenzellkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 wurden mit verschiedenen LBPS03-Konzentrationen behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für Western-Blot-Analysen aufgearbeitet. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 50 μg Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der ca. 75 kDa und 60 kDa PIDD-Isoformen wurde durch den Antikörper LRDD-Antikörper (Abcam) bestätigt. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der ImageStudio Software von LI-COR. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin verwendet. B) Die Quantifizierung der Proteinbande bezieht sich auf die Expression des Zielproteins in kontrollbehandelten ClearCa-2-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Der in Abbildung 23 dargestellte Western Blot zeigt repräsentativ die konzentrationsabhängige Zunahme des Proteins PIDD-FL und die Reduktion der PIDD-C-Form. Die Applikation der verschiedenen LBPS03-Konzentrationen erfolgte über 24 Stunden. Die verwendeten Konzentrationen von 20 μM bis 40 μM bewirkten eine signifikante Zunahme der PIDD-FL-Proteinexpression um $55,4 \pm 21,9\%$ und um $62,9 \pm 50,1\%$. Trotz der großen Standardabweichungen lässt sich innerhalb der unabhängig durchgeführten Versuche eine deutlich steigende Tendenz in der Proteinexpression von PIDD-FL erkennen. Die PIDD-C-Form wurde durch eine 40 μM -LBPS03-Konzentration degradiert und bewirkte eine signifikante Abnahme der Proteinmenge um $76,4 \pm 25,8\%$.

3.8.3. LBPS03 induziert mitochondriale Apoptose

Die effektive Wirkung des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf die Aktivierung von p53 in ClearCa-2-Zellen impliziert die Frage, inwieweit der intrinsische Signalweg über die Mitochondrien in der LBPS03-vermittelten Apoptose eine Rolle spielt. LBPS03 fördert nicht nur die Abnahme der Proteinkonzentration von XIAP und die damit einhergehende Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3/-7, sondern unterstützt auch die verminderte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und die Initiierung der Transkription der Gene *PUMA* und *NOXA* (vgl. Abb. 20). Die beiden zuletzt beschriebenen Ereignisse könnten eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials bewirken und damit die Freisetzung von Smac und Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum der Mitochondrien veranlassen. Im folgenden Experiment soll der Einfluss von LBPS03 auf die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe des „Mitochondrial Apoptosis Staining Kit“ (PromoKine) untersucht werden.

Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff MitoCapture liegt im Zytoplasma als grünes Monomer vor, wohingegen er in intakten Mitochondrien akkumuliert und aggregiert und ein leuchtend rotes Fluoreszenzsignal emittiert. Bricht das mitochondriale Membranpotential in Folge eines Apoptosestimulus zusammen, kann der Farbstoff nicht mehr in den Mitochondrien akkumulieren und lässt sich nur noch im Zytoplasma als grüner Farbstoff nachweisen. Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Analysen können qualitative Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential unter LBPS03-Einfluss gut visualisiert werden, wohingegen quantitative Auswertungen am Durchflusszytometer bestimmt wurden. Die Abbildung 24 demonstriert eine LBPS03-induzierte Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials in ClearCa-2-Zellen, die unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht auf eine Bid-Spaltung zurückzuführen ist.

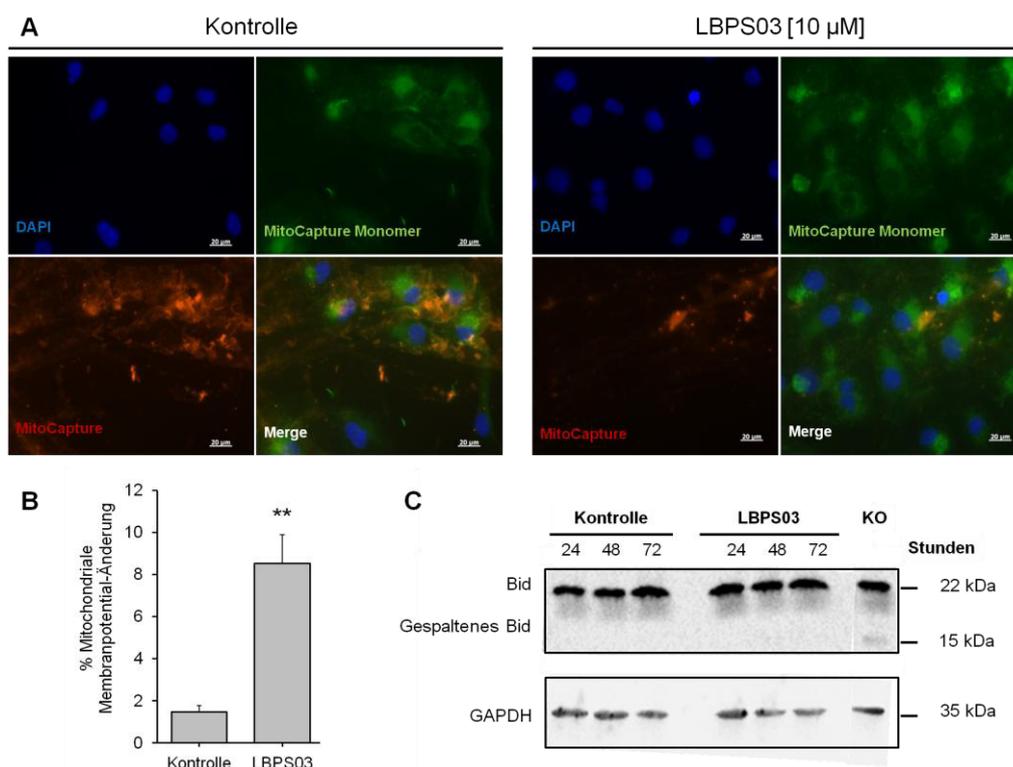


Abbildung 24: Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf das mitochondriale Membranpotential und das proapoptische Protein Bid.

A) ClearCa-2-Zellen wurden über 48 Stunden unter Kontrollbedingungen (0,1% DMSO) und LBPS03-Einfluss (10 μ M) auf Deckgläschen kultiviert und die Zellen mit Hilfe des Mitochondrial Apoptosis Staining Kit für fluoreszenzmikroskopische Analysen vorbereitet. Die Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop generiert und durch das Programm AxioVision verarbeitet. DAPI-haltiges Eindeckelmedium wurde verwendet, um Zellkerne blau zu färben. MitoCapture als Monomer fluoresziert im Zytoplasma (grün) und aggregiert in Mitochondrien gesunder Zellen als roter Fluoreszenzfarbstoff (n=3). **B)** ClearCa-2-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (0,1% DMSO) und LBPS03-Einfluss (10 μ M) über 72 Stunden behandelt und die Zellen für durchflusszytometrische Analysen durch das Mitochondrial Apoptosis Staining Kit vorbereitet. Die x-Achse beschreibt die Zunahme des grünen MitoCapture-Monomers im Zytoplasma und wurde im FL1-Kanal bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. **C)** ClearCa-2 Zellen wurden mit 10 μ M LBPS03 über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden stimuliert und die Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet. Auf einer 15%-igen SDS-PAGE wurden 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot wurde Bid durch einen Anti-Bid-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurden 50 μ g Gesamtprotein, isoliert aus Etoposide-behandelten Jurkat-Zellen, aufgetragen. Jurkat-Zellen wurden über 6 Stunden mit 50 μ M Etoposide behandelt und die Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet. Die Proteinlysate wurden mir freundlicherweise von Franca Bergfelder zur Verfügung gestellt. KO=Jurkat-Zellen behandelt mit Etoposide in 50 μ M über 6 Stunden (n=3).

Die Abbildung 24 A zeigt repräsentativ Fluoreszenzbilder, die Aussagen zum mitochondrialen Membranpotential in kontroll- und LBPS03-behandelten Zellen ermöglichen. In gesunden Zellen, wie hier unter Kontrollbedingungen, lag der MitoCapture-Farbstoff als grünes Monomer im Zytoplasma vor, konnte aber zugleich in gesunden Mitochondrien akkumulieren und emittierte ein leuchtend rotes Fluoreszenzsignal. In Folge eines LBPS03-Stimulus wiesen die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität des rot emittierenden Farbstoffs darauf hin, dass LBPS03 eine Veränderung des Membranpotentials bewirkte. In LBPS03-behandelten Zellen nahm das grüne Fluoreszenzsignal im Zytoplasma zu, wohingegen der rote Farbstoff nur noch vereinzelt nachgewiesen werden konnte.

Die durchflusszytometrischen Analysen, die in Abbildung 24 B dargestellt werden, bestätigten die qualitativen Untersuchungen zur Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden induzierte LBPS03 eine Verstärkung in der Fluoreszenzintensität des grünen MitoCapture-Farbstoffes von $1,5 \pm 0,3\%$ auf $8,5 \pm 1,4\%$. Obwohl LBPS03 die Aktivierung der Caspase-8 förderte, konnte unter verwendeten experimentellen Bedingungen keine Bid-Spaltung in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden.

3.8.4. Durch LBPS03 werden Phosphatidylserine an die äußere Membran transloziert

Die Translokation von Phosphatidylserinen an die äußere Plasmamembran dient zur Kennzeichnung apoptotischer Zellen, um von Makrophagen erkannt und eliminiert zu werden. Die Auslagerung von Phosphatidylserinen an die äußere Membranseite kann durch eine Annexin-V-Färbung im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

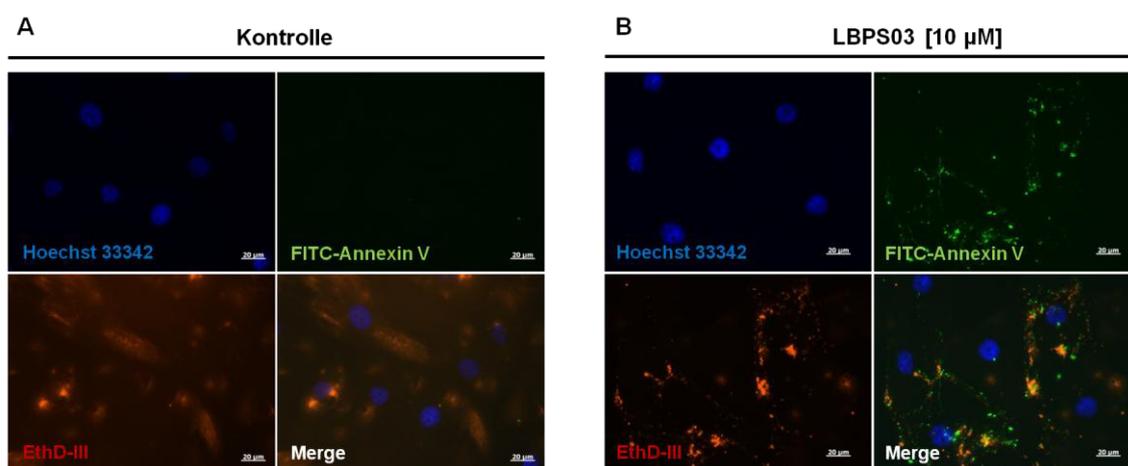


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zum Nachweis von translozierten Phosphatidylserinen. A) ClearCa-2-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (0,1% DMSO) und unter LBPS03-Einfluss (10 µM) über 72 Stunden kultiviert und die Zellen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durch das „Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit“ von PromoKine vorbereitet. In apoptotischen Zellen bindet Annexin V (grün) an die translozierten Phosphatidylserinen der äußeren Membran. FITC-Annexin V emittiert bei einer Wellenlänge von 514 nm ein grünes Fluoreszenzsignal. Nekrotische Zellen verlieren ihre zelluläre Plasmamembranintegrität, sodass der Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Homodimer III in die DNA interkalieren kann und ein leuchtend rotes Fluoreszenzsignal bei 617 nm aussendet. Der Farbstoff ist impermeabel für gesunde oder apoptotische Zellen. Der DNA-Farbstoff Hoechst33342 emittiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 461 nm und wird zur Kernfärbung der kompletten Zellpopulation verwendet. Spätapoptotische Zellen weisen sowohl eine Grün- sowie eine Blaufärbung auf, wohingegen Zellen, bei denen alle drei Farbstoffe auftreten, als tote Zellen identifiziert werden können, die sich von einer apoptotischen Zellpopulation herleiten (n=3).

Zum Nachweis Annexin-V-positiver Zellen wurde das „Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit“ (PromoKine) verwendet. In diesem Kit wird auf drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zurückgegriffen, die eine Differenzierung zwischen apoptotischen, sekundären nekrotischen und gesunden Zellen ermöglicht.

Die Abbildung 25 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Translokalisierung von Phosphatidylserinen an die äußere Plasmamembran in LBPS03-stimulierten Zellen. Unter Kontrollbedingungen wurden keine Annexin-V-positiven Zellen detektiert, wohingegen unter Zugabe von LBPS03 ein deutliches Fluoreszenzsignal im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen war. Entlang der Plasmamembran bindet Annexin V an translozierte Phosphatidylserine. Zumeist trat translokalisiert eine Annexin-V-Färbung mit EthD-III-positiven Zellen auf. Doppelt positive LBPS03-behandelte Zellen weisen auf eine tote Population hin, was einem apoptotischen Schicksal zu Grunde lag. Unter Kontrollbedingungen weisen vereinzelte Zellen eine EthD-III positive Färbung auf, die möglicherweise auf die Effekte des Lösungsmittels zurückzuführen sind.

3.8.5. Hinweis auf die Unterdrückung einer LBPS03-induzierten PARP-Spaltung durch die Verwendung des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK

Einige Untersuchungen dieser Arbeit weisen deutlich auf eine LBPS03-induzierte p53-Aktivierung und die damit einhergehende Initiierung der Apoptose hin. In Abbildung 18 konnte bereits gezeigt werden, dass Caspasen durch LBPS03 zeitabhängig initiiert werden und ex aequo durch die Verwendung des pan-Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK gehemmt werden. Die Wirkung des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK in Kombination mit dem Zelltod-Aktivator LBPS03 auf das Zellüberleben wurde im nachfolgenden Experiment untersucht. Des Weiteren sollte der Einfluss des Caspaseinhibitors auf die LBPS03-induzierte p53-Aktivierung und die PARP-Spaltung mittels Western-Blot-Analysen überprüft werden.

Das Zellüberleben von ClearCa-2-Zellen wurde nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden unter Kontrollbedingungen und unter Verwendung des Zelltod-Aktivators LBPS03 in Kombination mit Z-VAD-FMK und dem RIP1-Inhibitor Nec-1 bestimmt. Für die Western-Blot-Analysen wurden ClearCa-2-Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden mit LBPS03 in einer Konzentration von 10 μ M stimuliert. Parallel wurden unter angewandten experimentellen Bedingungen vergleichbare Proben unter Zugabe des Caspaseinhibitors generiert. Abbildung 26 A dokumentiert das Zellüberleben von ClearCa-2-Zellen unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 in Kombination mit Z-VAD-FMK und Nec-1. In LBPS03-stimulierten Zellen konnte das Zellüberleben im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen signifikant auf $24,1 \pm 4,9\%$ reduziert werden. Der Caspaseinhibitor allein beeinflusste das Zellüberleben nur marginal und verringerte das Überleben um $8,5 \pm 0,6\%$. Eine kombinatorische Applikation der beiden Substanzen stabilisierte das Überleben der Zellen signifikant um 24,1% im Vergleich zu LBPS03-stimulierten Zellen. Da die Apoptose

durch den Caspaseinhibitor spezifisch blockiert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass in LBPS03-stimulierten Zellen unter Zugabe des Z-VAD-FMK eine alternative Form des Zelltodes induziert wird.

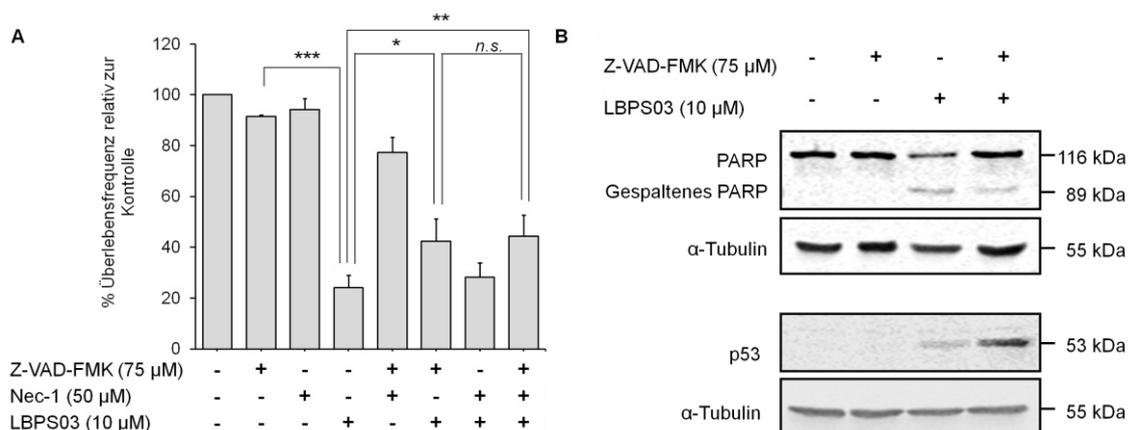


Abbildung 26: Wirkung von LBPS03 in Kombination mit Z-VAD-FMK auf das Zellüberleben und die Proteinlevel von PARP und p53. **A)** ClearCa-2-Zellen wurden über einen Behandlungszeitraum von 72 Stunden mit LBPS03 stimuliert. Parallel dazu wurden die stimulierten Zellen mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK oder dem Nekroptoseinhibitor Nec-1 behandelt. Letztlich wurden alle drei Komponenten zusammen getestet. Auf der x-Achse ist das Zellüberleben dargestellt, die y-Achse kennzeichnet die verwendeten Substanzen jeder Probe. Mittels Proliferationsanalysen konnte das Zellüberleben quantifiziert werden. Das relative Zellüberleben bezieht sich auf das Zellüberleben unter Kontrollbedingungen (0,56% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. **B)** Detektion der PARP-Spaltung und p53-Induktion durch LBPS03-Einfluss in Kombination mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK. Die Substanzen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden appliziert und die Proben für Western-Blot-Analysen aufgearbeitet. Für den Nachweis der PARP-Spaltung wurden 20 μ g Gesamtprotein auf einer 8%-igen SDS-PAGE aufgetragen (n=3). Zur Detektion der p53-Expression wurden 50 μ g Gesamtprotein auf einer 10%-igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt (n=2). Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der ImageStudio Software von LI-COR. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

Ein aktuell viel diskutierter Caspase-unabhängiger Zelltodmechanismus ist die Nekroptose. Vergleichbar zur Apoptose handelt es sich bei der Nekroptose ebenfalls um eine programmierte Form des Zelltodes. Ein wichtiges Molekül dieses Signalweges ist die Kinase RIP1, welche durch das Necrostatin-1 inhibiert werden kann. Werden Caspasen in LBPS03-stimulierten Zellen blockiert, besteht die Möglichkeit eines RIP1-abhängigen Zelltodschicksals. Um dieses Szenario auszuschließen, wurde der RIP1-Inhibitor zusätzlich appliziert. Die Proliferationsanalysen ergaben jedoch, dass die kombinatorische Anwendung des Zelltod-Aktivators LBPS03 mit Nec-1 zu keinen signifikanten Änderungen im Zellüberleben im Vergleich zu LBPS03-stimulierten Zellen führte. Auch die Kombination aus LBPS03, Nec-1 und Z-VAD-FMK steigerten das Zellüberleben im Vergleich zu der Kombination aus LBPS03 und Z-VAD-FMK nicht signifikant. Diese Untersuchungen zeigen, dass der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK das Zellüberleben von LBPS03-behandelten Zellen nur geringfügig retten kann.

Im Hinblick auf die Fähigkeit des Caspaseinhibitors, eine LBPS03-abhängige Aktivierung der Caspasen zu unterdrücken, sollte im Folgenden die Hemmung der Caspasen auf Western-Blot-Ebene untersucht werden. Wie bereits gezeigt werden konnte, induziert LBPS03 eine Caspase-3-abhängige Spaltung seines Substrats PARP (vgl. Abb. 12 C). Unter Einfluss des Caspaseinhibitors wurde eine deutlich verminderte Bandenintensität des PARP-Spaltprodukts (Abb. 26 B) in LBPS03-stimulierten Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse untermauern die Analysen der intrazellulären Caspaseassays, dass Caspase-3 unter Zugabe des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK in LBPS03-stimulierten Zellen signifikant gehemmt werden kann. Die durchgeführten Western-Blot-Analysen deuten darauf hin, dass eine LBPS03-induzierte Caspase-3-abhängige PARP-Spaltung durch den Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK aufgehoben werden kann.

Western-Blot-Analysen aus Kapitel 3.8.2 zeigten bereits eine starke Induktion der p53-Expression nach LBPS03-Stimulation, die ebenfalls dazu führt, dass p53-abhängige Gene induziert werden konnten (vgl. Abb. 20). Die in Abbildung 26 B durchgeführten Western-Blot-Analysen dokumentieren erneut die verstärkte Expression des Tumorsuppressors p53 unter LBPS03-Einfluss nach 72 Stunden. Die Bandenintensität des Proteins p53 nahm im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen um das 12-fache zu. Durch die Kombination aus LBPS03 und dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK konnten erste Hinweise auf eine Zunahme der p53-Proteinexpression auf Western-Blot-Ebene nachgewiesen werden. Bezogen auf die Expression der Kontrolle wurde das Protein auf $2115,8 \pm 897,1\%$ hochreguliert und zeigte damit eine doppelt so starke Expression wie in LBPS03-Einzelbehandlung. In Abbildung 26 B wird ein Western Blot dargestellt, in dem die Zunahme der p53-Stabilisierung unter Verwendung des Zelltod-Aktivators LBPS03 und des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK besonders deutlich zu erkennen ist.

3.8.6. LBPS03 bewirkt eine Stabilisierung der Kinase RIP1 und aktiviert den NF- κ B-Signalweg

Der TNF-Rezeptor vermittelt eine Vielzahl von Signalen, die in unterschiedlichen Zellschicksalen münden. VANDEN BERGHE und Kollegen (2015) bezeichnen TNF als „Masterregulator für Entzündungs- und Zelltodmechanismen“. Die Aktivierung des TNF-R1 führt zu einer NF- κ B-Aktivierung durch die Formierung des Komplex I, in dem RIP1 eine wichtige Rolle spielt. Welchen Einfluss LBPS03 auf RIP1 und NF- κ B-Expression besitzt, sollte nachfolgend durch Western-Blot-Analysen untersucht werden.

Konzentrationsabhängig wurde LBPS03 über 24 Stunden auf ClearCa-2-Zellen appliziert und Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet. Die Abbildung 27 zeigt die leichte, konzentrationsabhängige Zunahme der RIP1-Proteinmenge unter Zugabe des Zelltod-Aktivators LBPS03. Die spezifische Proteinbande für RIP1 wurde bei 76 kDa nachgewiesen. Die densitometrischen Auswertungen ergaben, dass die verwendeten Konzentrationen von 5 μM , 20 μM und 40 μM signifikant das Proteinniveau auf $125,1 \pm 16,1\%$, $149,3 \pm 26,9\%$ und $145,3 \pm 26,7\%$ anhoben. Unter Kontrollbedingungen wurde eine schwache Bande des gespaltenen RIP1 bei einer Höhe von 45 kDa detektiert. Die verwendeten LBPS03-Konzentrationen von 5 μM und 10 μM bewirkten eine Zunahme der Bandenintensität des RIP1-Spaltprodukts, wohingegen ab einer Konzentration von 20 μM das Spaltprodukt nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen konnte in ClearCa-2-Zellen das Protein RIP3 nur äußerst schwach nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt).

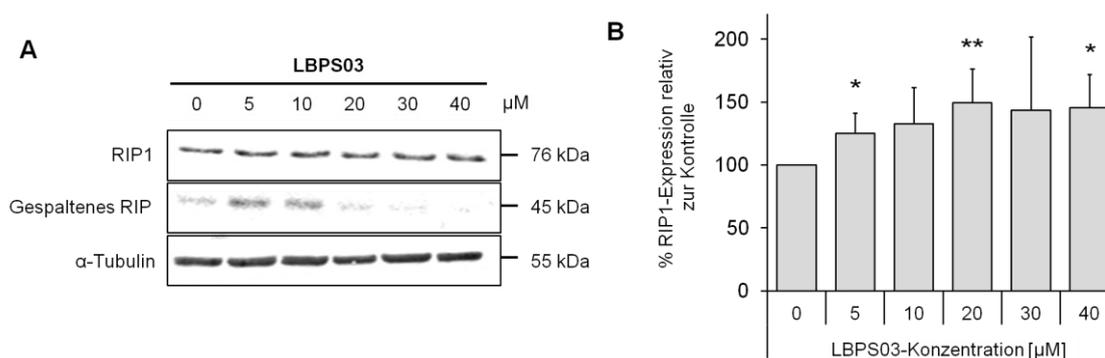


Abbildung 27: Einfluss von LBPS03 auf die Proteinexpression von RIP1 in ClearCa-2-Zellen. ClearCa-2-Zellen wurden mit verschiedenen LBPS03-Konzentrationen behandelt und nach 24 Stunden für Western-Blot-Analysen aufgearbeitet. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 20 μg Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die relative RIP1-Expression bezieht sich auf die Kontrolle (0,1% DMSO) und wurde densitometrisch am Infrarot-Imager bestimmt. Der Nachweis von α -Tubulin dient als Ladungskontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen.

Eine mögliche TNF-vermittelte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch LBPS03 sollte im nachfolgenden Experiment untersucht werden. Die leichte Stabilisierung der Kinase RIP1 durch LBPS03 könnte auf einen TNF-R1-vermittelten Zelltod hindeuten. Konzentrationsabhängig wurde LBPS03 für 24 Stunden auf ClearCa-2-Zellen appliziert und anschließend wurden Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet.

In Abbildung 28 sind die relative $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression sowie die NF- κ B-Expression der nativen sowie der phosphorylierten Form unter LBPS03-Einfluss auf Proteinniveau dargestellt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen förderte LBPS03 eine signifikante Reduktion der Kinase $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Für kontrollbehandelte Zellen konnte eine intensive Proteinbande bei 39 kDa detektiert werden. Im Vergleich dazu bewirkte LBPS03 in einer Konzentrationen von 10 μM

und 30 μM eine signifikante Verminderung des Proteinniveaus um $35,1\pm 15,5\%$ und $45,5\pm 20,3\%$. Die Abbildung 28 B+C zeigt, dass unter Kontrollbedingungen die p65-Untereinheit von NF- κB und seine phosphorylierte Form konstitutiv exprimiert und auch phosphoryliert wurden. Für beide NF- κB -Formen wurde im Western Blot eine Proteinbande bei 65 kDa detektiert. Die starke Expression des NF- κB -p65-Inhibitors I $\kappa\text{B}\alpha$ weist auf eine Hemmung des NF- κB -Signalweges hin, die unter LBPS03-Einfluss aufgehoben werden konnte, indem I $\kappa\text{B}\alpha$ degradiert und NF- κB verstärkt phosphoryliert wurde. Eine Konzentration von 5 μM förderte bereits eine signifikante Zunahme der phosphorylierten Form um $48,6\pm 13,7\%$, die von 10 μM um $42,5\pm 15,3\%$.

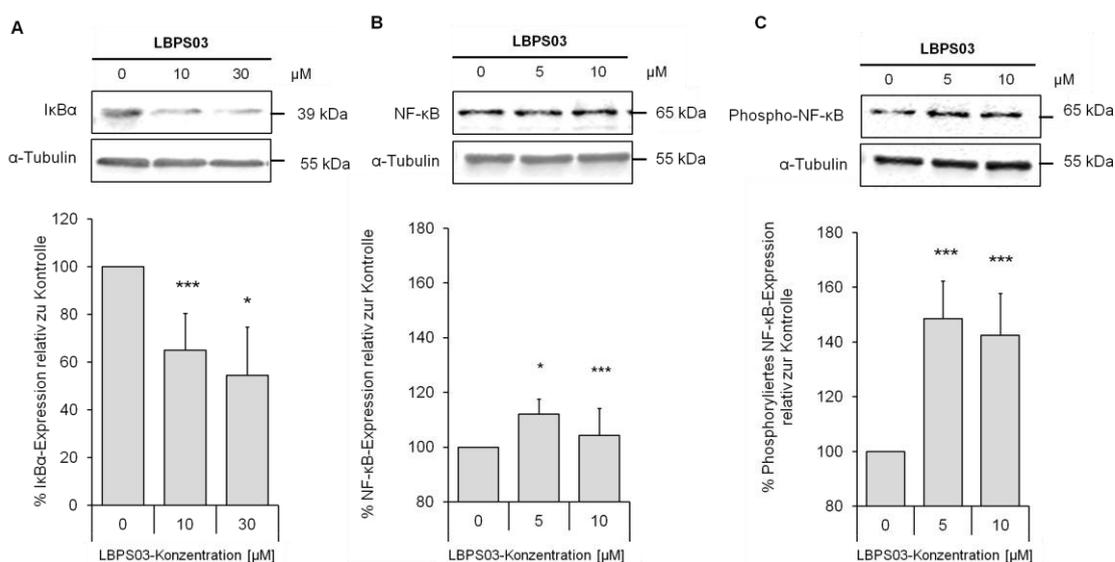


Abbildung 28: Western-Blot-Analysen zum Einfluss von LBPS03 auf die Proteinexpression von I $\kappa\text{B}\alpha$, NF- κB und seiner phosphorylierten Form Phospho-NF- κB . ClearCa-2-Zellen wurden über 24 Stunden mit LBPS03 in den angegebenen Konzentrationen behandelt, die Zellen lysiert und für Western-Blot-Analysen vorbereitet. **A)** Auf einer 12%-igen SDS-PAGE wurden 50 μg Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-I $\kappa\text{B}\alpha$ -Antikörper nachgewiesen. Die x-Achse beschreibt die verwendete Konzentration, die y-Achse die relative Proteinexpression bezogen auf kontrollbehandelte Zellen (0,1% DMSO). Die densitometrische Auswertung wurde mittels Infrarot-Imager bestimmt. Repräsentativer I $\kappa\text{B}\alpha$ -Western-Blot zu den densitometrischen Auswertungen. **B)+C)** Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 20 μg Gesamtprotein aufgetragen und Western-Blot-Analysen mit einem p65-spezifischen NF- κB -Antikörper des phosphorylierten und nichtphosphorylierten Proteins durchgeführt. Die x-Achse beschreibt die verwendete Konzentration, die y-Achse die relative Proteinexpression bezogen auf kontrollbehandelte Zellen (0,1% DMSO). Um die Effekte des Zelltod-Aktivators zu verdeutlichen, beginnt die Achse bei 80%. Die relative Proteinmenge wurde densitometrisch am Infrarot-Imager bestimmt. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LBPS03 den kanonischen NF- κB -Signalweg beeinflusst, indem es den Inhibitor I $\kappa\text{B}\alpha$ degradiert und NF- κB phosphoryliert, das somit die Translokation der p65-Untereinheit in den Nukleus bewirkt und die Transkription induziert. Die Aktivierung des NF- κB -Signalwegs kann die Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen wie A20 und c-FLIP_L (VANDEN et al., 2014), aber auch c-IAPs und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-Familie (VANDEN BERGHE et al., 2015) fördern. In einer

negativen Feedback-Schleife kann A20 daraufhin die K63-Polyubiquitinketten von RIP1 entfernen (WERTZ et al., 2004). Neben A20 fördert CYLD die Entfernung der Polyubiquitinketten von RIP1, das wiederum die Dissoziation der Kinase RIP1 vom TNF-R1 ermöglicht und als dessen Folge sich der DISC-Komplex oder der TRADD-abhängige Komplex Iib formiert (vgl. Abb. 2; zusammengefasst in VANDEN et al., 2014).

Das „Ubiquitin Proteomic Array“ von R&D Systems dient zum Nachweis einer Vielzahl von ubiquitinierten Proteinen. Dieses Array wurde verwendet, um den Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf die Ubiquitinierung Tumor-relevanter Proteine zu analysieren. Posttranslationale Regulationen von Proteinen bewirkten essentielle Veränderungen in Signaltransduktionswegen von Zellen. Sowohl externe als auch interne Signale fördern diese posttranslationalen Modifikationen, die zu einer Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der Proteine führen können. Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, die zur Kennzeichnung von Proteinen führt, die proteosomal abgebaut werden können.

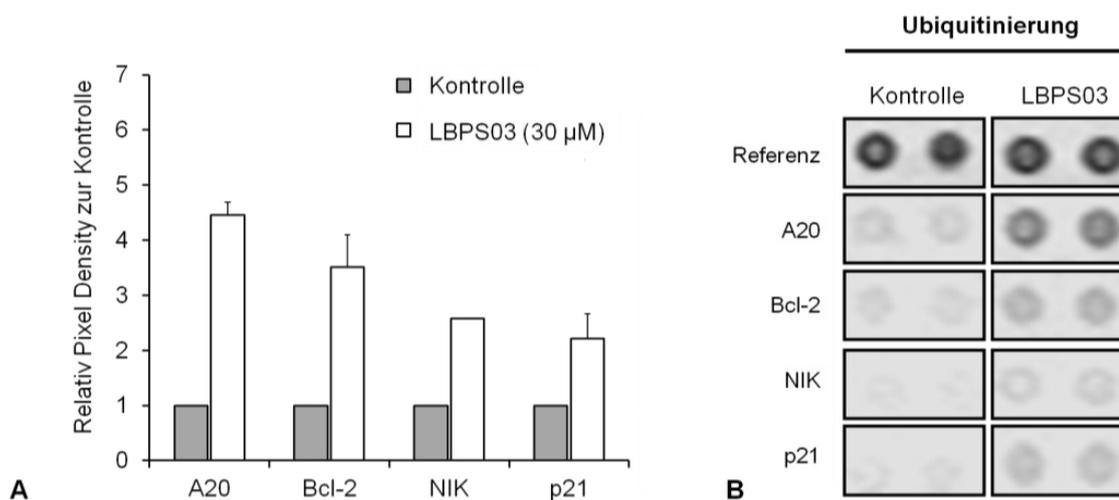


Abbildung 29: Dot-Blot-Analysen zum Ubiquitinierungsstatus ausgewählter Apoptose-relevanter Proteine unter LBPS03-Einfluss. **A)** Die ClearCa-2-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (0,1% DMSO) und in Anwesenheit von 30 µM LBPS03 für 48 Stunden inkubiert und die Zellen für ein Ubiquitin Proteomic Array (R&D System) vorbereitet. 250 µg Gesamtprotein wurden für das Array verwendet. Auf der y-Achse ist die x-fache relative Ubiquitinierung eines Proteins abgebildet. Die relative Ubiquitinierung wurde auf einen Referenzwert normiert und bezieht sich auf die Kontrolle. Die quantitative Ubiquitinierung wurde densitometrisch mittels Infrarot-Imager ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. **B)** Repräsentativer Dot Blot des Ubiquitin Proteomic Array von R&D System zu den quantitativen Analysen unter Kontrollbedingungen und LBPS03-Einfluss.

Die Abbildung 29 B zeigt repräsentativ einen Dot Blot zum Ubiquitinierungsstatus ausgewählter antiapoptotischer Proteine unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03. Als Ladungskontrolle dient ein Assay-spezifisches Referenzprotein, dessen Intensität densitometrisch bestimmt wurde. Die ermittelte relative Pixelintensität einzelner Proteine wurde auf die Ladungskontrolle normiert. Unter Kontrollbedingungen wiesen die Proteine

A20, Bcl-2, NIK und p21 keine bis geringe Ubiquitinierungen auf. Die Applikation des Zelltod-Aktivators LBPS03 gab Hinweise auf eine verstärkte Ubiquitinierung der genannten Proteine in ClearCa-2. Neben der qualitativen Zunahme der Expressionsstärke anhand des Dot Blots führten densitometrische Analysen zu einer quantitativen Aussage, die in Abbildung 29 A dargestellt wurden. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen förderte LBPS03 eine starke Ubiquitinierung für das Protein A20. Das Protein wurde um das $4,5 \pm 0,2$ -fache ubiquitiniert als in vergleichsweise kontrollbehandelten Zellen. Die Expressionsanalysen ergaben zudem, dass die Kinase NIK, die im nicht-kanonischen Signalweg eine entscheidende Rolle spielt, durch LBPS03 um den Faktor $2,6 \pm 0,0$ ubiquitiniert wurde. Auch für das antiapoptotische Protein Bcl-2 konnte eine Veränderung im Ubiquitinierungsstatus beobachtet werden, sodass nach Zugabe des Zelltod-Aktivator, das Protein um das $3,51 \pm 0,59$ -fache ubiquitiniert wurde. Für das Protein p21 wurde eine Zunahme der Ubiquitinierung um 100% detektiert.

3.9. LBPS05 induziert einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod

Da der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS05 im Gegensatz zu LBPS03 keinen Hinweis auf eine Beteiligung zur Apoptosemaschinerie zeigte, sollten die nachfolgenden Untersuchungen die Hypothese überprüfen, ob LBPS05 einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod induziert, da bereits im Vorfeld ein Caspase-unabhängiger Zelltod beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund fanden die beiden Nekroptoseinhibitoren Necrostatin-1 (Nec-1) sowie Necrosulfonamide (NSA) Anwendung. Im Gegensatz zu Nec-1, welches die RIP1-RIP3-Interaktion unterbindet, ist NSA in der Lage, durch seine kovalente N-terminale Bindung an MLKL die Interaktion des Necrosoms mit Downstream-Effektoren zu verhindern (vgl. Abb. 2).

Einige hier nicht dargestellte Experimente zeigten, dass LBPS05 nur in geringem Ausmaß Apoptose-relevante Gene und Proteine beeinflusst, und auch keine signifikante Veränderung im mitochondrialen Membranpotential förderte. Des Weiteren konnte durch LBPS05 keine Translokalisierung von Phosphatidylserine nachgewiesen oder eine Beteiligung von p53 beobachtet werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Identifikation von Komponenten des Signalweges, die zum Zelltod führen.

3.9.1. LBPS05 stabilisiert in ClearCa-2 die zellulären IAPs

Im nachfolgenden Experiment soll der Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf seine potentiellen Zielstrukturen untersucht werden. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um die Wirkung von LBPS05 auf Expressionsebene der Proteine c-IAP1, c-IAP2 und XIAP zu analysieren und Hinweise auf den Einfluss von möglichen Targetstrukturen zu untersuchen. Klarzellige Nierenzellkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 wurden unter Kontrollbedingungen und unter einer konzentrationsabhängigen Zugabe des Zelltod-Aktivators über 24 Stunden stimuliert und die Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet.

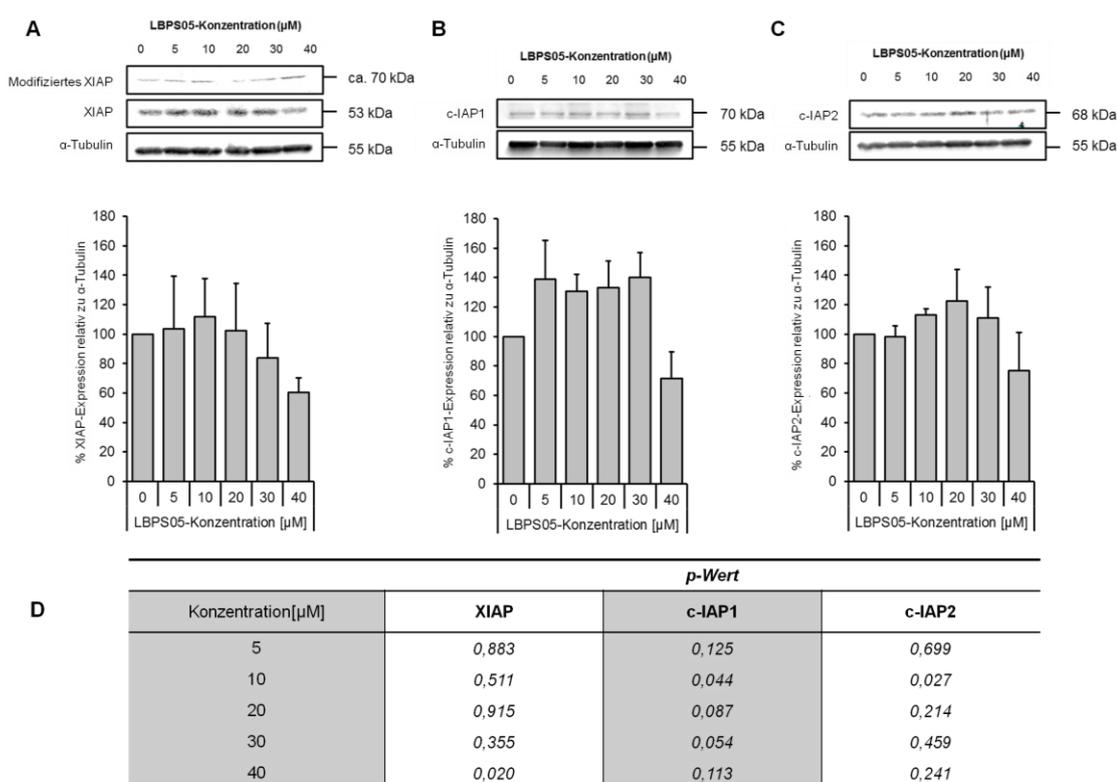


Abbildung 30: Western-Blot-Analyse zur Regulation der IAPs unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS05. Auf den x-Achsen sind die verwendeten Konzentrationen des Zelltod-Aktivators LBPS05 abgebildet. Die y-Achse beschreibt die relative Expression des Zielproteins bezogen auf die Kontrolle (0,1% DMSO). ClearCa-2-Zellen wurden über 24 Stunden mit LBPS05 stimuliert und die Proteine für Western-Blot-Analysen vorbereitet. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit den Primärantikörpern für **A)** XIAP, **B)** c-IAP1 und **C)** c-IAP2 (Santa Cruz) durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte durch die Expression des Proteins relativ zur Ladungskontrolle (α-Tubulin). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. **D)** Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-test und wird tabellarisch unterhalb der Graphen abgebildet.

Abbildung 30 A zeigt die marginale Veränderung im XIAP-Expressionsniveau unter Zugabe des Zelltod-Aktivators LBPS05. Die verwendeten Konzentrationen zwischen 5 µM und 30 µM bewirken keine signifikanten Änderungen im Proteinlevel von XIAP, wohingegen die höchste verwendete Konzentration von 40 µM eine signifikante Reduktion des Proteins XIAP

um $39,5\pm 9,9\%$ im Western Blot förderte. In Abbildung 30 B+C sind die leicht stabilisierenden beziehungsweise induzierenden Effekte des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf die beiden zellulären IAPs dargestellt. Für das antiapoptotische Protein c-IAP1 konnte bereits in geringen Konzentrationen ein stabilisierender beziehungsweise induzierender Effekt auf den Proteingehalt beobachtet werden. Die verwendeten Konzentrationen von $10\ \mu\text{M}$ und $30\ \mu\text{M}$ bewirkten eine signifikante Zunahme der Proteinexpression um $30,7\pm 11,6\%$ und $40,2\pm 16,9\%$ im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen (Abb. 30 B). Die leicht stabilisierenden Einflüsse der Substanz LBPS05 auf die Proteinmengen vom c-IAP2 in geringen Konzentrationen werden in Abb. 30 C dargestellt. Unter den genannten Versuchsbedingungen förderte LBPS05 in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ eine signifikante Induktion beziehungsweise Stabilisierung des Proteins c-IAP2 um $13,2\pm 3,8\%$. In höheren Dosen blieb der stabilisierende Effekt auf das Protein c-IAP2 dagegen aus. Für den Zelltod-Aktivator LBPS05 konnte kein direktes Zielmolekül durch diese Western-Blot-Analysen identifiziert werden.

3.9.2. LBPS05 führt zu einer Induktion von Genen, die im Zusammenhang mit einer Zytokine-Zytokine-Interaktion stehen

Vorhergehende Untersuchungen des neuartigen Zelltod-Aktivators LBPS05 zeigten bereits, dass es sich um einen nichtapoptotischen Zelltod handelt, der Caspase-unabhängig verläuft. Wie bereits für LBPS03 beschrieben, wurde auch für LBPS05 ein Affymetrix „GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0“ in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Für die Analyse wurde Gesamt-RNA aus LBPS05-stimulierten Zellen nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden gewonnen und die Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Versuchen in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen wurden insgesamt 146 Gene unter Zugabe von LBPS05 beeinflusst: 74 Gene wurden mindestens um den Faktor 1,5 induziert und 72 Gene reprimiert.

Die GO-Term-Analysen der biologischen Prozesse in Abbildung 31 zeigen, dass ClearCa-2-Zellen unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS05 sowohl Gene induzierten, wie auch reprimierten, die den Zelltodsignalwegen zugeordnet werden können. Induziert wurden jeweils 10 Gene, die in der „Regulation des Zelltodes“ sowie im „programmierten Zelltod“ eine Funktion übernehmen (Abb. 31 A). LBPS05 scheint jedoch auch die Apoptose und den programmierten Zelltod negativ zu beeinflussen, indem Apoptose-relevante und Zelltod-induzierende Gene reprimiert werden (Abb. 31 B).

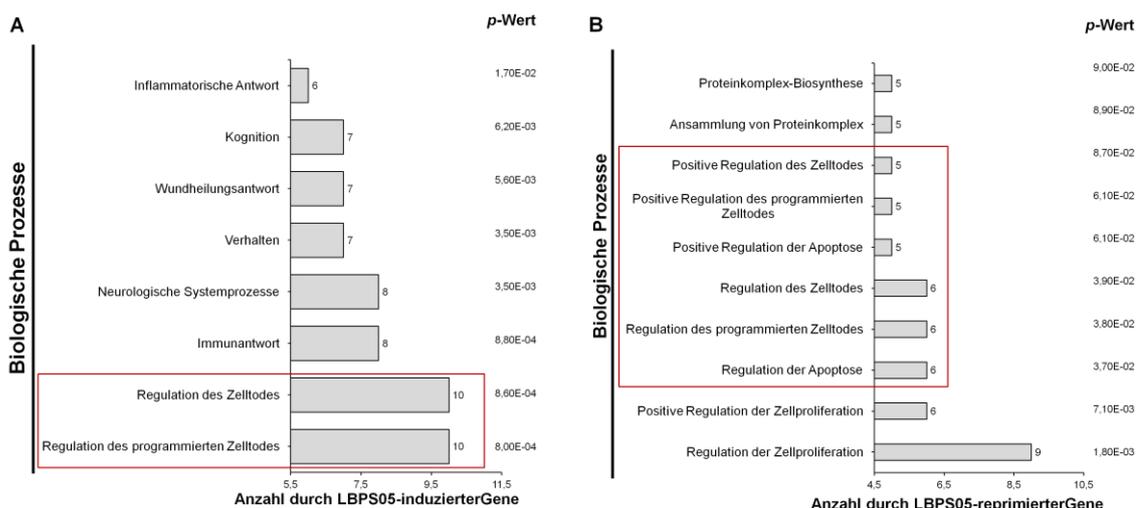


Abbildung 31: "GeneOntology (GO)"-Kriterien von biologischen Prozessen, die in LBPS05-behandelten Zellen reguliert werden. Auf der x-Achse wird die Anzahl der LBPS05-beeinflussten Gene abgebildet. Auf der y-Achse werden die verschiedenen biologischen Prozesse, die durch LBPS05-Zugabe induziert beziehungsweise reprimiert werden, dargestellt, ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einer 10 μ M-LBPS05-Lösung behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Aus drei unabhängigen Versuchen wurde die Gesamt-RNA in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt. Das BMFZ führte mit dem Probenmaterial der Gesamt-RNA ein Whole-Transcript Expression Profiling durch. Gene, die im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 1,5 induziert wurden, wurden zur Identifikation der GO-Kriterien mittels *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* Software verwendet. **A)** GO-Term-Analyse zu den Gen-induzierenden Effekten von LBPS05 in ClearCa-2-Zellen. Biologische Prozesse werden aufgeführt, die mindestens 6 beteiligte Gene aufweisen und durch LBPS05 induziert werden konnten. **B)** GO-Term-Analyse der biologischen Prozesse zu den reprimierenden Effekten des Zelltod-Aktivators LBPS05, die durch mindestens 5 Gene beeinflusst werden. Neben den einzelnen Säulen ist die Anzahl der Gene abgebildet. Für jeden biologischen Prozess berechnet die *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* Software einen p-Wert, der neben den Säulen aufgelistet ist.

Die KEGG-Signalweganalysen, die ebenfalls mit Hilfe der *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* Software durchgeführt wurden, identifizierten zwei Signalwege, die in LBPS05-stimulierten ClearCa-2-Zellen aktiviert wurden. Durch LBPS05 werden in ClearCa-2-Zellen die Transkripte für eine Zytokine-Zytokine-Rezeptor-Interaktion aktiviert sowie der MAPK-Kinase-Signalweg erhöht. Jeweils 5 Gene werden den beiden Signalwegen zugeteilt. *Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)* und *Interleukin-8 (IL8)* wurden als die beiden Gene identifiziert, die durch LBPS05 am stärksten induziert wurden und sind Komponenten des „Zytokine-Zytokine-Rezeptor-Interaktions-Signalwegs“. Die Array-Analyse brachte hervor, dass die Gene *CCL20* und *IL8* in LBPS05-stimulierten Zellen um den Faktor 2,3 und 2,23 im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen induziert werden konnten.

Nachfolgend sollten die durch Affymetrix-Analysen identifizierten Gene *CCL20* und *IL8*, die in Folge eines LBPS05-Stimulus verstärkt exprimiert wurden, durch semiquantitative Real-Time-PCR-Analysen verifiziert werden. Je 1 μ g der Gesamt-RNA der kontrollbehandelten sowie LBPS05-stimulierten Zellen wurde in cDNA transkribiert und eine Real-Time PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Normiert wurde auch hier die Expression eines Zielgens auf die Expression des „Housekeeping-Gene“ GAPDH.

In Abbildung 32 A sind die Einflüsse des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf das mRNA-Expressionsniveau der Gene *IL8* und *CCL20* dargestellt. In dem verwendeten Diagrammtyp steht jeder Punkt für einen Messwert eines unabhängig durchgeführten Versuchs, der die x-fache Zunahme des mRNA-Expressionsniveaus unter Zugabe des Zelltod-Aktivators LBPS05 beschreibt.

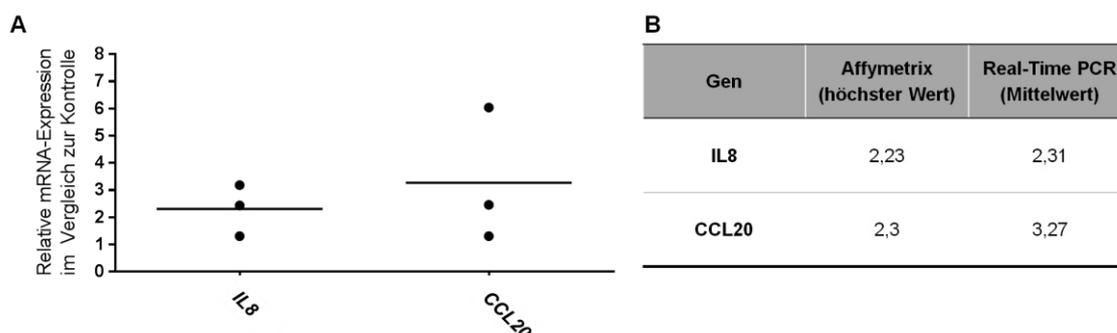


Abbildung 32: Einfluss von LBPS05 auf die mRNA-Expressionslevel von *IL8* und *CCL20*. **A)** Real-Time-PCR-Analysen zur relativen mRNA-Expression von *IL8* und *CCL20* in LBPS05-behandelten ClearCa-2-Zellen. Die relative Expression ergibt sich aus dem $\Delta\Delta Ct$ -Wert und bezieht sich auf die Expression des „Housekeeping“-Gens GAPDH. Die bereits für die Affymetrix Analysen verwendete Gesamt-RNA wurde für Real-Time-PCR-Analysen aufgearbeitet. Die Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Versuchen wurde gewonnen aus ClearCa-2-Zellen, die unter Kontrollbedingungen und LBPS05-Einfluss (10 μ M) über 24 Stunden kultiviert wurden. Die Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Real-Time-Analysen mit Hilfe des IQ5™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) durchgeführt. **A)** Im Dot-Plot sind auf der x-Achse die untersuchten Gene aufgeführt, die y-Achse beschreibt die x-fache Zunahme der relativen Expression der mRNA im Vergleich zur Kontrolle. Die drei Messpunkte jedes Gens stehen für einen Versuchsdurchgang. Der Strich symbolisiert den ermittelten Mittelwert (n=3). **B)** Tabellarischer Vergleich zwischen den Ergebnissen der Unterschiede in der Transkriptmenge aus den Affymetrix Arrays und der Real-Time-PCR-Analysen.

Der Querbalken symbolisiert den ermittelten Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die Real-Time-PCR-Analysen ergaben, dass *IL8* um das 2,31-fache und *CCL20* um das 3,27-fache stärker induziert wurden als vergleichsweise in kontrollbehandelten Zellen. Diese Daten stehen daher in Übereinstimmung mit den Analysen des Affymetrix-Arrays und werden in der Tabelle in Abbildung 32 B vergleichend dargestellt.

3.9.3. Der Zelltod-Aktivator LBPS05 fördert die Stabilisierung von RIP1 und reguliert PIDD

Die Kinase RIP1 stellt ein zentrales Molekül in einigen Rezeptor-vermittelten Signalwegen dar. Abhängig von den vorliegenden Bedingungen und der Signalstärke werden der NF- κ B-Signalweg, die Apoptose, die Nekroptose oder der MAPK-Signalweg aktiviert (FESTJENS et al., 2007). Mittels Western-Blot-Analysen wurde zunächst der konzentrationsabhängige Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf die Kinase RIP1 untersucht. In Abbildung 33 A werden die konzentrationsabhängigen Effekte der Substanz LBPS05 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden dargestellt. Die densitometrischen Auswertungen

ergaben, dass steigende Substanzdosen eine signifikante Zunahme der Proteinmenge bewirkten.

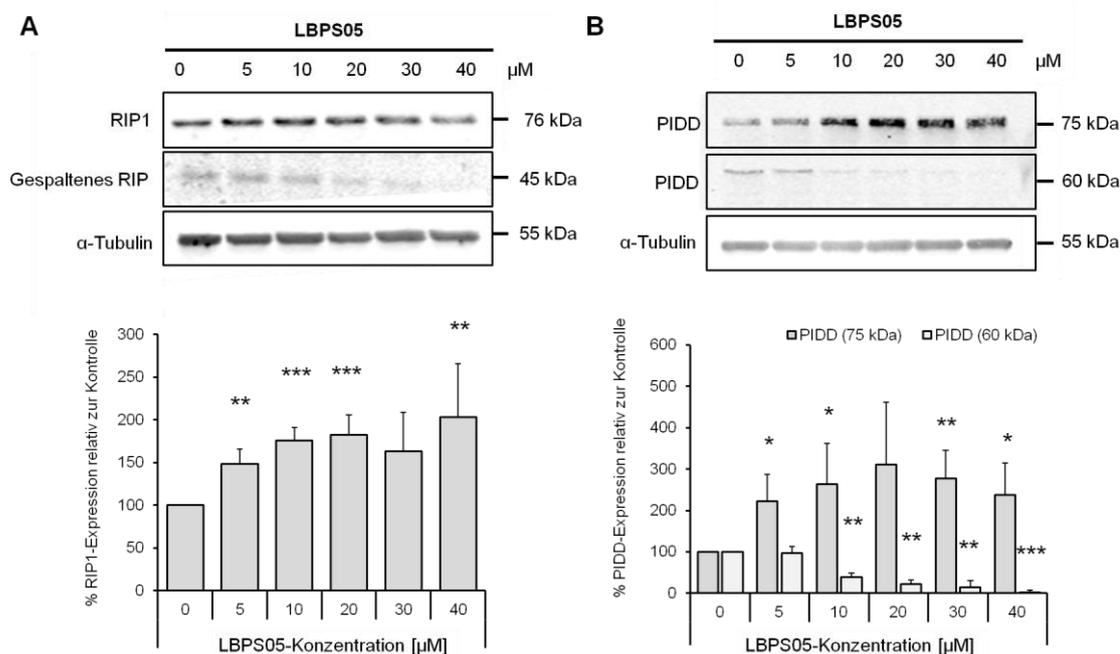


Abbildung 33: Western-Blot-Analysen zur konzentrationsabhängigen Wirkung des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf die Proteine RIP1 und PIDD. ClearCa-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Zelltod-Aktivators LBPS05 stimuliert und die Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet. Auf einer 10%-igen SDS-PAGE wurden für den Nachweis von RIP1 20 µg Gesamtprotein und für die Detektion von PIDD 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. **A)** Die Expression der Kinase RIP1 wurde durch den Antikörper Anti-RIP1-Rabbit (Cell Signaling) analysiert. **B)** Die Detektion der ca. 75 kDa und 60 kDa PIDD-Isoformen wurde durch den Antikörper LRDD-Antikörper (Abcam) bestätigt. Für beide Western-Blot-Analysen wurde α-Tubulin als Ladungskontrolle verwendet. Die relative Expression der Proteine wurde densitometrisch ermittelt und bezieht sich auf die Ladungskontrolle relativ zu der Proteinexpression in kontrollbehandelten Zellen (0,1% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Die verwendeten LBPS05-Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 40 µM förderten in ClearCa-2-Zellen eine signifikante Zunahme der RIP1-Proteinmenge, die mittels Western-Blot-Analysen analysiert wurde. Das Proteinniveau wurde auf $148,2 \pm 17,6\%$, $175,5 \pm 15,7\%$ und $203,4 \pm 62,9\%$ im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen angehoben. Entsprechend der Zunahme der Kinase-RIP1-Expression nahm die gespaltene RIP1-Form (45 kDa) konzentrationsabhängig ab. Die Kinase RIP1 interagiert aber unter anderem auch mit den Proteinen NEMO und PIDD, um eine NF-κB-vermittelte Zellreparatur zu signalisieren. In Abbildung 33 B wird die konzentrationsabhängige Wirkung des Zelltod-Aktivators LBPS05 auf die Expression der PIDD-FL- und PIDD-C-Isoform untersucht. Eine Zunahme der Substanzkonzentration bewirkte in ClearCa-2-Zellen einen Anstieg der Proteinmenge im Western Blot des Proteins PIDD-FL. Die Quantifizierungen der Bandenintensität zeigten, dass die Konzentrationen von 5 µM, 10 µM, 30 µM und 40 µM zu einer signifikanten Zunahme des Proteinniveaus auf $222,8 \pm 65,4\%$, $263,6 \pm 99,0\%$, $277,9 \pm 67,1\%$ und $236,9 \pm 77,4\%$ führten. Obwohl diese Quantifizierungen eine sehr hohe Standardabweichung

aufwiesen, konnte in den drei unabhängig durchgeführten Experimenten eine deutliche Tendenz in der Zunahme des Proteinniveaus nachgewiesen werden. Für die PIDD-C-Isoform konnte unter LBPS05-Einfluss eine klare konzentrationsabhängige Reduktion der Proteinmenge festgestellt werden. Bereits bei einer verwendeten Konzentration von 10 μM wurde das Expressionslevel signifikant auf $38,6 \pm 10,2\%$ reduziert. Zunehmende Substanzkonzentrationen von 20 μM , 30 μM und 40 μM senkten das Proteinniveau weiter auf $21,8 \pm 10,4\%$, $14,9 \pm 15,6\%$ und $1,7 \pm 5,4\%$.

Des Weiteren bewirkte LBPS05 eine leichte Aktivierung des NF- κB -Signalweges. In einer Konzentration von 10 μM induzierte LBPS05 die Expression der phosphorylierten Form nach 24 Stunden um $47,1 \pm 25,0\%$ (Daten hier nicht dargestellt). Unter gleichen Bedingungen wurden keine Änderungen im Expressionsniveau der nativen NF- κB -Form sowie der Kinase I $\kappa\text{B}\alpha$ detektiert. Auch eine deutlich höhere Konzentration von 30 μM LBPS05 führte zu keinem nachweislich regulatorischen Effekt auf das Proteinniveau der Kinase I $\kappa\text{B}\alpha$.

3.9.4. Der MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide verstärkt den LBPS05-induzierten Zelltod in ClearCa-2-Zellen

Da unter LBPS05-Einfluss sowohl Apoptosesignalwege inaktiv bleiben und zugleich der NF- κB -Signalweg nur marginal beeinflusst wurde, könnte die Initiierung der Kinase RIP1 auf eine Beteiligung des Nekroptosesignalweges hindeuten. Für die nachfolgenden Experimente wurden daher zwei neue Inhibitoren des Nekroptosesignalweges, der RIP1-Hemmer Necrostatin-1 (Nec-1) sowie Necrosulfonamide (NSA) als MLKL-Inhibitor, in Kombination mit den beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05, angewandt. Die Untersuchungen sollten zum einen weiter die Hypothese bestätigen, dass LBPS03 die Apoptose induziert, zum anderen, dass LBPS05 möglicherweise einen nekroptotischen Zelltod hervorruft.

Das Zellüberleben von ClearCa-2-Zellen wurde nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden mittels Proliferationsanalysen bestimmt. Die Zellen wurden mit einer 10 μM -LBPS03- oder LBPS05-Lösung stimuliert und in Kombination mit einem der beiden Nekroptoseinhibitoren NSA und Nec-1 angewandt. Die Proliferationsanalysen sollten untersuchen, ob die Kombination beider Substanzen zu einer Wirkverstärkung beziehungsweise Inhibierung von LBPS05 führt. Die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 reduzierten das Zellüberleben nach 72 Stunden um $83,3 \pm 1,1\%$ und $12,3 \pm 3,2\%$. Der RIP1-Hemmer Nec-1 beeinflusste das Zellüberleben in einer Konzentration von 50 μM nicht signifikant und reduzierte das Zellüberleben nur marginal. Auch die

kombinatorische Anwendung der Zelltod-Aktivatoren zusammen mit Nec-1 konnte die Zelltod-aktivierenden Effekte von LBPS03 beziehungsweise LBPS05 weder verstärken noch aufheben.

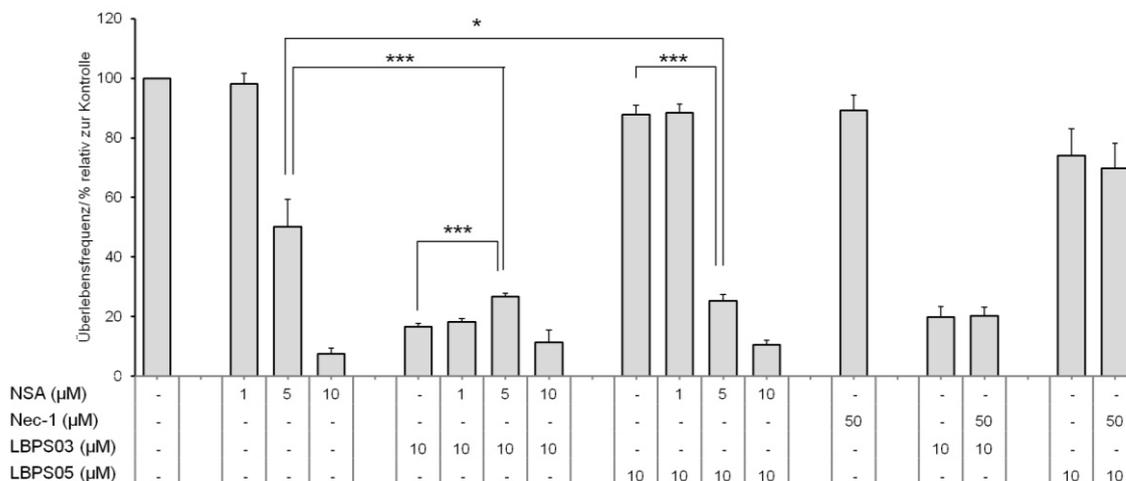


Abbildung 34: Proliferationsanalysen zum Einfluss der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit den Nekroptoseinhibitoren Necrosulfonamide (NSA) oder Necrostatin-1 (Nec-1). ClearCa-2-Zellen wurden mit den Zelltod-Aktivatoren LBPS03 oder LBPS05 in einer Konzentration von 10 µM stimuliert und gleichzeitig wurden der MLKL-Inhibitor NSA oder der RIP1-Hemmer Nec-1 appliziert. Das Zellüberleben wurde 72 Stunden nach Zugabe der Substanzen mittels Proliferationsanalysen am Infrarot-Imager bestimmt. Das relative Zellüberleben bezieht sich auf die kontrollbehandelten Zellen (0,2% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Obwohl das Protein RIP3 in ClearCa-2-Zellen nur sehr schwach exprimiert wird und unter Zugabe einer 10 µM- beziehungsweise 30 µM-LBPS05-Lösung nach 48 Stunden nicht signifikant beeinflusst wurde (Daten hier nicht gezeigt), wies der Inhibitor NSA des RIP3-Substrats MLKL konzentrationsabhängig starke Zelltod-induzierende Effekte hervor (Abb. 34). Die verwendeten Konzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM verminderten das Zellwachstum auf $98,2 \pm 3,5\%$, $50,1 \pm 9,3\%$ und $7,6 \pm 2,0\%$. Die Kombination aus einer 5 µM-NSA- und 10 µM-LBPS03-Lösung konnten das Zellüberleben im Vergleich zu LBPS03-stimulierten Zellen in einer antagonisierenden Weise um 10,0% kompensieren. Die kombinatorische Anwendung einer 5 µM NSA- und 10 µM-LBPS05-Lösung dagegen verstärkt die antiproliferativen Effekte mehr als die addierten Einzeleffekte beider Substanzen. Im Vergleich zu LBPS05-behandelten Zellen konnte das Zellüberleben durch die Kombination um weitere 62,5% reduziert werden und im Vergleich zu den NSA-behandelten Zellen um zusätzlich 24,9%.

3.9.5. Die Kombinationsbehandlung aus Necrosulfonamide und LBPS05 verstärkt die Aktivierung der Initiatorcaspase-8

Da die Anwendung der Zelltod-Aktivatoren in Kombination mit den Nekroptoseinhibitoren auf Proliferationsebene keine deutlichen Rückschlüsse auf die Beteiligung der Signalwege erbrachten, sollte die kombinatorische Anwendung in intrazellulären Caspaseassays und Western-Blot-Analysen genauere Aussagen auf funktioneller Ebene ermöglichen. In Abbildung 35 werden die Effekte untersucht, die durch die beiden Nekroptoseinhibitoren NSA und Nec-1 in Kombination mit LBPS03 (Abb. 35 A) und LBPS05 (Abb. 35 B) zur Aktivierung der Initiatorcaspase-8 beitragen. ClearCa-2-Zellen wurden mit LBPS03 oder LBPS05 stimuliert und parallel dazu wurden analoge Proben unter Zugabe der Nekroptoseinhibitoren NSA und Nec-1 generiert. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 wurde durch das Caspase-8 Staining Kit (PromoKine) nach 72 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Wie bereits in Kapitel 3.4. beschrieben wurde, induziert LBPS03 in einer Konzentration von 10 μ M signifikant die Aktivierung der Caspase-8. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen wurde die Aktivität der Caspase-8 von $1,6\pm 0,6\%$ auf $42,9\pm 3,5\%$ angehoben. Ebenfalls wurde bereits die Wirkungslosigkeit des Zelltod-Aktivatoren LBPS05 in Bezug auf seine Fähigkeit, Caspase-8 zu aktivieren, beschrieben. Auch der RIP1-Hemmer Nec-1 war nicht in der Lage, die Caspase-8 unter verwendeten experimentellen Bedingungen zu aktivieren. Eine kombinatorische Anwendung aus Nec-1 zusammen mit einem der beiden Zelltod-Aktivatoren führte zu keiner Potenzierung der Caspase-8-Aktivierung.

Für den MLKL-Inhibitor NSA wurden bereits in ClearCa-2-Zellen gute antiproliferative Effekte nachgewiesen. Necrosulfonamide verstärkte die Aktivierung der Caspase-8 im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen um $20,5\pm 7,3\%$. Die Kombination aus NSA und LBPS03 wirkte sich additiv auf die Caspase-8-Aktivierung aus. Nach 72 Stunden wurde eine Aktivität von $71,3\pm 4,7\%$ gemessen (Abb. 35 A). Eine gleichzeitige Applikation des Inhibitors NSA und LBPS05 förderte die Aktivierung der Caspase-8 im Vergleich zu den addierten Einzeleffekten der Substanzen. Die Aktivität der Caspase-8 stieg vergleichsweise zur Kontrolle um $39,37\pm 13,13\%$ an.

Um die Beteiligung der Initiatorcaspase-8 der Apoptose zuzuordnen, wurden Western-Blot-Analysen für das Caspase-3-spezifische Substrat PARP durchgeführt. Zur Vorbereitung der Western-Blot-Analysen wurden ClearCa-2-Zellen unter LBPS03- und LBPS05-Einfluss stimuliert und parallel mit dem MLKL-Inhibitors NSA inkubiert. NSA wurde dabei in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

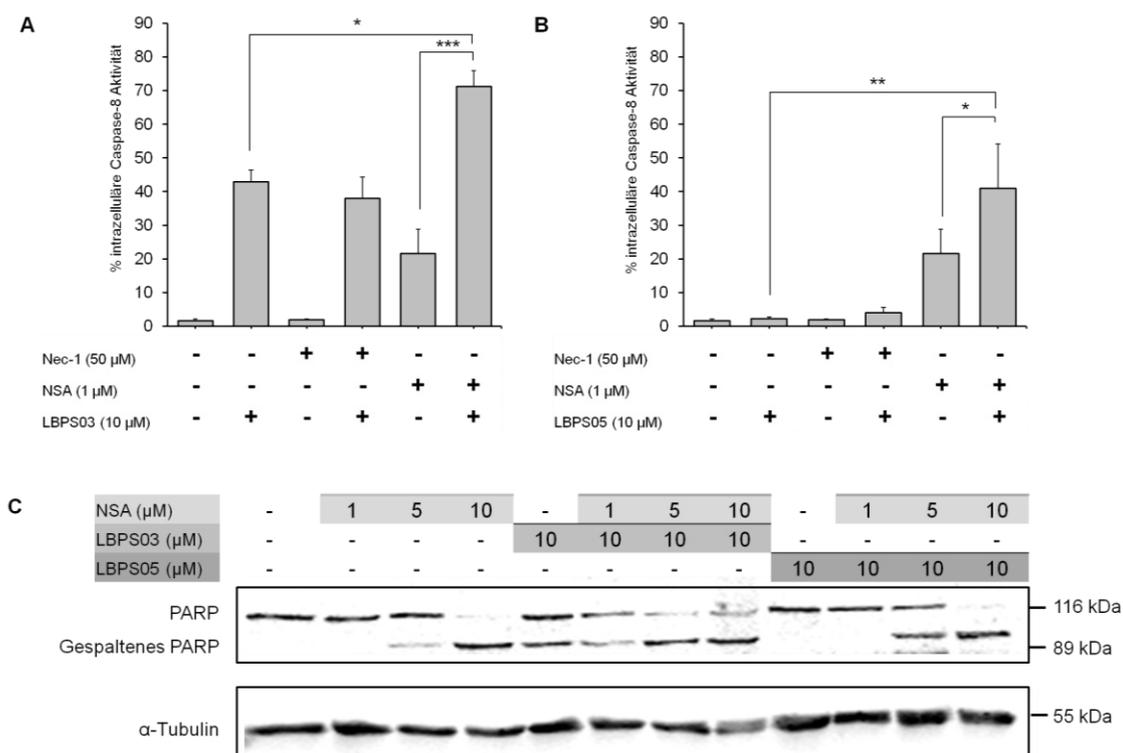


Abbildung 35: Einfluss der Nekroptoseinhibitoren Necrosulfonamide und Necrostatin-1 in Kombination mit den Zelltod-Aktivatoren auf die Fähigkeit, Caspase-8 zu aktivieren und PARP zu spalten. ClearCa-2-Zellen wurden mit LBPS03 (A) und LBPS05 (B) stimuliert und analoge Proben unter Zugabe des RIP1-Inhibitors Nec-1 oder des MLKL-Hemmers NSA generiert. Nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden wurden die Zellen für durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe des Caspase-8-Staining Kit (PromoKine) vorbereitet und am Partec-Facs-Gerät analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. **C**) ClearCa-2-Zellen wurden unter Zugabe der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 oder LBPS05 in Kombination mit NSA über 72 Stunden kultiviert. Für Western-Blot-Analysen wurden Proteine isoliert und 20 μ g Gesamtprotein auf einer 8%-igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der PARP-Antigene erfolgte mittels Anti-PARP-Antikörper (Cell Signaling). Der Infrarot-Imager wurde zur Visualisierung der Proteinbanden verwendet (n=3).

In Abbildung 35 wird die konzentrationsabhängige Spaltung von PARP durch NSA dargestellt, die unter Zugabe der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 verstärkt werden konnte. Eine 5 μ M-NSA-Konzentration förderte die Spaltung von PARP geringfügig, sodass bei einer Bandenhöhe von 89 kDa eine schwache Bande für das Spaltprodukt von PARP detektiert werden konnte. In kontrollbehandelten Zellen ist die ungespaltene Form von PARP bei 116 kDa präsent und konnte nach Zugabe einer 10 μ M- NSA-Lösung nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine vergleichsweise starke Bande bei 89 kDa detektiert. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 förderte bereits in einer Konzentration von 10 μ M eine PARP-Spaltung, sodass nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden die ungespaltene und gespaltene Form in einem Verhältnis von 1:1 nachgewiesen werden konnte. Wurde LBPS03 zusammen mit einer 5 μ M- oder 10 μ M- NSA-Lösung stimuliert, konnte die 116 kDa große PARP-Form nur noch sehr schwach dokumentiert werden, wohingegen eine sehr deutliche Bande für das PARP-Spaltprodukt detektiert wurde.

Der Zelltod-Aktivator LBPS05 induzierte, wie bereits beschrieben, keine Caspase-3/-7-abhängige Spaltung seines Substrats PARP. Gleichwohl führte LBPS05 zusammen mit einer 5 μM -NSA-Applikation zu einer deutlich stärkeren PARP-Spaltproduktbande, als NSA allein induziert. Dies würde die Beobachtung bestätigen, dass LBPS05 und NSA gemeinsam einen stärkeren apoptotischen Effekt aufweisen als die addierten Einzelwirkungen der Substanzen.

3.9.6. Necrosulfonamide bewirkt in ClearCa-2-Zellen eine RIP1-Degradation, die durch LBPS03 verstärkt werden kann

Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden konnte weder durch LBPS03 noch durch LBPS05 das Proteinniveau von MLKL signifikant beeinflusst werden (Western-Blot-Daten hier nicht dargestellt). Auch eine konzentrationsabhängige Applikation des MLKL-Inhibitors NSA und die kombinatorische Anwendung mit einem der beiden Zelltod-Aktivatoren bewirkten keine Veränderung im Expressionsniveau von MLKL. Stattdessen weisen Western-Blot-Analysen darauf hin, dass NSA in der Lage ist, dosisabhängig die Degradierung der Kinase RIP1 zu initiieren. Das RIP1-Expressionslevel wurde 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

Die Abbildung 36 zeigt die quantitativen RIP1-Proteinmengen im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen. Eine 1 μM - beziehungsweise 5 μM -NSA-Lösung verursachte keine signifikanten Änderungen im Proteinniveau von RIP1, wohingegen eine Dosis von 10 μM den Proteinlevel auf $34,5 \pm 14,4\%$ reduzierte. Sowohl für LBPS03 als auch für LBPS05 wurden in diesem Versuch keine signifikanten Änderungen im Expressionsniveau von RIP1 detektiert. Die kombinatorische Applikation von LBPS03 mit einer 5 μM -NSA-Lösung verringerte die RIP1-Menge auf $43,4 \pm 24,7\%$ stärker als die Summe der reduzierenden Effekte jeweiligen Einzelbehandlungen. Die Einzelbehandlung beeinflusste die Expression von RIP1 nur geringfügig. Eine 5 μM -NSA-Lösung reduzierte das RIP1-Proteinniveau um $7,7 \pm 18,6\%$, der Zelltod-Aktivator reduzierte LBPS03 in einer Konzentration von 10 μM um $3,6 \pm 20,0\%$, wobei für LBPS03 bereits stabilisierende beziehungsweise induzierende Effekte auf die Kinase RIP1 beschrieben wurden (vgl. Abschnitt 3.8.6.). Des Weiteren wirkte sich eine 10 μM -NSA-Applikation, kombiniert mit einer LBPS05-Zugabe, stärker auf die RIP1-Proteinmenge in ClearCa-2-Zellen aus als die additive Wirkung der Einzelbehandlungen.

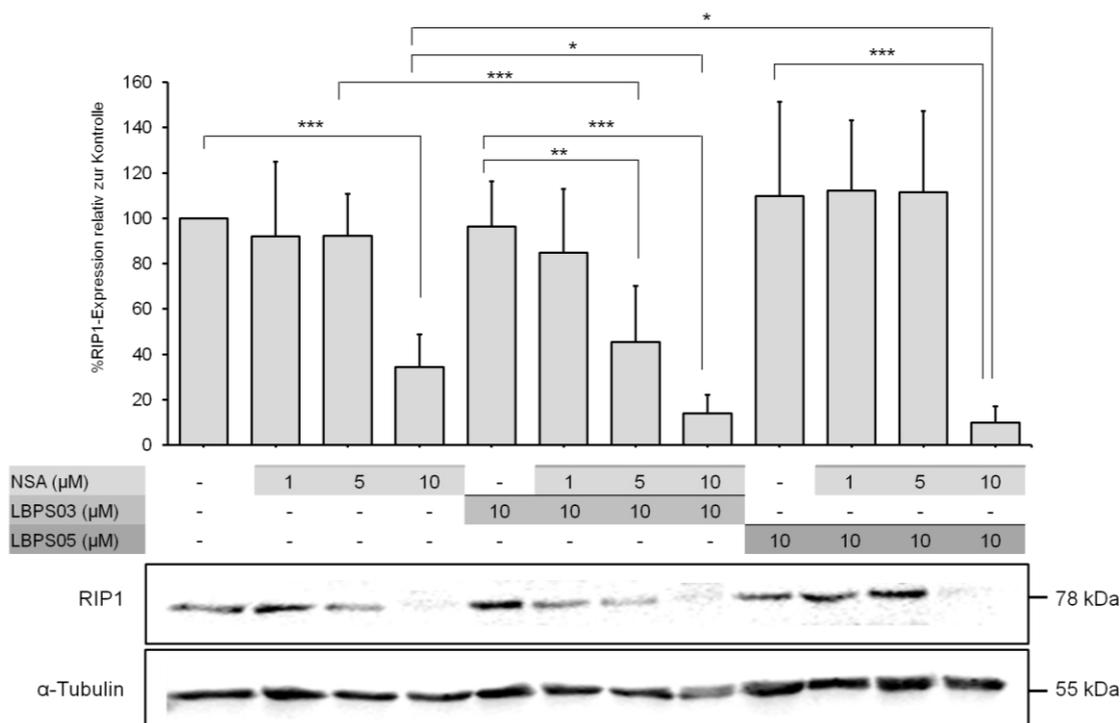


Abbildung 36: Nachweis der RIP1-Expression mittels Western-Blot-Analysen unter Einfluss des MLKL-Inhibitors NSA und in Kombination mit LBPS03 oder LBPS05. ClearCa-2-Zellen wurden über 48 Stunden mit NSA stimuliert. Parallel dazu wurden analoge Proben unter Zugabe der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 generiert. Für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen lysiert und 20 μg Gesamtprotein auf einer 10%-igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der RIP1-Proteine erfolgte mit Hilfe des Primärantikörpers Anti-RIP1-Rabbit. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte am Infrarot-Imager. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageStudio. α-Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der Proteinbanden ergibt sich aus der Normierung auf das Housekeeping-Gen und bezieht sich auf die Expression in kontrollbehandelten Zellen (0,1% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen.

Die Applikation einer 10 μM-NSA-Lösung reduzierte das Proteinniveau in ClearCa-2-Zellen um $65,5 \pm 14,4\%$. Das quantitative Proteinniveau von RIP1 unter Zugabe des Zelltod-Aktivatoren LBPS05 wurde bei $109,8 \pm 41,7\%$ bestimmt, wobei auch hier bereits eher eine Tendenz in der Induktion beziehungsweise Stabilisierung von RIP1 durch LBPS05 beschrieben werden konnte. Im Vergleich zu einer Applikation mit einer 10 μM-NSA-Lösung bewirkte die Kombination mit LBPS05 eine zusätzliche Abnahme der RIP1-Expression um weitere 24,5% und senkte das Proteinniveau auf $9,9 \pm 7,3\%$.

3.9.7. Necrostatin-1 hebt die LBPS05-verstärkte Expression von RIP1 auf

Obwohl der RIP1-Inhibitor Nec-1 in den bisherigen Untersuchungen keinen regulatorischen Einfluss auf die untersuchten Signaltransduktionswege in ClearCa-2 nimmt, sollten mittels Western-Blot-Analysen die Effekte von Nec-1 auf sein Zielmolekül RIP1 untersucht werden. Wie bereits in Kapitel 3.8.6. und Kapitel 3.9.3. gezeigt wurde, fördern die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 die Induktion beziehungsweise Stabilisierung der RIP1-

Expression nach 24 Stunden. In Abbildung 37 A ist die relative Zunahme der Expression unter LBPS03- und LBPS05-Einfluss nach 48 Stunden bestätigt worden. ClearCa-2-Zellen wurden unter Einfluss des RIP1-Inhibitors Nec-1 stimuliert und parallel dazu wurden analoge Proben für Western-Blot-Analysen unter Zugabe der beiden Zelltod-Aktivatoren generiert.

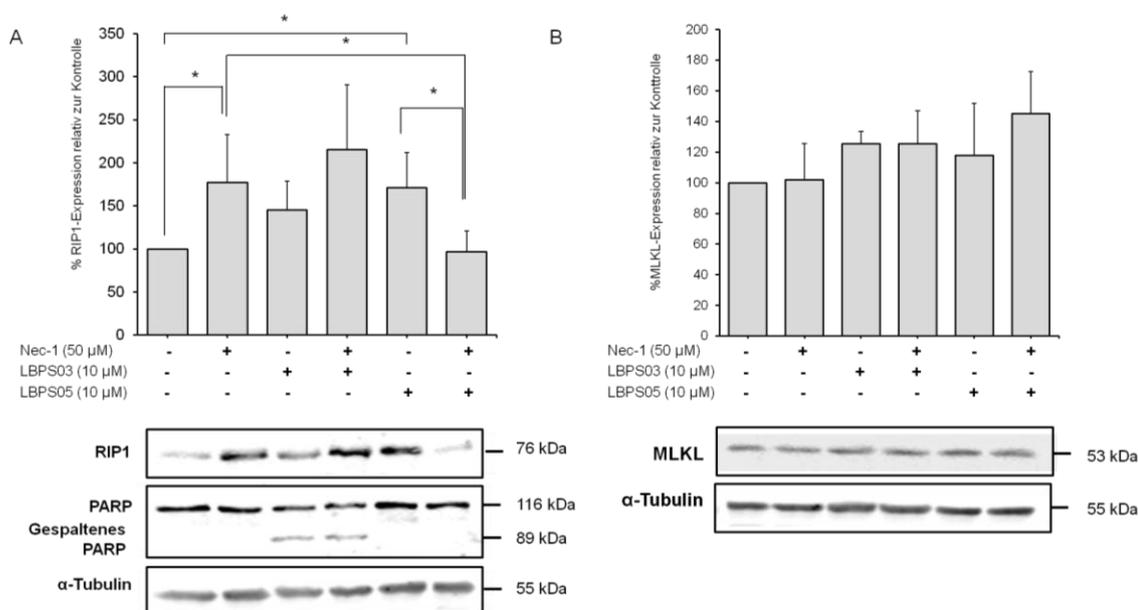


Abbildung 37: Western-Blot-Analysen zur Wirkung von Necrostatin-1 in Kombination mit LBPS03 oder LBPS05 auf die Proteinexpression von RIP1, MLKL und PARP. ClearCa-2-Zellen wurden mit LBPS03 oder LBPS05 stimuliert und parallel dazu wurden Proben unter Einfluss des RIP1-Inhibitors Nec-1 generiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für Western-Blot-Analysen vorbereitet und 20 µg Gesamtprotein auf einer 10%-igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. α-Tubulin wird als Ladungskontrolle verwendet. **A)** Der Nachweis von RIP1 erfolgte durch Anti-RIP1-Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling) und PARP durch Anti-PARP-Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling) mittels Western-Blot-Analysen. **B)** Der Nachweis für MLKL wurde durch den Antikörper Anti-MLKL-Kaninchen (Cell Signaling) erbracht. Die Visualisierung der Proteinbanden wurde mittels Infrarot-Imager generiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte durch die ImageStudio Software. Die relative Expression eines Proteins bezieht sich auf seine Ladungskontrolle im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen (0,1% DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Der RIP1-Hemmer Nec-1 förderte, anders als erwartet, die Zunahme der relativen Proteinexpression seines Zielproteins RIP1 im Vergleich zur Kontrolle. Zugleich wurde keine PARP-Spaltung hervorgerufen und somit keine Apoptose induziert. Das RIP1-Proteinniveau wurde unter Nec-1-Einfluss auf $167,2 \pm 53,0\%$ angehoben. Trotz der starken Standardabweichung ist in den unabhängig durchgeführten Western-Blot-Analysen eine deutliche Tendenz in der RIP1-Zunahme zu beobachten. Für LBPS03 und LBPS05 konnten die Expressionslevel von RIP1 auf $158,5 \pm 20,2\%$ und $166,2 \pm 38,6\%$ gesteigert werden. Die Kombination aus LBPS03 und Nec-1 förderte eine additive Zunahme der RIP1-Proteinkonzentration in Western-Blot-Analysen im Vergleich zu Nec-1- oder LBPS03-Einzelbehandlung. Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden gewann RIP1 durch die kombinatorische Applikation im Vergleich zur Kontrolle um $115,1 \pm 75,6\%$ an Proteinmenge. Trotz der hohen Standardabweichungen konnte in allen unabhängig durchgeführten

Versuchen eine deutliche Tendenz in der Zunahme des RIP1-Proteinniveaus im Vergleich zu einer Behandlung mit Nec-1 oder LBPS03 allein nachgewiesen werden. Die LBPS03-induzierte Spaltung durch PARP konnte durch Nec-1 nicht aufgehoben werden.

Der neuartige Zelltod-Aktivator LBPS05 förderte ähnlich wie Nec-1 die Induktion der RIP1-Kinase auf Proteinebene. Die gleichzeitige Applikation von Nec-1 und LBPS05 verminderte das RIP1-Proteinniveau im Vergleich zu einer Einzelbehandlung und setzte den Proteinlevel auf $105,6 \pm 30,5\%$ herab. Des Weiteren induzierte weder eine Singlebehandlung noch eine Kombinationsanwendung aus LBPS05 und Nec-1 eine PARP-Spaltung. Wie bereits für den MLKL-Hemmer NSA beschrieben wurde, beeinflusste Nec-1 das Proteinniveau von MLKL nicht signifikant. Auch die kombinatorische Applikation mit den Zelltod-Aktivatoren LBPS03 oder LBPS05 konnten das Proteinlevel von MLKL nicht beeinflussen (Abb. 37 B).

4. Diskussion

Die Apoptose ist ein streng regulierter zellulärer Prozess, der in multizellulären Organismen zur Eliminierung von beschädigten und unerwünschten Zellen führt. Fehlgeleitete Apoptose ist verantwortlich für eine Vielzahl von menschlichen Erkrankungen wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen. In „Hallmark of Cancer“ beschreiben HANAHAN UND WEINBERG (2011), dass die Resistenz gegenüber Apoptose eines der Hauptmerkmale ist, welches charakteristisch für die Tumorentstehung ist. Wichtigste Mediatoren der Apoptosesignalwege sind die Caspasen (HENGARTNER, 2000). Hierbei ist das anti-apoptotische Protein XIAP der stärkste Caspaseinhibitor seiner Familie und interagiert über seine BIR2- beziehungsweise BIR3-Domäne mit den Caspasen-3/-7 sowie der Caspase-9 und unterdrückt ihre proapoptotische Funktion (DEVERAUX et al., 1997). Andere zelluläre IAPs (c-IAP1/2) inhibieren dagegen indirekt die Caspaseaktivität, indem sie die Kinase RIP1 durch K63-Ubiquitinketten kennzeichnen und den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktivieren (BERTRAND et al., 2008; VARFOLOMEEV et al., 2008). Eine dauerhafte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt wiederum zu malignem Zellwachstum bei Menschen und fördert Tumorgenese, Tumorentwicklung und Metastasierung. Veränderte Expressionen von IAPs tragen dazu bei, dass die Apoptosefähigkeit in Tumorzellen vermindert und ein Schutz gegenüber chemotherapeutischen Herangehensweisen vermittelt wird (BAI et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe sowie MIZUTANI und Kollegen (2007) identifizierten das anti-apoptotische Protein XIAP als unabhängigen prognostischen Marker in klarzelligen Nierenkarzinomen (RAMP et al., 2004). Erhöhte Expressionslevel von XIAP traten besonders häufig im fortgeschrittenen klarzelligen Tumorstadium auf, korrelierten zudem mit einer verminderten Fähigkeit auf Chemotherapeutika anzusprechen und reduzierten dadurch die Lebenserwartung von Patienten erheblich (RAMP et al., 2004). Eine Behandlung von Nierenzellkarzinomen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen XIAP sensitivierte Zellen gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose (MIZUTANI et al., 2007).

Durch die weitgehende Resistenz gegenüber herkömmlichen chemotherapeutischen Substanzen gestaltet sich die Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen als besonders schwierig und fordert einen hohen Anspruch an die Entwicklung neuer und effizienterer Therapien. Die sogenannte *Targeted Therapy* hat in den vergangenen Jahren deutlich an Aufmerksamkeit gewonnen. Die Suche und Entwicklung neuer Möglichkeiten führte zur Identifikation von IAP-Antagonisten, die auch als Smac-Mimetika bezeichnet werden. Durch die Hemmung von IAP-Molekülen wird das Ungleichgewicht zwischen

pro- und antiapoptotischen Komponenten wiederhergestellt, sodass die Apoptose eingeleitet werden kann und Tumorzellen zugänglicher für chemotherapeutische Maßnahmen gemacht werden (MANNHOLD et al., 2010). Aus einer Datenbank von über 800.000 Strukturen identifizierten CAROSATI und Kollegen (2015) in einem groß angelegten Liganden-basierenden virtuellen Screening 31 Substanzen, die das Potential besitzen, mit der BIR3-Domäne von IAP-Molekülen zu interagieren. Unter den 31 möglichen IAP-Antagonisten besaßen LBPS01, LBPS03 und LBPS05 gute antiproliferative Effekte auf klarzellige Nierenzellkarzinomzellen der Linie ClearCa-2 sowie auf leukämische Jurkat-Zellen (STEVENS et al., 2014; VAN DEN HÖFEL et al., 2014; CAROSATI et al., 2015). Einige Vorarbeiten, die im Rahmen meiner Dissertation aussagekräftig verifiziert werden konnten, zeigten, dass die drei Zelltod-Aktivatoren wirksame Zelltod-induzierende Substanzen sind, die tumorspezifisch den Zelltod induzieren und zugleich keine toxischen Effekte in gesunden Nierenepithelzellen hervorriefen. Ebenfalls konnten keine antiproliferativen Effekte auf mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Patienten (PBMC) festgestellt werden (CAROSATI et al., 2015).

Im Fokus dieser Dissertation steht die Aufklärung der Zelltodmechanismen, die durch die beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 induziert werden. Um die Wirkweise der potentiellen IAP-Antagonisten darzulegen, wurde eine Zelllinie verwendet, in der XIAP als molekularer Schalter zwischen Apoptose und Zellüberleben agiert. In der Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 vermitteln hohe Basallevel von XIAP eine Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, die durch XIAP-antisense-Knockdown aufgehoben werden kann (STEVENS et al., 2014). Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag in der Aufklärung der Frage, inwieweit LBPS03 die Apoptosesignalwege beeinflusst, da bereits einige Voruntersuchungen auf einen Apoptosemechanismus hindeuteten (STEVENS et al., 2016). Der für den Zelltod-Aktivator LBPS05 beobachtete Caspase-unabhängige Zelltod dagegen weist auf ein nekroptotisches Zellschicksal hin (STEVENS et al., 2014).

4.1. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung der neuartigen Zelltod-Aktivatoren ist tumorspezifisch

Basierend auf der guten Wirksamkeit der drei Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS03 und LBPS05 identifizierten Dr. E. Carosati und seine Arbeitsgruppe in einem zweiten Screening 27 strukturelle Derivate, die sich von den drei Ausgangsstrukturen chemisch ableiten. Die Wirksamkeit der strukturellen Derivate wurde mittels Proliferationsanalysen im Rahmen

meiner Masterarbeit bereits untersucht (vgl. Abb. 9). Diese Proliferationsanalysen führten zur Identifizierung von insgesamt 11 aktiven Zelltod-Induktoren. Die Wirksamkeit der strukturellen Derivate wurde darüber hinaus für Jurkat-Zellen bestätigt und brachte Aufschluss über die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Zelltod-Aktivatoren (vgl. Abb. 9; CAROSATI et al., 2015).

In ClearCa-2-Zellen erwiesen sich die strukturellen Derivate LBPS38, LBPS39 und LBPS40 der Ausgangssubstanz LBPS01 vergleichbar effektiv wie in Jurkat-Zellen. Eine wesentliche strukturelle Abweichung zwischen den wirksamen und inaktiven Substanzen lag in der Anwesenheit einer Benzyloxy-Einheit bei der Gruppe der wirksamen Substanzen. Neben LBPS05 erzielten auch seine strukturellen Derivate LBPS56, LBPS57 und LBPS58 gute antiproliferative Effekte in ClearCa-2- sowie Jurkat-Zellen (CAROSATI et al., 2015). Die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen war in diesem Fall nicht eindeutig, scheint aber auf eine Veränderung beziehungsweise Substitution im Phenylring an den Positionen 2, 3 und 4 zurückzuführen zu sein (CAROSATI et al., 2015). CAROSATI und Kollegen (2015) vermuteten, dass die guten Zelltod-induzierenden Effekte von LBPS03 und seiner wirksamen strukturellen Derivate auf eine 2-Chlorobenzylidene-Gruppe zurückzuführen sind. Darüber hinaus ist die Kettenlänge zwischen dem fünfgliedrigen 4-Oxo-2-Thioxothiazolidinring und der Hydrazinyl-Einheit entscheidend (vgl. LBPS03 und LBPS48). Andererseits ist aber die Aktivität der Substanz sehr abhängig von der Substituierung der Benzoylhydrazingruppen. Eine Ringsubstitution, wie sie LBPS03 und LBPS43 aufweisen, ist offensichtlich nicht notwendig, wohingegen eine Hydroxy-Gruppe an Position 2 im Gegensatz zu Position 3 bevorzugt wird (vgl. LBPS03 und LBPS45). Eine Benachteiligung ergibt sich für LBPS44 durch eine Methoxy-Gruppe an Position 2, stattdessen bietet im Vergleich eine Chlorine-Gruppe in LBPS46 einen Vorteil (CAROSATI et al., 2015). Die übereinstimmenden Ergebnisse, die sowohl in Jurkat- wie auch in ClearCa-2-Zellen beobachtet werden konnten, sprechen für eine tumortypunspezifische Wirkung. Die verwendete Methode des Ligandenbasierten virtuellen Screenings stellt somit eine effektive Methode dar, potentielle Antagonisten zu identifizieren, die auch in anderen Forschungsbereichen die Suche nach Inhibitoren voranbringen könnte (CAROSATI et al., 2010).

Um Aussagen über die effektive Wirkung der Substanzen treffen zu können, wurde für die gut wirksamen Derivate der IC_{50} -Wert ermittelt. Der niedrigste IC_{50} -Wert wurde für die Substanz LBPS03 bestimmt (STEVENS et al., 2016). Eine vergleichbar effektive Hemmung des Tumorwachstums wurde in Jurkat-Zellen bei einer Konzentration von $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ beobachtet (CAROSATI et al., 2015). Ähnlich wirksam erwiesen sich auch seine strukturellen Derivate,

die durch IC_{50} -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich charakterisiert werden können (vgl. Tabelle 6; CAROSATI et al., 2015). Für die beiden Substanzen LBPS01 und LBPS05 lag die Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibierung des Tumorwachstums von Jurkat-Zellen gemessen werden konnte, um den Faktor 1,5 beziehungsweise 3 geringer als vergleichsweise in ClearCa-2-Zellen. Die Derivate der Ausgangssubstanz LBPS01 zeigten in ClearCa-2 etwas höhere IC_{50} -Werte als ihre Ausgangssubstanz, wohingegen die Derivate von LBPS05 als etwas effektiver eingestuft werden konnten als LBPS05 selbst (vgl. Tab. 6).

Ein niedriger IC_{50} -Wert der getesteten Substanzen korrelierte zudem mit einer Zunahme apoptotischer Zellen. Neben der Struktur-Wirkungs-Beziehung konnte ein Zusammenhang zwischen der mittleren inhibitorischen Konzentration und der Fähigkeit, die Apoptose zu induzieren, nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10). Substanzen wie LBPS03 und LBPS49 mit den niedrigen IC_{50} -Werten kennzeichneten sich durch eine deutliche Zunahme im hypodiploiden DNA-Gehalt, was charakteristisch für apoptotische Zellen ist. Auch seine anderen gut wirksamen strukturellen Derivate steigerten die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 mit seinen wirksamen Derivaten stellt somit die Gruppe der wirksamsten Substanzen dar, weil sie bereits in geringen Konzentrationen den Zelltod induzierten und zugleich am stärksten die Apoptose förderten. Mit steigender Inkubationsdauer stieg ebenfalls die Anzahl der Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt, die unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS01 standen (vgl. Abb. 10).

In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen, dass die strukturellen Derivate der Substanz LBPS01 vergleichsweise höhere IC_{50} -Werte aufwiesen als die Ausgangssubstanz selbst, wurde zugleich auch eine geringere Apoptoserate beobachtet. Dem gegenüber stehen die Beobachtungen, dass die Strukturderivate von LBPS05 niedrigere IC_{50} -Konzentrationen aufwiesen als LBPS05 und geringfügig zu höheren Apoptoseraten führten. Der Zelltod-Aktivator LBPS05 steigerte die Anzahl apoptotischer Zellen nur marginal (vgl. Abb. 10). Die Zunahme des hypodiploiden DNA-Gehalts durch LBPS01 und LBPS03 steht in Übereinstimmung mit den Daten, die in Jurkat-Zellen generiert werden konnten (CAROSATI et al., 2015). Ebenfalls führte die Behandlung von Jurkat-Zellen mit LBPS05 nicht zu maßgeblichen Veränderungen in der Anzahl apoptotischer Zellen (CAROSATI et al., 2015), wie es auch für ClearCa-2 beobachtet werden konnte. Die vergleichbare Wirkung, die sowohl in adhärennten wie auch in suspensiven Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, weist auf eine sehr einschlägige Wirkweise hin. Die Untersuchungen der strukturellen Derivate hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung ermöglichen es den Forschern unter der Leitung von Dr. E. Carosati, noch effektivere Substanzen zu identifizieren.

Da sich die Wirkung der beiden Zelltod-Aktivatoren LBPS01 und LBPS03 in vielerlei Hinsicht überschneidet, die Substanz LBPS03 aber den effektiveren Kandidaten darstellte, wurde für nachfolgende funktionellen Untersuchungen der Fokus vermehrt auf die Substanz LBPS03 gelegt.

4.2. Pharmakologische Wirkweise der Zelltod-Aktivatoren

Für die beiden Substanzen LBPS03 und LBPS05 konnte ein Zusammenhang zwischen Wirkeffektivität und Behandlungsdauer nachgewiesen werden (vgl. Abb. 14). Unter herkömmlichen Behandlungsbedingungen wurde die Wirkeffektivität der Substanzen in Bezug auf ihr antiproliferatives Verhalten nach einer Inkubationsdauer von 96 Stunden bestimmt. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden konnten durch beide Substanzen vergleichende antiproliferative Effekte beobachtet werden wie nach einer 96-stündigen Inkubation. Kürzere Inkubationszeiten von 6 und 12 Stunden reduzierten das wachstumshemmende Potential des Zelltod-Aktivators LBPS05 nahezu vollständig. Hingegen beeinflusste LBPS03 das Zellüberleben geringfügig (vgl. Abb. 14). Diese Untersuchungen zeigten, dass beide Substanzen eine Mindestinkubationszeit von 24 Stunden benötigen, um ihr vollständiges antiproliferative Potential zu entfalten. Hierfür kann zum Einen die Penetration über die Plasmamembran verantwortlich sein oder aber eine Zellzyklusphasen-spezifischer Effekt (vgl. Abb. 37).

4.3. Weder TRAIL noch TNF α steigern das antiproliferative Potential der Zelltod-Aktivatoren LBPS03 und LBPS05 im Nierenzellkarzinom

Die TRAIL-resistente klarzellige Nierenkarzinom-Zelllinie ClearCa-2 (RAMP et al., 2003) wies im Vergleich zu TRAIL-sensitiven Jurkat-Zellen geringfügig höhere IC₅₀-Werte auf, die möglicherweise auf ihren stark ausgeprägten resistenten Phänotyp zurückzuführen sind. In ClearCa-2-Zellen stellt das antiapoptotische Protein XIAP in der TRAIL-induzierten Apoptose einen molekularen Schalter dar. Die TRAIL-Resistenz konnte durch XIAP-siRNA-Knockdown-Experimente in ClearCa-2-Zellen aufgehoben werden (zusammengefasst in STEVENS et al., 2014). In dieser Arbeit wurde erstmals eine mögliche Resistenz von ClearCa-2 gegenüber TNF α -Behandlungen beschrieben, obwohl beide TNF-Rezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, exprimiert wurden (vgl. Abb. 15).

Bei den kleineren Fragmenten der TNF-Rezeptoren handelt es sich möglicherweise um die proteolytisch gespaltenen löslichen Rezeptoren, die unter anderem durch alternatives Spleißen

generiert werden können (CANETE et al., 2011). Lösliche TNF-Rezeptoren sind für die Aufrechterhaltung des natürlichen Gleichgewichts des Liganden TNF α verantwortlich, denn der Grad der TNF- α -vermittelten Entzündungsaktivität hängt von der Balance zwischen TNF α und seinem Rezeptor ab (HEANEY & GOLDE, 1998). Auch für Jurkat-Zellen konnte eine TNF α -Resistenz beobachtet werden, wohingegen sie auf eine TRAIL- beziehungsweise CD95-induzierte Apoptose gut ansprachen (LAWRENCE UND CHOW, 2005). Erst eine FADD-Defizienz ermöglicht Jurkat-Zellen einen TNF α -vermittelten Zelltod zu induzieren. Erstmals wurde die Wirksamkeit von TNF α auf FADD-defiziente Jurkat-Zellen durch LAWRENCE UND CHOW (2005) beschrieben, bei der Zellen durch Nekrose sterben.

BAI und Kollegen (2014) geben in ihrem Review einen Überblick über einige aktuell verwendete Smac-Mimetika, die sich in monovalente und bivalente Moleküle unterteilen. Monovalente Verbindungen imitieren das AVPI-ähnliche Motiv von IAP-Proteinen, wohingegen die bivalenten Strukturen sich aus zwei AVPI-Motiven zusammensetzen, die über einen Linker miteinander verknüpft sind (SUN et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das antiproliferative Potential der Smac-Mimetika AT406, Birinapant und GDC-0152 auf ClearCa-2-Zellen mit Hilfe der IC_{50} -Werte bestimmt. Das Smac-Mimetikum AT406 wies den höchsten IC_{50} -Wert auf, gefolgt von Birinapant und schließlich GDC-0152. Einige dieser Smac-Mimetika, die zur Zeit vermehrt Aufmerksamkeit und Anwendung in der Forschung finden, besitzen ihr Potential nicht darin, in Tumorzellen per se das Wachstum zu hemmen, sondern sind stets in Kombination anzuwenden. Smac-Mimetika wie BV6, LBW242, GDC-0152 und Birinapant werden derzeit erfolgreich verwendet bei einer Vielzahl von Tumortypen in Kombination mit Chemotherapeutika, Todesrezeptor-Agonisten, Strahlung, Signaltransduktionsinhibitoren oder Immunstimuli (zusammengefasst in FULDA, 2015).

Beispielsweise induzierte das bivalente Smac-Mimetikum Birinapant per se nur in einer von 17 getesteten humanen Melanom-Zelllinien den Zelltod (KREPLER et al., 2013). Erst eine Kombination mit TNF α förderte in allen weiteren Zelllinien die Apoptose in einer synergistischen Weise und das bereits im nanomolaren Bereich (KREPLER et al., 2013). Die TRAIL-resistente Brustkrebs-Zelllinie SUM190 sprach ebenfalls besonders gut auf eine Behandlung durch Birinapant an, wohingegen in der TRAIL-sensitiven Zelllinie SUM149 eine Einzelbehandlung zu keinen antiproliferativen Effekten führte. Eine kombinatorische Anwendung aus Birinapant und TRAIL verstärkte die TRAIL-induzierte Apoptose in SUM149-Zellen synergistisch (ALLENSWORTH et al., 2013). Vergleichbare synergistische Effekte erzielte das monovalente Smac-Mimetikum LBW242 in Neuroblastoma-Zelllinien (ESCHENBURG et al., 2012). IC_{50} -Werte zwischen 40 μ M und 83 μ M deuteten auf eine an sich

eher schlechtere Wirksamkeit von LBW242 hin, wohingegen eine Kombination durch Doxorubicin und Vincristine das Zellüberleben deutlich reduzierte und das in erheblich geringeren Konzentrationen (ESCHENBURG et al., 2012). Auch in Ovar-Zelllinien wies LBW242 moderate proapoptotische Effekte auf, die durch einen zusätzlichen TRAIL-Stimulus verstärkt werden konnten (PETRUCCI et al., 2012). Das Smac-Mimetikum AT406 wurde bereits in einer klinischen Studie in Kombination mit Daunorubicin und Cytarabine eingesetzt (DIPERSIO et al., 2015). Im Gegensatz zu den beschriebenen kommerziellen Smac-Mimetika zeichneten sich alle drei Substanzen, LBPS01, LBPS03 sowie LBPS05, als besonders effektiv aus, indem sie bereits per se sowohl in Nierenkarzinomzellen als auch in leukämischen T-Lymphozyten in mikromolaren Konzentrationen den Zelltod induzierten (STEVENS et al., 2014; VAN DEN HÖFEL et al., 2014; CAROSATI et al., 2015).

Da LBPS03 und LBPS05 an sich bereits gute antiproliferative Effekte in leukämischen T-Lymphozyten wie auch in Nierenkarzinomzellen aufwiesen und für eine primäre Wirkung eine zweite Substanz nicht notwendig ist, konnte eine weitere Therapiestrategie keinen zusätzlichen Vorteil bringen. Dass zugleich in beiden verwendeten Zelllinien für LBPS03 ein Caspase-abhängiger und für LBPS05 ein Caspase-unabhängiger Zelltod beschrieben werden konnte, lässt auf eine Wirkweise der Substanzen schließen, die unabhängig vom Tumorzelltyp verläuft (CAROSATI et al., 2015; STEVENS et al., 2014; VAN DEN HÖFEL et al., 2014).

4.4. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 ist ein effektiver Apoptose-Induktor

4.4.1. Die Relevanz von XIAP als Zielmolekül des Zelltod-Aktivators LBPS03

Das Design der Zelltod-Aktivatoren beruht auf dem Versuch, Kandidaten zu identifizieren, die pan-selektiv mit der BIR3-Domäne verschiedener IAPs interagieren, um das natürliche Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Komponenten in Tumorzellen wiederherzustellen und den Zelltod zu induzieren. Da in normalen Nierenepithel der Linie n.N.1860 nur geringe bis keine toxischen Effekte durch die drei Zelltod-Aktivatoren hervorgerufen wurden (vgl. Abb. 8 A; STEVENS et al., 2014), sollten Western-Blot-Analysen die basalen Expressionslevel von XIAP in nicht-tumorösen Zellen und Tumorzellen vergleichen, die Aussagen über die Relevanz von XIAP als mögliche Zielstruktur der neuartigen Zelltod-Aktivatoren treffen. Im Gegensatz zu den klarzelligen Nierenkarzinom-Zellen ClearCa-2 wies die nicht-tumoröse Linie n.N.1860 ein um die Hälfte geringeres XIAP-Level auf (vgl. Abb. 8 B).

Unsere Arbeitsgruppe analysierte das Expressionsverhalten von XIAP in klarzelligen Nierenkarzinomen. Sie fand heraus, dass in 95% der untersuchten Gewebe das Molekül nachgewiesen werden konnte und identifizierten XIAP als unabhängigen prognostischen Marker in klarzelligen Nierenkarzinomen (RAMP et al., 2004). Neben den Nierenzellkarzinomen konnte in rektalen Adenokarzinomen, invasiven Blasenkarzinomen sowie in papillären Schilddrüsenkarzinomen das antiapoptotische Protein XIAP als prognostischer Marker ausgemacht werden (MOUSSATA et al., 2012; LI et al., 2007; HUSSAIN et al., 2015). Zugleich traten erhöhte XIAP-Expressionslevel bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenkarzinom in einer inversen Korrelation mit einer verminderten Überlebensprognose auf (RAMP et al., 2004). Dass in ClearCa-2-Zellen gegenüber n.N.1860-Zellen das Protein XIAP verstärkt exprimiert wird, würde dafür sprechen, dass die potentiellen IAP-Antagonisten die Zielstruktur benötigen, um den Zelltod zu induzieren. Die Wirksamkeit der möglichen IAP-Antagonisten hängt demnach von dem XIAP-Status einer Zelle ab. ALLENSWORTH und Kollegen (2013) machten vergleichbare Beobachtungen bei der Verwendung des Smac-Mimetikums Birinapant. In einer Einzelbehandlung induzierte es deutlich effektiver in der TRAIL-resistenten entzündlichen Brustkrebs-Zelllinie SUM190 den Zelltod als im Vergleich zur TRAIL-sensitiven SUM149. Der wesentliche Unterschied der beiden Zelllinien lag in ihren differierenden XIAP-Expressionsprofilen, wobei die resistente Zelllinie SUM190 deutlich höhere XIAP-Mengen aufwies, die in Korrelation zu der therapeutischen Resistenz standen (ALLENSWORTH et al., 2013). GAITHER und Kollegen (2007) zeigten des Weiteren, dass SKOV-3-Zellen durch einen XIAP-Knockdown vermindert auf eine LBW242-induzierte Behandlung ansprachen. Auch für Embelin konnte eine gute Wirksamkeit in Prostatakarzinomen mit erhöhten XIAP-Level beobachtet werden, wohingegen normale Prostatazellen und Fibroblastzellen mit niedrigem XIAP-Niveau nur schwach auf eine Smac-Mimetikum-Behandlung reagierten (NIKOLOVSKA-COLESKA et al., 2004).

Smac-Mimetika wie AT406, Birinapant und Emelin besitzen zwar das Potential, mit der BIR3-Domäne von XIAP und c-IAPs zu interagieren, fördern jedoch meistens nur die Degradation der zellulären IAPs, hauptsächlich aber von c-IAP1 (CAI et al., 2011; ALLENSWORTH et al., 2013; NIKOLOVSKA-COLESKA et al., 2004; DAI et al., 2011). Eine Smac-Mimetika-vermittelte Degradierung von c-IAPs induziert in einigen Fällen NF- κ B-abhängige Signalwege durch die Aktivierung des TNF-Rezeptors, der den Zelltod der Zelle einleitet. Interessanterweise wurde für c-IAP-spezifische Antagonisten eine deutlich geringere Effektivität nachgewiesen als für Substanzen, die verschiedene IAPs neutralisierten (OBEXER & AUSSERLECHNER, 2014).

4.4.2. LBPS03 aktiviert den intrinsischen Apoptosesignalweg durch die Inhibierung des antiapoptotischen Proteins XIAP

Da nicht nur für die Zelltod-Aktivatoren, sondern auch für viele bekannte Smac-Mimetika das Vorhandensein von XIAP darüber entscheidet, ob Zellen den Zelltod einleiten, sollten Western-Blot-Analysen den Einfluss von LBPS03 auf das Proteinlevel von XIAP untersuchen. Die Behandlung von ClearCa-2-Zellen durch LBPS03 führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Abnahme des XIAP-Expressionsniveaus (vgl. Abb. 17 A). Eine steigende Substanzkonzentration bewirkte neben der signifikanten Abnahme der XIAP-Proteinmenge auch die Zunahme einer modifizierten XIAP-Form, die bei einer Bandenhöhe von etwa 70 kDa detektiert werden konnte. Die hohen eingesetzten Konzentrationen sollten das Potential der Substanzen verdeutlichen. Bei der auftretenden modifizierten XIAP-Form handelt es sich möglicherweise um eine posttranslationale Modifikation, zum Beispiel durch Ubiquitinierung, die Proteine für den proteosomalen Abbau kennzeichnet. Die Aminosäuren Lysin³²² und Lysin³²⁸ befinden sich auf der Oberfläche der XIAP-BIR3-Domäne und können durch ihre eigene RING-Domäne ubiquitiniert werden (SHIN et al., 2003). Ein Ubiquitinrest besitzt eine molekulare Größe von 8,5 kDa. Eine Ubiquitinierung der Aminosäuren Lysin³²² und Lysin³²⁸ unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 würde die molekulare Größe von XIAP insoweit verändern, dass ein 70 kDa großes modifiziertes XIAP-Protein entstünde. Diese Überlegungen würden die zweite entstandene Bande erklären. Eine weitere alternative posttranslationale Veränderung von XIAP stellt die S-Transnitrosylierung dar, bei der eine Nitroso-Gruppe an das Schwefelatom einer Thiolgruppe gebunden wird. NAKAMURA und Kollegen (2010) zeigten, dass die RING-Domäne von XIAP mit Stickstoffmonoxid reagieren kann und somit die E3-Ligase und dessen antiapoptotische Aktivität unterdrückt werden kann. Stickstoffmonoxid-Modifikationen von XIAP wurden bisher in einigen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet und führen zu neuronalen Schäden und anhaltender Caspase-abhängiger Apoptose (NAKAMURA et al., 2010).

Die degradierenden Effekte von XIAP durch LBPS03 konnten dem intrinsischen Apoptosesignalweg zugeordnet werden, da durch den Zelltod-Aktivator die Caspase-9 initiiert werden konnte (vgl. Abb. 37). Das Protein XIAP ist der potenteste Caspaseinhibitor seiner Familie, indem es über die BIR2-Domäne mit der Caspase-3/-7 sowie über die BIR3-Domäne mit Caspase-9 interagiert und dessen Aktivität hemmt (DEVERAUX et al., 1997). Interagiert XIAP mit seinem natürlichen Inhibitor, dem mitochondrialen Protein Smac oder IAP-Antagonisten, wird sein antiapoptotisches Potential aufgehoben, sodass es zu einer Caspase-aktivierung kommt und die Apoptose induziert werden kann (DU et al., 2000). Die Substanz

LBPS03 steigert die Caspaseaktivierung in einer zeitabhängigen Weise (vgl. Abb. 11). Vergleichbare Effekte in der Aktivierung der Initiatorcaspase-9 konnten in Jurkat-Zellen durch LBPS03 beschrieben werden (CAROSATI et al., 2015; VAN DEN HÖFEL et al., 2014).

Damit gehört LBPS03 zu einer der wenigen bekannten Smac-Mimetika, die eine direkte Degradierung von XIAP hervorrufen und die Aktivierung der Caspase-9 initiieren können. GDC-0152 gehört mitunter, ähnlich wie LBPS03, zu einer Minderheit von Substanzen, die bereits per se gute antiproliferative Effekte in Tumorzellen vermitteln, indem XIAP degradiert, die Caspase-9 aktiviert und die Apoptose eingeleitet wird (HU et al., 2015). Der Zelltod-Aktivator LBPS03 stellt somit eine Besonderheit unter den bekannten Smac-Mimetika dar, nicht nur wegen seiner vergleichbaren Wirkung zu Jurkat-Zellen, sondern besonders durch sein direktes Eingreifen in den intrinsischen Apoptosesignalweg (CAROSATI et al., 2015; VAN DEN HÖFEL et al., 2014).

Die Behandlung von ClearCa-2-Zellen mit LBPS03 verringerte den Proteinlevel der Pro-Caspase-3 und förderte zugleich eine Zunahme der gespaltenen Form der Caspase-3 (vgl. Abb. 12 A und Abb. 13). Des Weiteren erfolgte durch eine Behandlung mit LBPS03 die Spaltung Caspase-spezifischer Substrate (vgl. Abb. 12). Infolgedessen induzierte Caspase-3/-7 die Spaltung des Caspase-3-spezifischen Substrats PARP in einer zeitabhängigen Weise (vgl. Abb. 12 C; STEVENS et al., 2016). Durch die Caspase-3/-7-abhängige PARP-Spaltung wird die Apoptose eingeleitet (LAZEBNIK et al., 1994). Demgegenüber stehen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen überein, dass zeitabhängig der hypodiploide DNA-Gehalt in LBPS03-stimulierten Zellen anstieg (vgl. Abb. 10; STEVENS et al., 2016). Vergleichbare zeitabhängige Effekte in der Wirkung rief das Smac-Mimetikum BV6 in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien hervor, indem durch zunehmende Inkubationsdauer sein apoptotisches Potential verstärkt wurde (LI et al., 2011).

Durch die Verwendung des pan-Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK konnte eine LBPS03-abhängige Aktivierung der Caspase-3/-7, der Caspase-9 sowie eine PARP-Spaltung aufgehoben werden (vgl. Abb. 18; Abb. 26). Die Zugabe des Caspaseinhibitors bewirkte, dass die Aktivität der Caspasen durch den Zelltod-Aktivator auf Ausgangszustand zurückgesetzt werden konnte. Obwohl der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK effektiv die Caspaseaktivität und die Caspase-3-abhängige PARP-Spaltung in LBPS03-stimulierten Zellen unterdrückte, führte die Inhibierung der Caspase in LBPS03-behandelten Zellen nicht zu einer vollständigen Aufhebung des Zelltodes (vgl. Abb. 26). Auch ALLENSWORTH und Kollegen (2013) zeigten, dass die Anwesenheit eines Caspaseinhibitors den Birinapant-induzierten Zelltod nicht umkehren konnte (ALLENSWORTH et al., 2013).

XIAP scheint ergo ein direktes Ziel für LBPS03 darzustellen und erfüllt seine Aufgabe als IAP-Antagonist, indem es an die BIR3-Domäne bindet, eine RING-abhängige Ubiquitinierung bewirkt und das Protein für einen möglichen proteosomalen Abbau kennzeichnet. Der Einsatz des Zelltod-Aktivators hebt die antiapoptotische Wirkung von XIAP auf und schafft eine neue Balance, die zu Gunsten der Apoptose verläuft.

4.4.3. Die Externalisierung von Phosphatidylserinen in LBPS03-behandelten Zellen weist auf ein apoptotisches Zellschicksal hin

Eine charakteristische Eigenschaft von Zellen, die der Apoptose unterliegen, ist die Translokalisierung von Phosphatidylserinen. Die Externalisierung der Phosphatidylserinen dient der Kennzeichnung und Eliminierung durch Phagozyten und stellt zudem eine Bindestelle für das anionische lipidbindende Protein Annexin V dar. Eine LBPS03-induzierte Translokalisierung von Phosphatidylserinen konnte durch die Bindung von FITC-Annexin V beobachtet werden (vgl. Abb. 25). Zumeist trat eine Annexin-V-positive Färbung mit einer zusätzlichen EthD-III-Färbung auf. EthD-III ist ein zellimpermeabler Farbstoff, der durch eine geschädigte Plasmamembranintegrität an freie DNA-Moleküle binden kann. Eine Doppelfärbung von Zellen lässt auf ein spätapoptotisches Schicksal der Zellen schließen (MARTIN et al., 1995). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen geben ausschließlich qualitative Aussagen, ob eine Translokalisierung von Phosphatidylserinen erfolgte. Auch für das Smac-Mimetikum BV6 wurde mit zunehmender Inkubationsdauer eine Translokation der Phosphatidylserine beobachtet (MULLER-SIENERTH et al., 2011).

4.4.4. Die Initiierung des p53-Signalwegs durch LBPS03 bewirkt eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials

Neben XIAP stellt der Tumorsuppressor p53 einen der wichtigsten Regulatoren der Apoptose dar, indem er auf verschiedene Formen von zellulärem Stress reagiert und eine Vielzahl von antiproliferativen Signalen vermittelt (FRIDMAN & LOWE, 2003). Das Protein p53 als „Beschützer des Genoms“ besitzt die Funktion, die natürliche Balance zwischen Proliferation und Apoptose zu erhalten (LANE, 1992). Molekulare Veränderungen, die eine p53-Inaktivierung oder Verlust herbeiführen, zählen zu den häufigsten Aberrationen in menschlichen Tumoren (HUSSAIN & HARRIS, 1998). Die Zelllinie ClearCa-2 weist eine Mutation im Codon 306 auf (RAMP et al., 2003). Durch LBPS03 konnte dennoch p53 konzentrationsabhängig stabilisiert werden (vgl. Abb. 22). Die „KEGG-Signalweganalysen“

des Affymetrix „GeneChip[®] Human Transcriptome Array 2.0“ ergaben, dass LBPS03 signifikant den „p53-Signalweg“ beeinflusste. Die Zunahme von p53 durch LBPS03 könnte ein Hinweis darauf sein, dass der DNA-Damagepathway aktiviert worden ist. Eine p53-Aktivierung, die durch DNA-Schäden hervorgerufen wird, veranlasst die Initiierung der Apoptose (FRIDMAN & LOWE, 2003). Für viele Smac-Mimetika ist bisher keine Abhängigkeit von p53 beschrieben. OPEL und Kollegen (2015) zeigten dagegen, dass BV6 zwar effektiv den Zelltod induziert, dies jedoch in einer p53-unabhängigen Weise verursacht wurde.

Fluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten eine deutliche Veränderung im mitochondrialen Membranpotential unter Verwendung von LBPS03 (vgl. Abb. 24). Der Zelltod-Aktivator stört das mitochondriale Membranpotential, sodass sich nur noch eine geringere Menge des Farbstoffes MitoCapture in den Mitochondrien akkumulieren konnte und vermehrt im Zytoplasma als grüner Farbstoff nachgewiesen wurde.

4.4.5. Die Induktion von p53-abhängigen proapoptotischen Genen korreliert mit einer Membranpotentialänderung in LBPS03-stimulierten Zellen

Infolge einer p53-Aktivierung kann p53 als Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch an DNA-Moleküle binden und Gene induzieren, die ein apoptotisches Schicksal begünstigen (KO & PRIVES, 1996; EL-DEIRY, 1998). Proapoptotische Mitglieder der Bcl-Familie, darunter Bax, PUMA, NOXA und Bid können unmittelbar nach einer p53-Transaktivierung transkribiert werden (Übersicht in FRIDMAN & LOWE, 2003). Gene wie *PUMA* und *NOXA* wurden infolge eines LBPS03-Stimulus in ClearCa-2-Zellen induziert (vgl. Abb. 20). Das Protein PUMA bindet durch seine Stabilisierung infolge eines p53-induzierten Signals an mitochondriale antiapoptotische Bcl-Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, *Myeloid Cell Leukemia 1* (MCL1) und *BCL2 related protein A1* (Bcl-2A1) und hebt ihre inhibierende Wirkung auf (CHEN et al., 2005). NOXA dagegen bindet an MCL1 und Bcl-2A1 (KHOO et al., 2014). Zurückzuführen ist die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials durch LBPS03 vermutlich auf die p53-induzierte Transkription proapoptotischer Bcl-Mitglieder wie NOXA und PUMA, die als Proteine ihre antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren und das mitochondriale Membranpotential positiv beeinflussen (siehe Abb. 37).

Neben der mRNA-Expressionszunahme von *PUMA* und *NOXA* weisen Analysen zum Ubiquitinierungsstatus von Apoptose-relevanten Proteinen darauf hin, dass Bcl-2 unter

Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 verstärkt ubiquitiniert werden könnte (vgl. Abb. 29). Zudem konnte eine Reduktion im Bcl-Proteinniveau in LBPS03-behandelten Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 13).

Die mRNA-Expressionsanalysen zeigten, dass unter Einfluss des Zelltod-Aktivators das Gen *Fas* (*CD95*) verstärkt transkribiert wurde (vgl. Abb. 21; Tab. 7). MULLER und Kollegen (1998) beobachteten erstmals, dass das Gen *Fas* (*CD95*), welches für den Rezeptor CD95 kodiert, als p53-induzierbares Gen infolge von DNA-Schädigung auftritt. Die zunehmende Expression des Rezeptors sensitiviert Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. In einer zeitabhängigen Weise induzierte LBPS03 die Aktivierung der Caspase-8, welche effektiv durch Z-VAD-FMK gehemmt werden konnte (vgl. Abb. 11 und 18; STEVENS et al., 2016).

Für einige Smac-Mimetika wurde bereits beschrieben, dass sie in einer autokrinen/parakrinen Schleife durch die Induktion von Zytokinen den Zelltod einleiten (vgl. FULDA, 2015). Dem gegenüber steht die verstärkte Transkription von *CD95* in einer p53-abhängigen Weise in LBPS03-stimulierten Zellen, die die Initiierung des extrinsischen Signalwegs beeinflussen. Die autokrine/parakrine Wirkweise scheint daher für LBPS03-behandelte Zellen nicht zwangsläufig notwendig zu sein, um die Apoptose zu induzieren. Obwohl LBPS03 vergleichbar zur Caspase-3/-7 sowie Caspase-9 zeitabhängig die Aktivierung der Caspase-8 induzieren konnte (vgl. Abb. 11), scheint eine Caspase-8-abhängige Spaltung des proapoptotischen Proteins Bid nicht notwendig zu sein, um den intrinsischen Apoptose-signalweg in LBPS03-behandelten Zellen zu induzieren (vgl. Abb. 24 C). Vergleichende Beobachtungen erzielten JOST und Kollegen (2009) in Hepatozyten, in denen der Verlust von XIAP durch Gene-Targeting oder Smac-Mimetika zu einer CD95-induzierten Apoptose erfolgte, der in einer Bid-unabhängigen Weise vermittelt wurde. OWENS und Kollegen (2013) postulierten, dass die Abwesenheit von XIAP die Notwendigkeit einer Bid-Spaltung verringert, um den intrinsischen Signalweg zu aktivieren. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass LBPS03 sowohl den extrinsischen wie auch den intrinsischen Signalweg induzieren kann. Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs scheint in einer p53-abhängigen Weise zu verlaufen und zu einer verstärkten Expression von proapoptotische Faktoren zu führen, die Bcl-Familienmitglieder inhibieren. Daraufhin initiiert ein verändertes mitochondriales Membranpotential die Ausschüttung von proapoptotischen Faktoren wie Smac und Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum (LI et al., 1997) und leitet dadurch die Apoptose ein (vgl. Abb. 37)

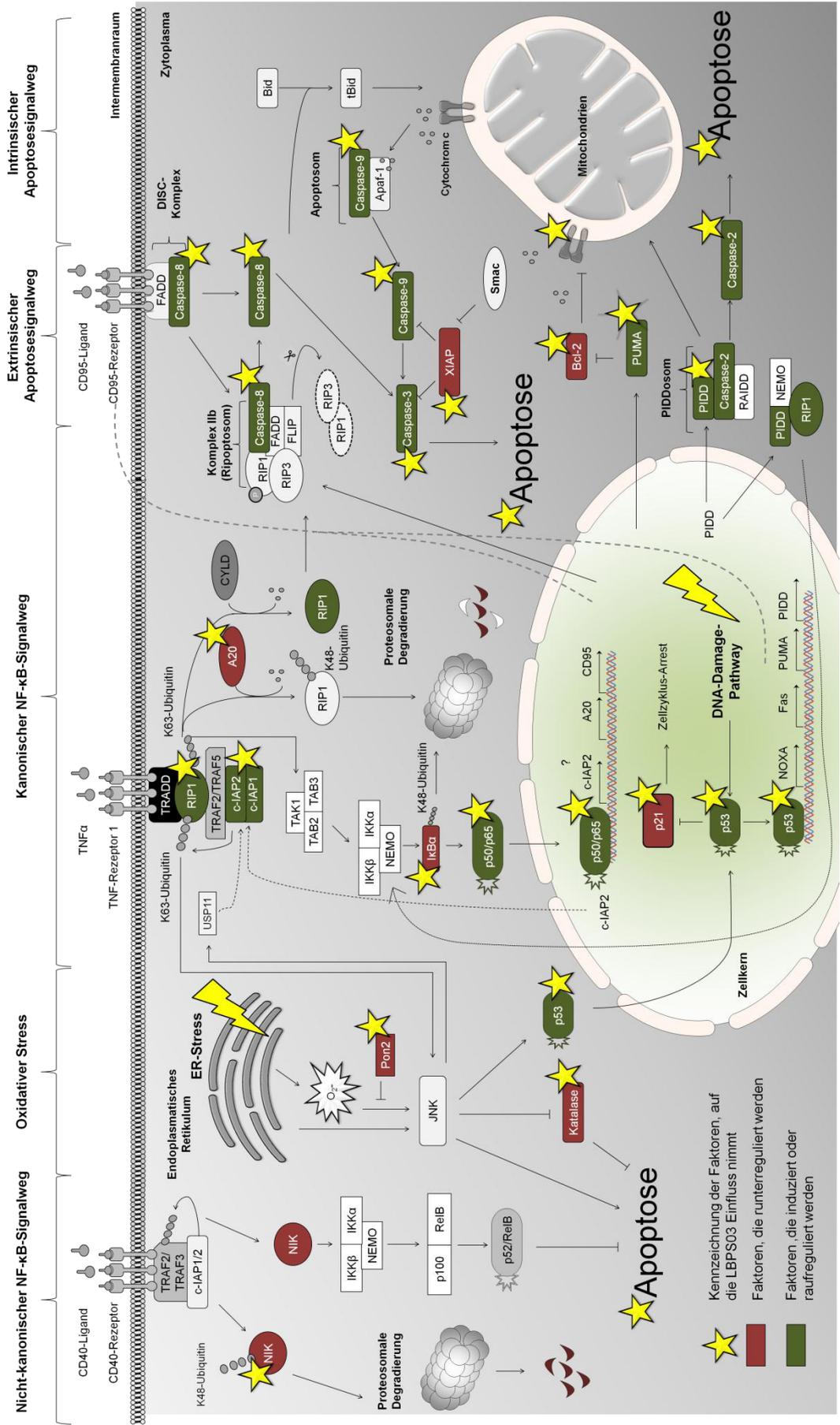


Abbildung 38: Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 auf ausgewählte Apoptosignalwege

4.4.6. In Abhängigkeit von p53 aktiviert LBPS03 die Caspase-2

Die Aktivierung der Caspase-2 erfolgt durch die Oligomerisierung eines Multimerprotein-komplexes, dem sogenannten PIDDosom (BAPTISTE-OKOH et al., 2008a). PIDD zählt neben proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-Familie zu den p53-induzierbaren Genen (LIN et al., 2000). Neben der Aktivierung von Caspasen, die sowohl im extrinsischen wie auch im intrinsischen Apoptosesignalweg eine wichtige Rolle spielen, konnte durch LBPS03 zeitabhängig die Initiierung der Caspase-2 beobachtet werden (vgl. Abb. 11). Die Aktivierung der Caspase-2 konnte effektiv durch die Verwendung des pan-Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK gesenkt werden. Die Initiierung des DNA-Damagepathways könnte für die Aktivierung der Apoptose unter LBPS03-Einfluss verantwortlich sein. Die Affymetrix-Analysen gaben erste Hinweise darauf, dass LBPS03 das Gen *PIDD* stärker induzierte als vergleichsweise in kontrollbehandelten Zellen (vgl. Tab. 7). Auf Proteinebene bewirkte der Zelltod-Aktivator LBPS03 eine konzentrationsabhängige Zunahme beziehungsweise eine Stabilisierung der PIDD-FL-Isoform und eine konzentrationsabhängige Abnahme der PIDD-C-Isoform (vgl. Abb. 23). Die Zunahme der PIDD-FL-Form durch LBPS03 deutet darauf hin, dass der p53-abhängige Anstieg der PIDD-mRNA zu einer translationalen Umsetzung führt. Auf Proteinebene würde demnach zunächst eine PIDD-FL-Isoform entstehen. BERUBE und Kollegen (2005) zeigten in ihrer Studie, dass eine Überexpression von PIDD zu einem RAIDD-abhängigen Zelltod führen kann. Die Spaltung von PIDD-FL zu PIDD-C fördert zunächst die Interaktion mit NEMO und RIP1, die eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges initiiert. Eine weitere Spaltung von PIDD-C in PIDD-CC dagegen begünstigt die Formierung eines RAIDD-abhängigen Komplexes, der wiederum zu einem Caspase-2-vermittelten Zelltod führt (RIBE et al., 2008). Für Etoposide wurde bereits die Abhängigkeit von einem NEMO-RIP1-Komplex beschrieben, der unter Verwendung hoher Dosen zu einer Rekrutierung von FADD führen kann und damit ebenfalls zu einer Aktivierung der Caspase-8 führt (BITON & ASHKENAZI, 2011). Die Reduktion der PIDD-C-Form unter Zugabe von LBPS03 würde für eine weitere Spaltung des Proteins in eine PIDD-CC-Form sprechen, die jedoch unter experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte. Da die konzentrationsabhängigen Änderungen der PIDD-Expressionslevel durch LBPS03 bereits nach 24 Stunden bestimmt wurden, die Caspase-2 jedoch erst nach 72 Stunden ihr vollständiges Potential entfaltet, lässt darauf schließen, dass neu synthetisierte PIDD-FL-Proteine mit voranschreitender Inkubationsdauer zunächst in PIDD-C und danach in PIDD-CC gespalten werden, was zur Rekrutierung von RAIDD oder FADD führt und die Aktivierung der Caspase-2 einleitet (vgl. Abb. 37).

4.4.7. P53-induzierbare Gene unterdrücken den p21-abhängigen Zellzyklusarrest in LBPS03-behandelten Zellen

Ein weiteres Gen, welches in Abhängigkeit von p53 infolge eines LBPS03-Stimulus induziert werden konnte, war *CDKN1A*, welches für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 1, oder auch bekannt als p21, kodiert. Neben der Funktion, den Zellzyklus-Arrest einzuleiten (HARPER et al., 1993), hat p21 die Aufgabe, effektiv die Apoptose zu unterdrücken (BAPTISTE-OKOH et al., 2008b; SOHN et al., 2006). Neben *CDKN1A* wurden die beiden Gene *DDB2* und *RRM2B* in LBPS03-behandelten Zellen verstärkt transkribiert. Das Gen *RRM2B* ist ein weiteres wichtiges Transkriptionstarget von p53 und übernimmt eine entscheidende Funktion in der Vorstufe der DNA-Reparatur (NAKANO et al., 2000; TANAKA et al., 2000). Das Gen *DDB2* wird in Folge einer DNA-Schädigung p53-abhängig verstärkt transkribiert (CHU, 2002). Das Protein besitzt die Funktion, den CDK-Inhibitor p21 zu degradieren (STOYANOVA et al., 2009). Der Zelltod-Aktivator LBPS03 begünstigt die Ubiquitinierung und die Abnahme der Proteinmenge von p21 (vgl. Abb. 22 und Abb. 29). Die Expression des Proteins p21 stellt in Zellen, die einer DNA-Schädigung unterliegen, ein Problem dar, da sowohl p53 proapoptotische Signalwege induziert, zugleich aber auch die Transkription von p21 wiederum induziert (STOYANOVA et al., 2009). Der Verlust von p21 führte zu einer Sensitivierung gegenüber Apoptose in Folge einer DNA-Schädigung (TIAN et al., 2000).

4.4.8. Das Protein p53 induziert in einem negativen Feedback antiapoptotische Gene

Neben den Genen, die LBPS03-abhängig induziert werden und zu einem proapoptotischen Schicksal beitragen, wurden im Rahmen der Affymetrix-Array-Analyse Gene identifiziert, die antiapoptotische Eigenschaften besitzen. Als Folge einer p53-Aktivierung können in einer negativen Feedback-Schleife p53-abhängige Gene wie *MDM2* transkribiert werden. *MDM2* seinerseits blockiert die p53-transkriptionelle Aktivierungsdomäne (Übersicht in LEVINE, 1997). Unter Stresseinfluss polyubiquitiniert *MDM2* sich selbst und fördert somit eine längere Lebensdauer von p53 (RILEY et al., 2008). Für LBPS03-behandelte Zellen konnte eine *MDM2*-Transkriptionszunahme nachgewiesen werden (vgl. Abb. 21 und Tabelle 7). Neben der Funktion, p53 in einem negativen Feedback-Loop zu inhibieren, unterstützt *MDM2* die Expression von XIAP auf translationaler Ebene (GU et al., 2009). GU und Kollegen (2009) wiesen nach, dass erhöhte *MDM2*-Expressionslevel in Tumorzellen häufig mit einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie oder Bestrahlung korrelierten und führte das auf die Eigenschaft von *MDM2* zurück, die Translation von XIAP positiv zu beeinflussen. Neben

MDM2 konnte eine gesteigerte mRNA-Expression von *MDM4* durch LBPS03 nachgewiesen werden, die nicht direkt auf eine Aktivierung von p53 zurückzuführen ist, aber ebenfalls zu dessen Inhibierung beiträgt (SHVARTS et al., 1996). Die durch DNA-Schädigung bedingte Stabilisierung von p53 führt dazu, dass MDM2 sich selbst und MDM4 ubiquitiniert und folglich degradiert (TOLEDO & WAHL, 2007). Der LBPS03-induzierte Stress in ClearCa-2-Zellen fördert die Akkumulation von p53, das könnte wiederum zu einer MDM2-Ubiquitinierung führen, in dessen Folge die Transkription von XIAP nicht mehr unterstützt werden kann. Diese Überlegungen unterstützen die Beobachtungen, dass XIAP unter Einfluss von LBPS03 vermindert nachgewiesen werden konnte. Somit fördert LBPS03 nicht nur die direkte Inhibierung von XIAP über die mögliche Interaktion mit der BIR3-Domäne, sondern beeinflusst indirekt durch die p53-Aktivierung, dass weniger XIAP-mRNA translatiert wird. Ein weiteres antiapoptotisches Gen, welches durch LBPS03 zunehmend exprimiert wurde, war *BIRC5*, das ebenfalls ein Zielgen von p53 darstellt und für das IAP-Protein Survivin kodiert (vgl. Abb. 21 A; MIRZA et al., 2002). Der Anstieg der *BIRC5*-mRNA-Expression in LBPS03-behandelten Zellen ist nur sehr gering und könnte einen kompensatorischen Effekt darstellen.

4.4.9. Die Rolle der c-IAPs in der LBPS03-abhängigen Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs

Durch die Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie werden Signale für Proliferation, Differenzierung, Überleben und Zelltod weitergeleitet. In den folgenden Ausführungen werden die Darstellungen von WILSON und Kollegen (2009) zusammengefasst erläutert, wie in Abhängigkeit des Adaptermoleküls, welches zum Rezeptor rekrutiert wird, über das Zellschicksal entschieden wird. FADD und TRADD sind zwei dieser Adapterproteine. FADD bildet am Rezeptor den sogenannten DISC-Komplex und kontrolliert den Zelltod durch Caspase-8 und Caspase-10, TRADD dagegen rekrutiert die Kinase RIP1, TRAF und die beiden zellulären IAPs c-IAP1 und c-IAP2, die zusammen den Komplex I bilden. Hauptsächlich besitzen die Rezeptoren CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 proapoptotische Funktionen, die zur Rekrutierung von FADD führen, wohingegen bei DR3 und TNF-R1 das Molekül TRADD involviert und für entzündliche Aktivitäten verantwortlich ist. In einigen Fällen, unter anderem in Anwesenheit von IAP-Antagonisten, kann der Komplex I mit dem Adapterprotein TRADD auch die Apoptose beziehungsweise die Nekroptose induzieren (WILSON et al., 2009).

Die zellulären IAPs spielen eine wichtige Funktion in der Regulation der Kinasen des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs. In Anwesenheit von c-IAP1 und c-IAP2 wird NIK negativ reguliert, die Inhibierung der zellulären IAPs durch IAP-Antagonisten oder Smac-Mimetika bewirkt die Stabilisierung von NIK und die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs (VARFOLOMEEV et al., 2007; VINCE et al., 2007). Der Verlust der zellulären IAPs, insbesondere von c-IAP1 durch Smac-Mimetika, verursacht in einigen Fällen die Sekretion von TNF α , sodass in einer RIP1-abhängigen Weise der Zelltod induziert werden kann (vgl. FULDA, 2015). PETERSEN und Kollegen (2010) beschrieben die Abhängigkeit einiger Smac-Mimetika von TNF α -Signalling als „Paradoxon“, da Smac-Mimetika normalerweise nicht den NF- κ B-Signalweg beeinträchtigen, sondern das Signal nutzen, um durch die Degradierung der zellulären IAPs einen RIP1-abhängigen Komplex zu bilden, der als Folge die Apoptose induziert (WANG et al., 2008). Viele bekannte Smac-Mimetika wie Birinapant, AT406, GDC-0152 und LBW242 besitzen das Potential, an die BIR3-Domäne von c-IAP1 zu binden und dessen proteosomale Degradation zu induzieren (ALLENSWORTH et al., 2013; CAI et al., 2011; FLYGARE et al., 2012; ESCHENBURG et al., 2012; BENETATOS et al., 2014). Auch MULLER-SIENERTH und Kollegen (2011) beobachteten eine BV6-abhängige Degradierung von c-IAP1, in deren Folge die Kinase NIK stabilisiert, NF- κ B induziert und der nicht-kanonische Signalweg aktiviert wurde. CHEUNG und Kollegen (2011) zeigten in ihren Studien, dass Smac-Mimetika-Resistenzen trotz Anwesenheit von TNF α auf die Akkumulation von NIK zurückzuführen sind. Sie wiesen nach, dass eine NIK-Stabilisierung sowohl den kanonischen wie auch den nicht-kanonischen Signalweg fördert und unter anderem antiapoptotische Gene wie c-FLIP verstärkt transkribiert.

Kontrovers zu vielen Studien, dass Smac-Mimetika die Degradation von c-IAP1 und teilweise auch von c-IAP2 hervorrufen, wurde durch LBPS03 stattdessen konzentrationsabhängig eine besonders starke Induktion von c-IAP2 nachgewiesen (vgl. Abb. 17 B + C). Die Initiierung von c-IAP2 erfolgte innerhalb weniger Stunden, sodass das Molekül bereits nach 24 Stunden verstärkt und mit erhöhter Frequenz in ClearCa-2 Zellen auftrat. Möglicherweise bewirkte die Zunahme des c-IAP2-Expressionsniveaus in LBPS03-behandelten Zellen auch eine verstärkte Ubiquitinierung von NIK (vgl. Abb. 29).

In Western-Blot-Analysen konnte beobachtet werden, dass in ClearCa-2-Zellen unter Kontrollbedingungen die p65-Einheit von NF- κ B exprimiert wurde und gleichzeitig phosphoryliert vorlag. DYNEK und Kollegen (2010) wiesen darauf hin, dass möglicherweise eine K11-Ubiquitinierung von RIP1 durch c-IAPs in Tumorzellen für eine partielle Aktivierung von NF- κ B verantwortlich ist, welche Gene induziert, die essentiell für das

Überleben und Entzündungsreaktionen sind. Die konzentrationsabhängige Stabilisierung von c-IAP2 in LBPS03-behandelten Zellen könnte auf eine Induktion des kanonischen NF- κ B-Signalwegs zurückzuführen sein (vgl. Abb. 37). Zugleich akkumulierte die Kinase RIP1 mit steigender Konzentration in LBPS03-behandelten ClearCa-2-Zellen. Inwieweit die Stabilisierung von RIP1 auf eine K63-Ubiquitinierung der zellulären IAPs zurückzuführen ist und ob dies in Abhängigkeit des TNF-Rezeptors geschieht, konnte ihm Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Lösungsmittelbehandelte Zellen charakterisierten sich zudem durch eine starke Expression des NF- κ B-p65-Inhibitors I κ B α (vgl. Abb. 28). Nach einer LBPS03-Behandlung sank die Proteinmenge von I κ B α konzentrationsabhängig. Zugleich nahm die phosphorylierte NF- κ B-Form zu, was für eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs sprechen würde. ALLENSWORTH und Kollegen (2013) berichteten über vergleichbare Ergebnisse durch die Behandlung von TRAIL-resistenten SUM190-Zellen mit Birinapant. Nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden wurde NF- κ B-p65 zunehmend phosphoryliert und nach 24 Stunden auf Ausgangszustand zurückgesetzt, wohingegen die Gesamtproteinmenge von NF- κ B nicht von der Lösungsmittelkontrolle differierte. Der NF- κ B-Signalweg ist in der Lage, die Transkription von Genen wie *TNF α* , *TNF-R1*, *Fas (CD95)* und *FasL (CD95L)* zu initiieren (Shakhov et al. 1990; Collart et al. 1990; Chan et al. 1999; MATSUI et al., 1998). Für einige Smac-Mimetika wurde beschrieben, dass die Apoptose durch die NF- κ B-vermittelte Induktion von TNF α induziert werden kann und zur Aktivierung der Caspase-8 führte (BERTRAND et al., 2008; VARFOLOMEEV et al., 2007; PETERSEN et al., 2007). FULDA (2015) beschrieb die Sekretion von TNF α und CD95L durch einige Smac-Mimetika als autokrine/parakrine Schleife, die durch die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs eintritt und als Folge die Apoptose induziert. Dabei spielen ganz besonders die c-IAP-degradierenden Eigenschaften der Smac-Mimetika eine wichtige Rolle. Neben der Initiierung des NF- κ B-Signalwegs durch Birinapant beobachteten ALLENSWORTH und Kollegen (2013) hingegen die Degradierung von c-IAP1 sowie eine Abhängigkeit von der Kinase RIP1. Neben c-FLIP induziert NF- κ B als Transkriptionsfaktor zudem die Transkription von antiapoptotischen Proteinen wie *c-IAP1* und *c-IAP2* (CHU et al., 1997; KREUZ et al., 2001). Ein Resistenzmechanismus gegenüber einer Smac-Mimetika-induzierten Behandlung liegt in der NF- κ B-abhängigen Expression von c-IAP2 vor (Übersicht in TENEV et al., 2011). Möglicherweise ist die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs für eine verstärkte c-IAP2-Expression in LBPS03-stimulierten Zellen verantwortlich. Die Affymetrix-Untersuchungen wiesen jedoch darauf hin, dass in LBPS03-stimulierten Zellen weder eine

Zunahme der *c-IAP1*- noch ein Anstieg im *c-IAP2*-mRNA-Expressionsniveau auftrat. Da die Affymetrix-Analysen nur einen Zeitpunkt sowie eine Substanzkonzentration berücksichtigen, ist eine potentiell verstärkte Transkription der beiden zellulären IAPs zu einem anderen Zeitpunkt beziehungsweise eine höhere LBPS03-Dosis nicht ausgeschlossen.

LEE UND SONG (2016) beschreiben eine weitere Form der NF- κ B-abhängigen Resistenz gegenüber einer Smac-Mimetika-Behandlung, indem durch die Ubiquitin-spezifische Protease 11 (USP11) das Protein *c-IAP2* posttranslational stabilisiert wird. Die Expression von USP11 erfolgt durch die Aktivierung von JNK-Signalwegen (LEE & SONG 2016). Die Aktivierung des JNK-Signalwegs in LBPS03-behandelten Zellen könnte eine Alternative darstellen, sodass *c-IAP2* verstärkt in Zellen akkumuliert, indem die gesteigerte Expression der Protease USP11 das Protein *c-IAP2* auf posttranslationaler Ebene zunehmend stabilisiert (vgl. Abb. 37). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs könnte ein Versuch sein, eine Resistenz gegenüber LBPS03-induzierter Apoptose zu erwerben.

Neben Genen, die in einer NF- κ B-abhängigen Weise in LBPS03-stimulierten Zellen zur erhöhten Expression von antiapoptotischen Genen führten, konnten das Gen *TNFRSF10B*, welches für den TRAIL-R2-Rezeptor kodiert, und *Fas*, welches ebenfalls in Folge einer NF- κ B-beziehungsweise p53-Aktivierung induziert werden kann, als LBPS03-induzierbare Gene identifiziert werden (CHAN et al., 1999). Beide Proteine sind befähigt, den extrinsischen Apoptosesignalweg zu induzieren (vgl. Abb. 37).

Die Untersuchung des Zelltod-Aktivators LBPS03 deutet darauf hin, dass Smac-Mimetika nicht zwangsläufig zelluläre IAPs degradieren müssen, um effektiv die Apoptose zu induzieren. Ob der kanonische oder nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg infolge einer Smac-Mimetika-Behandlung induziert werden kann, hängt hauptsächlich von dem Zielmolekül der Substanzen ab. *c-IAP*-degradierende Smac-Mimetika bevorzugen den nicht-kanonischen Signalweg über die Stabilisierung der Kinase NIK, wohingegen der XIAP-degradierende Zelltod-Aktivator LBPS03 direkt die Apoptose induziert. Die LBPS03-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs könnte einen Resistenzmechanismus darstellen, der entweder durch die Bildung eines PIDDosom-Komplexes in Folge von DNA-Schädigung auftritt oder in einer TNF-R1-abhängigen Weise, die zur Stabilisierung von RIP1 führt. Folglich wird NEMO aktiviert und I κ B α degradiert, was wiederum den kanonischen NF- κ B-Signalweg induziert und zur Transkription von antiapoptotischen Genen wie *c-IAP1*, *c-IAP2* und *FLIP*, aber auch proapoptotischen Faktoren wie CD95 und TRAIL-R2 führt (vgl. Abb. 37). Smac-Mimetika, die ausschließlich die Degradierung von zellulären IAPs einleiten, müssen zwangsläufig in einer autokrinen/parakrinen Schleife proapoptotische Faktoren sekretieren, damit in einer

zweiten Aktivierung die Apoptose induziert werden kann. Die verstärkte Expression von *Fas* in LBPS03-behandelten Zellen könnte dabei ähnlich wie die Sekretion von Zytokine, die in autokrinen/parakrinen Wirkweisen durch Smac-Mimetika hervorgerufen werden, durch NF- κ B induziert werden oder in einer p53-abhängigen Weise. Im Gegensatz zu den bekannten Smac-Mimetika wird jedoch durch LBPS03 nicht das Gen *TNF α* transkribiert, sondern vermehrt die Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 exprimiert.

4.4.10. LBPS03 fördert die Ubiquitinierung von A20, einem Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs

Neben I κ B α stellt das Molekül A20 einen wichtigen Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B dar (LEE et al., 2000). A20 gehört zu den TNF-induzierbaren Genen, welche in Abhängigkeit von NF- κ B transkribiert werden und zugleich die Funktion besitzen, die Apoptose in TNF-vermittelten Signalwegen zu inhibieren (DIXIT et al., 1990; OPIPARI et al., 1992). Das Gen *TNFAIP3*, welches für das Protein A20 kodiert, wird vermutlich verstärkt exprimiert durch die LBPS03-vermittelte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (vgl. Tab. 7). Gleichzeitig geben einige Untersuchungen Hinweise darauf, dass das Protein A20 durch LBPS03 ubiquitiniert wird (vgl. Abb. 29). Eine LBPS03-abhängige Ubiquitinierung von A20 hat möglicherweise zur Folge, dass die Kinase RIP1 nicht mehr für den proteosomalen Abbau durch A20 gekennzeichnet werden kann und in den Zellen akkumuliert (vgl. Abb. 27). Tumorzellen, die dagegen deutlich erhöhte Expressionslevel von A20 aufwiesen, charakterisierten sich durch eine Resistenz gegenüber TNF-vermittelter Apoptose, indem die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs unterdrückt wurde (Übersicht in BEYAERT et al., 2000). BEYAERT und Kollegen (2000) schildern zusammenfassend in ihrer Arbeit die Funktion von A20. Die Anwesenheit von A20 unterbindet die Phosphorylierung von I κ B α und verhindert zugleich dessen Degradierung. Übereinstimmende Ergebnisse erzielten auch LEE und Kollegen (2000), die nachweisen konnten, dass A20-defiziente embryonale Mausfibroblasten gegenüber TNF-induziertem Zelltod sehr sensitiv waren. Die verlängerte IKK-Aktivierung und I κ B α -Phosphorylierung förderten eine NF- κ B-Aktivierung und die damit einhergehende Expression von Zytokinen. Die Hemmung von IKK, vergleichbar mit einer Inhibierung durch A20, verhinderte die Assoziation von c-IAP2 an den Rezeptor, sodass RIP1 nicht mehr von dem membrangebundenen Rezeptor dissoziieren konnte (vgl. Abb. 37). Als Konsequenz wurde die Interaktion zwischen RIP1 mit Caspase-8 und FADD unterbunden (zusammengefasst in PETERSEN et al., 2010). Die A20-Ubiquitinierung in LBPS03-behandelten Zellen begünstigt möglicherweise das proapoptotische Schicksal, indem RIP1 in

den Zellen akkumuliert, zur Initiierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs führt und die Transkription von proapoptotischen Zytokinen fördert. Ein Faktor, der im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht wurde, ist das Protein CYLD, welches an der RIP1-abhängigen Aktivierung der Caspase-8 durch den Komplex Iib beteiligt ist, indem es die Ubiquitinierungsketten ähnlich wie A20 entfernt, was dann jedoch zu einer Stabilisierung von RIP1 führt (WANG et al., 2008). Da der Zelltod-Aktivator LBPS03 konzentrationsabhängig die Spaltung der Kinase RIP1 unterdrückt, zugleich zunehmend in ClearCa-2-Zellen akkumuliert und der NF- κ B-Signalweg induziert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass sich durch die Interaktion aus FADD, RIP1 und Caspase-8 der Komplex Iia beziehungsweise der durch genotoxischen Stress entstandene Ripoptosom-Komplex formieren kann und die Caspase-8 aktiviert (vgl. Abb. 37).

4.4.11. Die Stabilisierung von RIP1 durch LBPS03 begünstigt möglicherweise die Ripoptosombindung und die Initiierung der Caspase-8

Obwohl die IAPs nicht direkt an der Inhibierung der Caspase-8 beteiligt sind, postulierten GAITHER und Kollegen (2007) in ihrer Arbeit, dass bei einer Smac-Mimetika-bedingten Apoptose der extrinsische Signalweg nicht weniger relevant ist als der intrinsische Signalweg. Für die Substanz LBPS03 konnte nicht nur die Aktivierung des intrinsischen, sondern auch eine Beteiligung des extrinsischen Apoptosesignalweges beobachtet werden. Möglichkeiten zur Initiierung der Caspase-8 sind, dass LBPS03 in einer NF- κ B-abhängigen Weise über eine Feedback-Schleife beziehungsweise durch eine p53-Aktivierung zur Sekretion von CD95 führen und den extrinsischen Signalweg aktiviert (vgl. Abb. 37). Der DISC-Komplex initiiert die Aktivierung der Caspase-8 und kann zudem die Kinase RIP1 rekrutieren, sodass sich das Ripoptosom formiert (KISCHKEL et al., 1995) und in einer RIP1-abhängigen Weise die Apoptose induziert. Neben der Möglichkeit, dass der Ripoptosom-Komplex sich infolge einer Todesliganden-vermittelten Apoptose bildet, kann sich der Komplex auch spontan durch genotoxischen Stress formieren (TENEV et al., 2011). Des Weiteren besteht die Option, dass in einer RIP1-abhängigen Weise die Caspase-8 initiiert wird, indem aus dem TNFR-assoziierten Komplex I der zytosolische Komplex Iia hervorgeht und in einer TRADD-abhängigen Weise die Apoptose einleitet (TENEV et al., 2011).

Der Abbau zellulärer IAPs unter Einfluss von Smac-Mimetika begünstigt die Formierung des Ripoptosoms und die Aktivierung der Caspase-8. Da jedoch die zellulären IAPs durch den Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 verstärkt exprimiert wurden, scheint die Bildung des

RIP-abhängigen Komplexes unabhängig von der Degradation der c-IAPs zu verlaufen. Alternativ könnte genotoxischer Stress sowie die CD95-vermittelte Signalweiterleitung die Formierung des Ripoptosom-Komplexes begünstigen. Die Aktivierung der Caspase-8 hängt davon ab, ob aus dem Ripoptosom-Komplex eine Caspase-8-Homodimerisierung, eine Caspase-8-c-FLIP_L- oder eine Caspase-8-c-FLIP_S-Heterodimerisierung hervorgeht, wobei Erstere als einzige die Apoptose induzieren kann. Eine Heterodimerisierung mit c-FLIP_L führt meistens zu einer Spaltung von RIP1 und zum Zellüberleben, wohingegen ein Heterodimer aus c-FLIP_S und Caspase-8 in der Nekroptose mündet (SCHILLING et al., 2014). LEE UND SONG (2016) beobachteten, dass die Apoptose unterdrückt werden kann, wenn zum Zeitpunkt der NF-κB-abhängigen c-IAP2-Expression, nicht genügend RIP1-FADD-Caspase-8-Komplexe gebildet wird. Die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs sowie eine Zunahme im c-IAP2-Proteinniveau und eine Caspase-8-Aktivierung würde dafür sprechen, dass sich zum Zeitpunkt der möglichen c-IAP2-Stabilisierung genügend Ripoptosom-Komplexe in LBPS03-behandelten Zellen gebildet haben, sodass die Initiierung der Caspase-8 erfolgt. TENEV und Kollegen (2011) schildern in ihrer Arbeit, dass eine induzierte Überexpression von RIP1 durch Smac-Mimetika zu einer spontanen TNF-, TRAIL-, CD95L- und Mitochondrien-unabhängigen Formierung des RIP1/FADD/Caspase-8-Komplex führt.

Inwieweit tatsächlich das Ripoptosom für die Aktivierung verantwortlich ist, bleibt noch zu klären. Der DNA-Damagepathway, der in LBPS03-behandelten Zellen zu einer p53-Aktivierung führt, würde des Weiteren auf eine spontane Formierung des Ripoptosoms hindeuten. Die verstärkte Expression von CD95 deutet auf die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs hin. RIP1 würde demnach eine bivalente Funktion übernehmen, die in einer ersten Aktivierungswelle in LBPS03-behandelten Zellen in einer Aktivierung des NF-κB-Signalwegs mündet. Die zweite Welle induziert durch die Sekretion von CD95 den extrinsischen Apoptosesignalweg, falls CD95 nicht infolge einer p53-Aktivierung initiiert wird.

Necrostatin-1 ist ein Hemmer der Kinase RIP1, der die Interaktion zwischen RIP1 und RIP3 unterbindet (DEGTEREV et al., 2005). Die Hemmung durch Necrostatin-1 scheint keinen Einfluss auf das apoptotische Schicksal von LBPS03-behandelten Zellen zu nehmen. Nec-1 in Kombination mit LBPS03 verstärken weder die Caspase-8 noch verminderten sie diese (vgl. Abb. 35 A). Des Weiteren besaß Necrostatin-1 nicht die Fähigkeit, die Caspase-3-induzierte PARP-Spaltung in LBPS03-behandelten Zellen zu steigern oder zu reduzieren (vgl. Abb. 35 C). Interessanterweise jedoch bewirkten Nec-1 und LBPS03 in einer vergleichbaren Weise die RIP1-Akkumulation in ClearCa-2-Zellen (vgl. Abb. 36). Necrostatin-1 besitzt die Möglichkeit, mit seinem Zielmolekül RIP1 zu interagieren, um die Kinase zu stabilisieren,

sodass RIP1 in einer inaktiven Konformation vorliegt (XIE et al., 2013). Vergleichende Effekte induzierte vermutlich die Substanz LBPS03. Die Kombination beider Substanzen stabilisierte die Kinase RIP1 in einer additiven Weise (vgl. Abb. 36). Die Akkumulation von RIP1 durch LBPS03 fördert möglicherweise die Stabilisierung der Kinase, was auf eine Formierung des Ripoptosoms zurückzuführen ist. Die Stabilisierung durch Necrostatin-1 dagegen scheint ein Resultat einer Inaktivierung des Proteins zu sein. Obwohl RIP1 durch Nec-1 möglicherweise inaktiviert wird, kann die Caspase-8 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 induziert werden.

4.4.12. Durch die Hemmung der Caspasen wird in LBPS03-stimulierten Zellen ein Caspase-unabhängiger Zelltod induziert

Obwohl die Aktivierung der Caspasen durch Z-VAD-FMK effizient in LBPS03-behandelten Zellen blockiert werden konnte, konnte das Überleben nicht vollständig durch die Verwendung eines Caspaseinhibitors gesteigert werden. Eine Alternative zur Apoptose stellt die Nekroptose dar, bei der es sich um eine Form des Caspase-unabhängigen Zelltods handelt (VANDEN et al., 2014). RIP1 übernimmt eine wichtige Schalterfunktion in der Nekroptose und der RIP-abhängigen Apoptose (FEOKTISTOVA et al., 2011; TENEV et al., 2011). Werden Caspasen durch Caspaseinhibitoren wie Z-VAD-FMK gehemmt, können Zellen einem programmierten nekrotischen Zellschicksal, der Nekroptose, unterliegen (CAUWELS et al., 2003; VERCAMMEN et al., 1998; VANDEN et al., 2014). In Folge der Inhibierung der Caspasen durch Z-VAD-FMK in LBPS03-behandelten Zellen könnte aus dem RIP-abhängigen Komplex IIA beziehungsweise dem Ripoptosom das Necrosom hervorgehen, um die Nekroptose zu induzieren. Um zu überprüfen, ob in LBPS03/Z-VAD-FMK-stimulierten Zellen die Nekroptose induziert werden konnte, wurde der Nekroptoseinhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) verwendet. Die Anwendung von Nec-1 konnte das Überleben in LBPS03-behandelten Zellen unter Zugabe des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK jedoch nicht steigern (vgl. Abb. 34).

Für einige Smac-Mimetika konnte bereits das Umschalten zwischen Apoptose zu Nekroptose durch die Inhibierung von Caspasen beschrieben werden. Das Smac-Mimetikum BV6 und IFN α induzierten in einer synergistischen Weise die Apoptose durch die Aktivierung der Caspasen (ROESLER et al., 2016). Eine Hemmung der Caspasen löste einen nekroptotischen Zelltod aus, der unter Verwendung von Nec-1 das Zellüberleben sicherte (ROESLER et al., 2016). Auch REITER und Kollegen (2016) zeigten in ihrer Arbeit an Nierenzellkarzinomzellen, dass BV6 und TNF α in einer kombinatorischen Anwendung die Apoptose induzierten. Durch eine gleichzeitige Caspasehemmung steigerte Nec-1 das Zellüberleben in BV6/TNF α -

stimulierten Zellen jedoch nicht signifikant. Sie konnten nachweisen, dass eine pharmakologische Hemmung der Kinase RIP1 nicht ausreichend war, um die programmierte Nekrose zu unterdrücken. Ein RIP1-Knockdown dagegen hemmte eine BV6/TNF α -induzierte Nekroptose unter Einfluss eines Caspaseinhibitors (REITER et al., 2016). Die Untersuchungen von REITER und Kollegen (2016) konnten jedoch auch dafür sprechen, dass die pharmakologische Hemmung durch Nec-1 in LBPS03/Z-VAD-FMK-stimulierten Zellen nicht ausreichend ist, um den nekroptotischen Zelltod umzukehren. Um zu überprüfen, ob LBPS03/Z-VAD-FMK-stimulierte Zellen die Nekroptose induzieren, müsste in weiteren Untersuchungen ein RIP1-Knockdown durchgeführt werden.

Necrosulfonamide (NSA) ist ein MLKL-Inhibitor und weiterer Hemmer der Nekroptose, der die RIP3-abhängige Phosphorylierung von MLKL verhindert (SUN et al., 2012). CHROMIK und Kollegen (2014) wiesen nach, dass BV6 in Kombination mit Cytarabin in akuten myeloischen Leukämiezellen die Apoptose induziert, wobei die Verwendung eines Caspaseinhibitors das Zellüberleben nicht steigert. Sowohl eine zusätzliche Verwendung von Nec-1 wie auch NSA hoben dagegen das Zellüberleben auf Kontrollniveau an und wiesen damit nach, dass durch die Hemmung der Caspasen das nekroptotische Zellschicksal beeinflusst wurde (CHROMIK et al., 2014).

Der anhaltende Zelltod unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 in Anwesenheit des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK bewirkte zudem eine Zunahme im p53-Expressionsniveau im Vergleich zu einer LBPS03-Einzelbehandlung (vgl. Abb. 26 B). GODEFROY und Kollegen (2004) zeigten, dass die Inhibierung von Caspasen zu einem p53-induzierten Caspase-unabhängigen und Bcl-2-insensitiven Zelltod führen kann. Neben der Nekroptose könnte in LBPS03/Z-VAD-FMK-behandelten Zellen auch eine weitere Form des Caspase-unabhängigen Zelltods eine Rolle spielen. Der Caspase-unabhängige Zelltod, der in Folge einer Aktivierung des JNK-Signalweges eintritt, wird durch zellulären Stress induziert, führt zur Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 durch die JNK-Kinase (FUCHS et al., 1998). MATSUYOSHI und Kollegen (2006) beobachteten eine JNK/FADD-vermittelte Regulation durch Paclitaxel oder Tamoxifen, die eine FADD-Phosphorylierung und Aktivierung des JNK-Signalwegs bewirkte, infolgedessen p53 stabilisiert wurde, der Zellzyklusarrest eingeleitet und das Tumorwachstum gehemmt wurde. In den Todessignalwegen durch CD95-Liganden beteiligt sich FADD normalerweise an der Formierung des DISC-Komplexes, der zur proteolytischen Spaltung von Caspase-8 führt (KISCHKEL et al., 1995). JNK repräsentiert möglicherweise ein Schlüsselmolekül, das durch die Phosphorylierung von FADD auch in einer Todesliganden-unabhängigen Weise die Initiierung der Caspase-8 hervorrufen und die

Apoptose induzieren kann (CHEN et al., 2001). MULLER-SIENERTH und Kollegen (2011) zeigten, dass der JNK-Signalweg auch über die Bindung eines Liganden an den TNF-R1-Rezeptor aktiviert werden kann. In Anwesenheit des Zytokines TNF α induzierte Birinapant eine TNF-R1-abhängige Phosphorylierung von JNK, das neben der Phosphorylierung von I κ B α ein Marker für die Initiierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs darstellt (MULLER-SIENERTH et al., 2011). Eine Aktivierung des JNK-Signalwegs durch LBPS03 könnte demnach sowohl durch DNA-Schädigung wie durch Rezeptorstimulation vermittelt werden und in An- wie auch in Abwesenheit von Caspasen zum Zelltod führen. Die anhaltende Expression von p53 in LBPS03-stimulierten Zellen unter Einfluss des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK würde eine Beteiligung des JNK-Signalwegs nicht ausschließen. Durch LBPS03-vermittelten genotoxischen Stress könnte möglicherweise FADD in Abhängigkeit von JNK phosphoryliert und die Caspase-8 aktiviert werden. Die Anwesenheit des Caspaseinhibitors führt möglicherweise dazu, dass die Caspase-8-Aktivierung blockiert wird und LBPS03 in einer JNK- und p53-abhängigen Weise den Zellzyklusarrest einleitet.

Interessanterweise deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass LBPS03 den Proteinlevel der Katalase reduzierte (vgl. Abb. 13). Dies könnte dafür sprechen, dass der JNK-Signalweg aktiviert wird, um eine ROS-abhängige Apoptose zu induzieren (vgl. Abb. 37). HEINZELMANN UND BAUER (2010) zeigten, dass die pharmakologische Inhibierung der Katalase durch 3-Aminotriazole, die HOCl- und NO/Peroxynitrit-Signalwege reaktiviert und die Apoptose induziert werden konnte. Eine Möglichkeit der verminderten Expression der Katalase würde dafür sprechen, dass LBPS03 auch unter Abwesenheit des Caspaseinhibitors den JNK-Signalweg beeinflusst und die Apoptose induziert.

Die Hinweise auf eine verminderte Proteinmenge von Pon2 in LBPS03-behandelten Zellen sprechen für eine Aktivierung des JNK-Signalwegs, da Pon2 direkt den JNK-Signalweg hemmen kann und indirekt die Superoxid-Freisetzung aus der inneren Mitochondrienmembran reduziert (WITTE et al., 2012). In Folge einer massiven Störung der Ca²⁺-Homöostase könnte die Expression von Pon2 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS03 durch einen Calpain-abhängigen Abbau reduziert und die Apoptose eingeleitet werden (HORKE et al., 2008). Die Reduktion beider Proteine, die an der Hemmung der JNK-abhängigen Apoptose beteiligt sind, deutet daher darauf hin, dass ER-Stress in LBPS03-Zellen eine weitere Rolle spielen könnte. Neben der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs weisen einige Ergebnisse darauf hin, dass eine genotoxische Schädigung beziehungsweise eine Aktivierung des DNA-Damagepathways zur Initiierung des p53-Signalwegs führt (vgl. Abb. 37).

4.5. Necrosulfonamide induziert in ClearCa-2 die Apoptose und wirkt zusammen mit LBPS03 in einer additiven Weise

Necrosulfonamide (NSA) ist ein Inhibitor des RIP3-Substrats MLKL und ist dazu in der Lage, die Nekroptose zu hemmen (LIAO et al., 2014). In ClearCa-2-Zellen besaß NSA per se bereits gute antiproliferative Eigenschaften (vgl. Abb. 34). Der Einsatz von NSA bewirkte keine Veränderungen im Proteinniveau von MLKL. Im Vergleich zu LBPS03 rief NSA bereits in einer 10-fach geringeren Konzentration die Aktivierung der Caspase-8 hervor (Abb. 35 A+B) und induzierte die Spaltung des Caspase-3-Substrats PARP (vgl. Abb. 35 C). Wurde NSA in Kombination mit LBPS03 verwendet, verstärkten sich die Caspase-8-aktivierenden Effekte und die Caspase-3-abhängige PARP-Spaltung in einer additiven Weise (vgl. Abb. 35 B+C). Vergleichbare Beobachtungen machten auch REMIJSSEN und Kollegen (2014): Der Knockdown von RIP3 beziehungsweise MLKL unterdrückt eine TNF-induzierte Nekroptose und induziert eine RIP1-abhängige Apoptose. Auf Proteinebene konnte weder durch LBPS03 noch durch NSA eine Verringerung der MLKL-Proteinmenge beobachtet werden. Eine Inhibierung des RIP3-Substrats MLKL durch NSA ist damit jedoch nicht ausgeschlossen und würde in ClearCa-2 das apoptotische Zellschicksal begünstigen. Des Weiteren ließ sich durch NSA eine RIP1-Degradierung beobachten (vgl. Abb. 36). Auf Proteinebene konnte eine signifikante Zunahme der RIP1-Proteinmenge durch LBPS03 beschrieben werden (vgl. Abb. 27). Die zusätzliche Anwendung des MLKL-Inhibitors in Kombination mit LBPS03 führten dazu, dass das RIP1-Proteinlevel signifikant stärker reduziert werden konnte, als die Summe aus den Effekte einer Einzelbehandlung (vgl. Abb. 36).

In welchem Zusammenhang die Inhibierung des RIP3-Substrats durch NSA mit der Caspase-8-Aktivierung steht, bleibt noch zu klären. Die verstärkte Caspase-8-Aktivierung könnte jedoch dafür verantwortlich sein, dass RIP1 durch eine TNF-R1-, CD95- oder TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose gespalten wird (LIN et al., 1999). Recherchen ergaben, dass die beobachtete Induktion der Apoptose in ClearCa-2-Zellen durch NSA bislang einzigartig ist.

4.6. Der Zelltod-Aktivator LBPS05 induziert einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod

Die Nekroptose, ein Caspase-unabhängiger Zelltod, kann unter anderem durch die Aktivierung des Todesrezeptors der TNF-Familien induziert werden (DEGTEREV et al., 2005). In Abwesenheit von Caspaseinhibitoren vermittelt der aktivierte Rezeptor durch die

Formierung des Komplexes IIa oder des Ripoptosoms die Initiierung der Caspase-8. Sind Caspasen dagegen durch c-FLIP, FADD/Caspase-8-Defizienz oder RIP3-Induktion blockiert, wird ein nekroptotisches Zellschicksal eingeleitet (vgl. KACZMAREK et al., 2013). Durch Smac-Mimetika, die zelluläre IAPs destabilisieren, oder die CYLD-abhängige Deubiquitinierung von RIP1 wird der kanonische NF- κ B-Signalweg unterdrückt und der nicht-kanonische initiiert. Als Folge bildet sich ein RIP1-abhängiger zytoplasmatischer Komplex, der durch die An- beziehungsweise Abwesenheit der Caspase-8 die Apoptose oder die Nekroptose induziert (Übersicht in VANDEN et al., 2014).

Im Gegensatz zum neuartigen Zelltod-Aktivator LBPS03 wies LBPS05 keine charakteristischen Kennzeichen der Apoptose auf (vgl. Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12). Als deutlich ineffektiver erwies sich LBPS05 im Gegensatz zu LBPS03 bei der Degradierung seines potentiellen Zielmoleküls XIAP (vgl. Abb. 30 A). LBPS05 bewirkte keine Veränderungen im XIAP-Expressionsniveau mit Ausnahme der höchsten getesteten Konzentration. Gleichzeitig trat mit der Verringerung der Proteinmenge eine mögliche modifizierte XIAP-Form auf (vgl. Abb. 30 A). Die degradierenden Effekte, die durch LBPS05 erst in hohen Konzentrationen eintraten, deuten darauf hin, dass LBPS05 möglicherweise eine andere Bindeaffinität zu XIAP besitzt als LBPS03. Diese Hypothese lässt sich unterstützen durch die Tatsache, dass der Zelltod-Aktivator keine Aktivierung der Caspasen induziert. Vergleichbar zu LBPS03 konnte LBPS05 jedoch die Induktion beziehungsweise Stabilisierung von c-IAP1 bewirken (vgl. Abb. 30 B). Auf Transkriptionsebene konnte die Zunahme der c-IAP1-mRNA nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der ausgewählte Zeitpunkt zu spät oder die Konzentration zu gering, um eine Zunahme auf mRNA-Ebene zu messen. Denn BITON UND ASHKENAZI (2011) wiesen eine NF- κ B-abhängige Zunahme der c-IAP1-mRNA bereits 6 Stunden nach DNA-Schädigung nach. Die Zunahme der Proteinmenge von c-IAP1 in LBPS05-stimulierten Zellen könnte auf die verstärkte Transkription zurückzuführen sein oder sie entsteht durch die Interaktion zwischen LBPS05 und c-IAP1, sodass c-IAP1 in einer inaktiven Form stabilisiert wird. Anders als LBPS03 wiederum konnte durch LBPS05 keine Induktion der Proteinmenge von c-IAP2 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 30 C).

Als Schlüsselregulator besitzt RIP1 die Möglichkeit, sowohl entzündliche Signalwege über die Aktivierung von NF- κ B zu regulieren wie auch ein apoptotisches beziehungsweise nekroptotisches Zellschicksal einzuleiten. Etwas effektiver als LBPS03 bewirkte LBPS05 die Akkumulation der Kinase RIP1 in einer konzentrationsabhängigen Weise (vgl. Abb. 33 A). Die Akkumulation beziehungsweise Zunahme der RIP1-Form korrelierte zudem mit einer

konzentrationsabhängigen Reduktion der gespaltenen Form von RIP1. Anders als bei LBPS03 begünstigte LBPS05 nicht die I κ B α -Degradierung. Des Weiteren traten keine Hinweise auf eine Ubiquitinierung der Proteine A20 und NIK auf. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass LBPS05 geringen bis keinen Einfluss auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg besitzt. Da in LBPS05-stimulierten Zellen neben der Akkumulation von RIP1 keine Caspase-8-Aktivität auftrat, ist zu vermuten, dass sich das Necrosom bilden kann (vgl. Abb. 38). Das Necrosom, ein Komplex aus TRADD, FADD, RIP1, RIP3, Caspase-8 und c-FLIP, fördert die Phosphorylierung von MLKL und die Induktion der Nekroptose (LI et al., 2012). Sind Caspasen inhibiert, so bildet sich das Necrosom entweder aus dem TNFR-assoziierten Komplex I beziehungsweise aus dem Sress-induzierten Ripoptosom-Komplex. Nekroptose-inhibitoren wie zum Beispiel Necrostatin-1 und Necrosulfonamide sind in der Lage, den Necrosom-Komplex zu inhibieren und die Apoptose zu induzieren (DEGTEREV et al., 2008; SUN et al., 2012).

Die Verwendung des Nekroptosehemmers Nec-1 förderte kein apoptotisches Zellschicksal in LBPS05-behandelten Zellen (vgl. Abb. 34). Die Unfähigkeit von Nec-1, den LBPS05-induzierte Nekroptose-ähnlichen Zelltod zu inhibieren, könnte auf eine unzureichende Hemmung der Kinase RIP1 zurückzuführen sein. REITER und Kollegen (2016) beschrieben, dass in einigen Fällen die pharmakologische Hemmung der Kinase RIP1 nicht ausreichend ist, um die Nekroptose zu unterdrücken. Erst ein Knockdown von RIP1 ermöglichte das Umschalten von Nekroptose auf Apoptose. Interessanterweise jedoch bewirkten sowohl LBPS05 wie auch Nec-1 die signifikante Zunahme der RIP1-Proteinmenge (vgl. Abb. 36). Necrostatin-1 konnte zwar auf Proteinebene die Akkumulation von RIP1 in LBPS05-behandelten Zellen umkehren, nicht aber den proapoptotischen Zelltod fördern. Eine pharmakologische Hemmung der Kinase RIP1 ist vermutlich nicht ausreichend, um den Nekroptose-ähnlichen Zelltod durch LBPS05 zu inhibieren.

4.6.1. LBPS05 induziert zusammen mit Necrosulfonamide die Apoptose in einer verstärkenden Weise

Neben Necrostatin-1 stellt Necrosulfonamide einen interessanten Inhibitor der Nekroptose dar. Bereits in einer Einzelbehandlung förderte NSA die Aktivierung der Caspase-8, dessen Potential in einer steigenden Weise durch den Zelltod-Aktivator LBPS05 verstärkt werden konnte (vgl. Abb. 35). Zudem war LBPS05 nicht in der Lage, das Caspase-3-Substrat PARP zu spalten (vgl. Abb. 35 B+C). Der MLKL-Inhibitor NSA dagegen induzierte eine PARP-Spaltung, die durch die Verwendung des Zelltod-Aktivators LBPS05 deutlich verstärkt

werden konnte. Auch das Zellüberleben reduzierte sich durch LBPS05 in Kombination mit NSA in einer Weise, die stärker als die additiven Effekte einer Einzelbehandlung waren. Wie bereits beschrieben, verringerte NSA die Proteinmenge von RIP1. Der Zelltod-Aktivator LBPS05 dagegen besitzt eher stabilisierende Effekte auf die Kinase, wohingegen eine Kombination aus beiden Substanzen das Proteinniveau weiter absenkte (vgl. Abb. 36).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass LBPS05 einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod induziert, der vergleichbar zu den Mechanismen ist, die in Smac-Mimetika-stimulierten Zellen unter Einfluss eines Caspaseinhibitors wie Z-VAD-FMK und TNF α beobachtet werden (FULDA, 2015). Bereits allein fördert NSA das apoptotische Zellschicksal in ClearCa-2-Zellen. Die Verwendung des MLKL-Inhibitors NSA verlagert die LBPS05-induzierte Nekroptose zu Gunsten der Apoptose (vgl. Abb. 38).

4.6.2. Die Rolle von RIP1 im PIDDosomen-Komplex

Das Auftreten von DNA-Schäden oder genotoxischem Stress ist nicht zwangsläufig an die Aktivierung von p53 gekoppelt (zusammengefasst in BITON & ASHKENAZI, 2011). Für LBPS05 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass p53 unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht induziert werden konnte. Die leichte Zunahme der phosphorylierten NF- κ B-p65-Untereinheit deutet darauf hin, dass der kanonische Signalweg geringfügig aktiviert ist. Da weder eine Ubiquitinierung von A20 noch von NIK beobachtet werden konnte, würde dies dafür sprechen, dass der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg das Zellüberleben sichert. Die Expression von antiapoptotischen Komponenten wie FLIP und c-IAPs können das Überleben begünstigen (Übersicht in WILSON et al., 2009). Die Akkumulation von RIP1 ist möglicherweise auf genotoxische Schädigung zurückzuführen, die in einer TNFR-unabhängigen Weise zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt. In Folge einer genotoxischen Schädigung würde in einer RIP1-abhängigen Weise zunächst das Ripoptosom gebildet werden, welches in Anwesenheit von antiapoptotischen Komponenten wie c-FLIP und c-IAP das Necrosom bildet und die Nekroptose induziert (vgl. Abb. 38; TENEV et al., 2011).

Neben seiner Kinaseaktivität übernimmt RIP1 eine weitere wichtige Funktion in der Formierung des PIDDosom-Komplexes, der infolge einer DNA-Schädigung gebildet werden kann und der den NF- κ B-Signalweg induziert. Dabei wird zunächst ein Überlebenskomplex aus RIP1 und NEMO gebildet, der NF- κ B induziert. Infolgedessen formiert sich ein proapoptotischer Komplex aus RAIDD und Caspase-2 (FESTJENS et al., 2007). Interessanter-

weise konnte trotz einer nicht vorhandenen p53-Aktivierung infolge eines LBPS05-Stimulus das Protein PIDD-FL auf Proteinebene deutlich zunehmen (vgl. Abb. 33 B). Zugleich konnte eine starke Reduktion des Proteins PIDD-C nachgewiesen werden. Inwieweit eine genotoxische Schädigung durch LBPS05 an der verstärkten PIDD-FL-Expression beteiligt ist, bleibt derzeit offen. Vermutlich bildet sich der Necrosom-Komplex jedoch durch die Folge genotoxischen Stresses, der in der Anwesenheit von c-IAP1 dazu führt, dass Caspasen inhibiert sind und ein nekroptotischer Zelltod eingeleitet werden kann.

Anders als bei vielen bekannten Smac-Mimetika scheint LBPS05 den NF- κ B-Signalweg nicht zu nutzen, um TNF α oder TRAIL zu sekretieren und die Apoptose einzuleiten (BERTRAND et al., 2008; VARFOLOMEEV et al., 2007; PETERSEN et al., 2007). Stattdessen deuteten Array- und Real-Time-PCR-Analysen darauf hin, dass die beiden Zytokine IL8 und CCL20 unter Einfluss des Zelltod-Aktivators LBPS05 verstärkt exprimiert wurden.

BITON UND ASHKENAZI (2011) zeigten in ihrer Studie, dass die Sekretion unter anderem von IL8 durch dauerhafte DNA-Schäden entstehen kann. Die „KEGG-Signalweganalysen“ der Affymetrix-Array-Analysen, weisen daraufhin, dass der Zelltod-Aktivator LBPS05 den „Zytokine-Zytokine-Rezeptorsignalweg“ beeinflusst. Die Gene *IL8* und *CCL20* wurden unter LBPS05-Einfluss verstärkt exprimiert. Sowohl *IL8* als auch *CCL20* sind Gene, die infolge der NF- κ B-Aktivierung transkribiert werden (KUNSCH & ROSEN, 1993; SCHUTYSER et al., 2003). Neben der Beteiligung des Zytokine-Zytokine-Signalweges beeinflusst LBPS05 sowohl positiv wie auch negativ Gene, die am Zelltodgeschehen beteiligt sind (vgl. Abb. 31).

BITON UND ASHKENAZI (2011) zeigten in ihrer Arbeit, dass mäßiger genotoxischer Stress das Protein ATM aktiviert, daraufhin NEMO ubiquitiniert und die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs fördert. Diese erste Phase der NF- κ B-Aktivierung verläuft in einer RIP1- sowie TNFR1-unabhängigen Weise und induziert bereits 6 Stunden nach DNA-Schädigung die Transkription von antiapoptotischen Genen, wie *c-FLIP* und *c-IAPs*, um das Zellüberleben zu sichern. Wird die DNA-Schädigung nicht repariert, ist ATM weiterhin aktiviert, was zu einem „Feedforward Signaling Loop“ durch die Produktion von TNF α dazu führt, dass in einer zweiten NF- κ B-Aktivierungswelle die Kinase RIP1 phosphoryliert und in einer c-Jun N-terminalen Kinase (JNK3)-abhängigen Weise IL8 sekretiert wird. Die dafür notwendige K63-Polyubiquitinierung der Kinase RIP1 durch die zellulären IAPs vermittelt dabei die zweite Aktivierungswelle von NF- κ B. Die Sekretion von IL8 signalisiert umliegenden Zellen eine Schädigung und fördert die Rekrutierung von FADD und Caspase-8, das zur Initiierung des programmierten Zelltodes führt (BITON & ASHKENAZI, 2011).

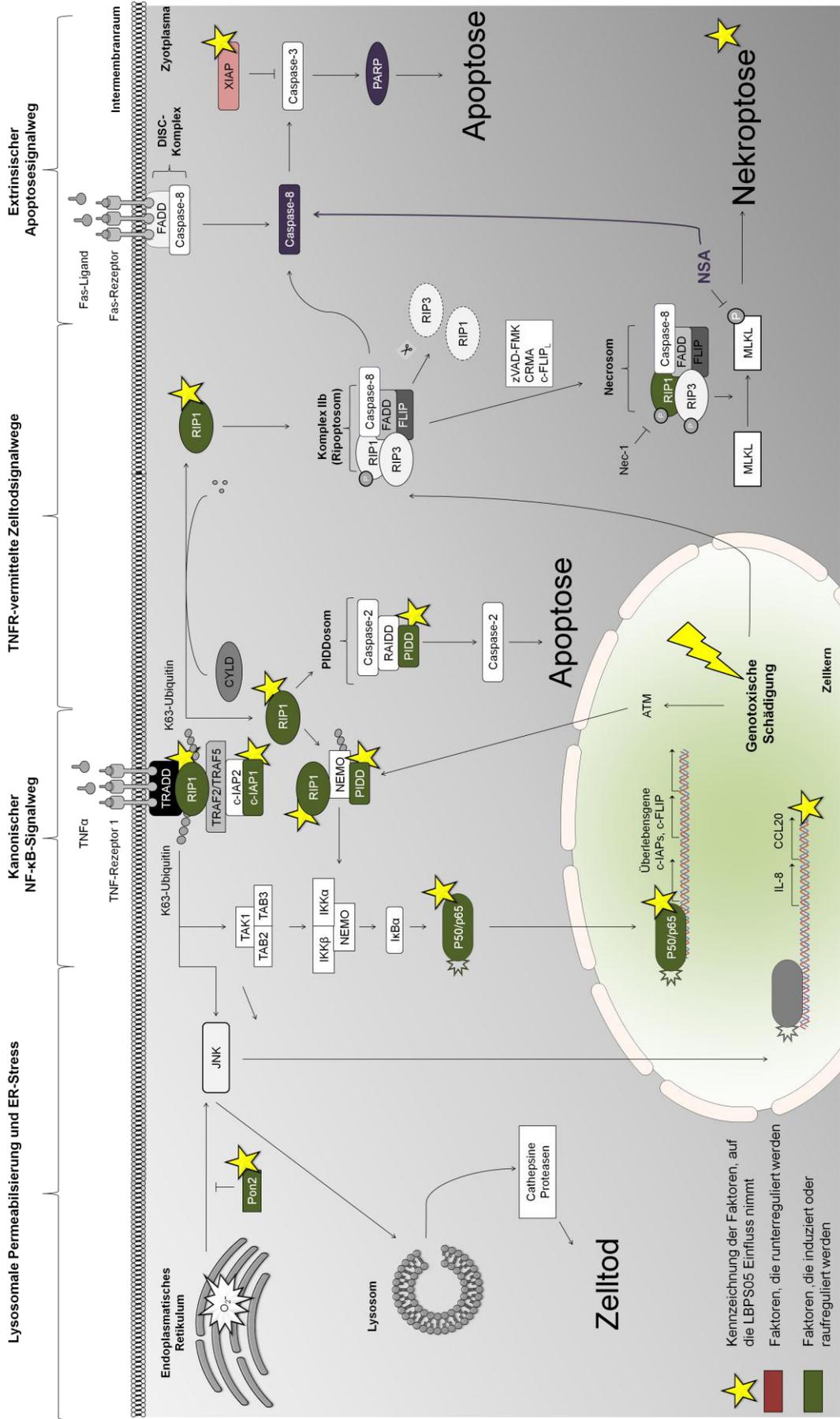


Abbildung 39: Modell möglicher Signalwege, über die LBPS05 den Zelltod einleitet.

KROEMER UND MARTIN (2005) beschreiben in ihrer Arbeit eine Form des Caspase-unabhängigen Zelltods, der über den JNK-Signalweg verlaufen kann und in Abhängigkeit von RIP1 und TRADD zu einer lysosomalen Membranpermeabilisierung führt, was wiederum die Freisetzung von Cathepsine-Proteasen bewirkt und Caspase-unabhängig die Proteolyse der Zelle induziert.

Das Protein Pon2 besitzt eine wichtige Funktion in der Inhibierung der mitochondrialen O_2 -Formation infolge eines ER-induzierten Stresssignals (über JNK und CHOP), hemmt daraufhin proapoptotische Signalwege und schützt Zellen vor oxidativer Schädigung (NG et al., 2001). Erste Hinweise auf eine erhöhte Proteinmenge von Pon2 unter Einfluss von LBPS05 deuten auf eine Unterdrückung der Apoptose hin. Die Hochregulation dieses Proteins ist in vielen Tumorzellen mit einer schlechten Therapieprognose assoziiert (WITTE et al., 2012). Zudem kennzeichnet sich Pon2 durch sein Potential, direkt den JNK-Signalweg zu hemmen. Eine Überexpression von PON2 konnte aber zugleich bei Stress des endoplasmatischen Retikulums beobachtet werden (HORKE et al., 2008). Auch CCL20 konnte durch NF- κ B in Folge von Hypoxie induziert werden (BATTAGLIA et al., 2008). Die Akkumulation von RIP1 und die Sekretion von IL8 und CCL20 könnten darauf hindeuten, dass in einer NF- κ B-abhängigen Weise durch genotoxische Schädigung die Transkription initiiert wird. Die Zunahme der PIDD-FL steht möglicherweise in einem direkten Zusammenhang mit einer RIP1-abhängigen Induktion des NF- κ B-Signalwegs und der Aktivierung des JNK-Signalwegs. Der Zelltod-Aktivator LBPS05 scheint somit neben einem nekroptotischen Zellschicksal auch möglicherweise den JNK-Signalweg zu beeinflussen (vgl. Abb. 38).

4.7. Fazit

Beide neuartigen Zelltod-Aktivatoren sind hochinteressante und vielversprechende Kandidaten für eine spätere Behandlung von Tumorzellen. Jeder induziert den Zelltod auf eine einzigartige Weise. Der Zelltod-Aktivator LBPS03 konnte im Rahmen dieser Arbeit als vielseitiger Apoptose-Induktor identifiziert werden. Besonders außergewöhnlich ist sein Potential, die Apoptose auf vielen Ebenen positiv zu beeinflussen. Kontrovers dazu konnte für LBPS05 ein Caspase-unabhängiger Zelltod induziert werden, der einem nekroptotischen Zellschicksal sehr ähnelte. Durch die Hemmung des RIP3-Substrats MLKL durch den Nekroptoseinhibitor NSA konnte die Apoptose induziert werden. Die Sekretion von Zytokinen wie IL8 und CCL20, die auf eine mögliche Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs

infolge genotoxischer Schädigung zurückzuführen ist, wird möglicherweise in einer JNK-abhängigen Weise unterstützt.

Smac-Mimetika und IAP-Antagonisten dienen zur Definition neuer Optionen für zukünftige Behandlungsstrategien von Tumorerkrankungen. Die zielgerichtete Therapie schaltet hemmende Komponenten, die charakteristisch für Tumorzellen sind, aus und leitet kontrolliert den Zelltod ein. Die Struktur-Wirkung-Analysen der neu identifizierten Substanzen tragen zur Leitstrukturoptimierung bei, sodass neue und noch wirksamere IAP-Antagonisten effizienter identifiziert werden können. Das Liganden-basierte virtuelle Screening stellt eine hervorragende Möglichkeit dar, Substanzen zu identifizieren, die effektiv den Zelltod induzieren. Beide Zelltod-Aktivatoren zeichnen sich durch vollständig verschiedene Wirkmechanismen aus und stellen zwei neue Kandidaten dar, die zukünftig erfolgversprechend dazu beitragen können, Tumorerkrankungen besser und gezielter zu therapieren.

5. Literaturverzeichnis

- Allensworth, J. L., Sauer, S. J., Lyerly, H. K., Morse, M. A. and Devi, G. R. (2013)** 'Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism', *Breast cancer research and treatment*, vol. 137, no. 2, pp. 359–371.
- Altenhofer, S., Witte, I., Teiber, J. F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A. M., Forstermann, U. and Horke, S. (2010)** 'One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity', *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 32, pp. 24398–24403.
- Amin, M. B., Tamboli, P., Javidan, J., Stricker, H., de-Peralta, V. M., Deshpande, A. and Menon, M. (2002)** 'Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases', *The American journal of surgical pathology*, vol. 26, no. 3, pp. 281–291.
- Appella, E. and Anderson, C. W. (2001)** 'Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses', *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 268, no. 10, pp. 2764–2772.
- Bai, L., Smith, D. C. and Wang, S. (2014)** 'Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics', *Pharmacology & therapeutics*, vol. 144, no. 1, pp. 82–95.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A. M. and Prives, C. (2008)** 'A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 6, pp. 1937–1942.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A. M. and Prives, C. (2008)** 'Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 7, no. 9, pp. 1133–1138.
- Bartke, T., Siegmund, D., Peters, N., Reichwein, M., Henkler, F., Scheurich, P. and Wajant, H. (2001)** 'p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells', *Oncogene*, vol. 20, no. 5, pp. 571–580.
- Battaglia, F., Delfino, S., Merello, E., Puppo, M., Piva, R., Varesio, L. and Bosco, M. C. (2008)** 'Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB', *Journal of leukocyte biology*, vol. 83, no. 3, pp. 648–662.
- Bechtel, W. and Bauer, G. (2009)** 'Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling', *Anticancer research*, vol. 29, no. 11, pp. 4541–4557.
- Beckmann, I.-A. (2016)** *Die blauen Ratgeber - Nierenkrebs* [Online], Bonn. Available at deutsche@krebshilfe.de.
- Benetatos, C. A., Mitsuchi, Y., Burns, J. M., Neiman, E. M., Condon, S. M., Yu, G., Seipel, M. E., Kapoor, G. S., Laporte, M. G., Rippin, S. R., Deng, Y., Hendi, M. S., Tirunahari, P. K., Lee, Y.-H., Haimowitz, T., Alexander, M. D., Graham, M. A., Weng, D., Shi, Y., McKinlay, M. A. and Chunduru, S. K. (2014)** 'Birinapant (TL32711), a bivalent SMAC mimetic, targets TRAF2-associated cIAPs, abrogates TNF-induced NF-kappaB activation, and is active in patient-derived xenograft models', *Molecular cancer therapeutics*, vol. 13, no. 4, pp. 867–879.
- Berndsen, C. E. and Wolberger, C. (2014)** 'New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism', *Nature structural & molecular biology*, vol. 21, no. 4, pp. 301–307.
- Bertrand, M. J. M., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith, J. B., Morris, S. J. and Barker, P. A. (2008)** 'cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination', *Molecular cell*, vol. 30, no. 6, pp. 689–700.
- Berube, C., Boucher, L.-M., Ma, W., Wakeham, A., Salmena, L., Hakem, R., Yeh, W.-C., Mak, T. W. and Benchimol, S. (2005)** 'Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 40, pp. 14314–14320.
- Beyaert, R., Heyninck, K. and van Huffel, S. (2000)** 'A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kB-dependent gene expression and apoptosis', *Biochemical Pharmacology*, vol. 60, no. 8, pp. 1143–1151.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. and Miller, L. K. (1994)** 'An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs', *Journal of virology*, vol. 68, no. 4, pp. 2521–2528.
- Biton, S. and Ashkenazi, A. (2011)** 'NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling', *Cell*, vol. 145, no. 1, pp. 92–103.
- Blatt, N. B. and Glick, G. D. (2001)** 'Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death', *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 9, no. 6, pp. 1371–1384.
- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M. and May, E. (2000)** 'Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice', *Oncogene*, vol. 19, no. 5, pp. 649–660.
- Bradford, M. M. (1976)** 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry*, vol. 72, pp. 248–254.
- Brown, J. M. and Attardi, L. D. (2005)** 'The role of apoptosis in cancer development and treatment response', *Nature reviews. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 231–237.
- Cai, Q., Sun, H., Peng, Y., Lu, J., Nikolovska-Coleska, Z., McEachern, D., Liu, L., Qiu, S., Yang, C.-Y., Miller, R., Yi, H., Zhang, T., Sun, D., Kang, S., Guo, M., Leopold, L., Yang, D. and Wang, S. (2011)** 'A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment', *Journal of medicinal chemistry*, vol. 54, no. 8, pp. 2714–2726.
- Cairns, P. (2010)** 'Renal cell carcinoma', *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, vol. 9, 1-6, pp. 461–473.

- Canete, J. D., Albaladejo, C., Hernandez, M. V., Lainez, B., Pinto, J. A., Ramirez, J., Lopez-Armada, M. J., Rodriguez-Cros, J. R., Engel, P., Blanco, F. J. and Sanmarti, R. (2011) 'Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor-alpha receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study', *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 50, no. 4, pp. 721–728.
- Carosati, E., Sforza, G., Pippi, M., Marverti, G., Ligabue, A., Guerrieri, D., Piras, S., Guitoli, G., Luciani, R., Costi, M. P. and Cruciani, G. (2010) 'Ligand-based virtual screening and ADME-tox guided approach to identify triazolo-quinolines as folate cycle inhibitors', *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 18, no. 22, pp. 7773–7785.
- Carosati, E., van den Höfel, N., Reif, M., Randazzo, G. M., Stanitzki, B., Stevens, J., Gabbert, H. E., Cruciani, G., Mannhold, R. and Mahotka, C. (2015) 'Discovery of Novel, Potent, and Specific Cell-Death Inducers in the Jurkat Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line', *ChemMedChem*, vol. 10, no. 10, pp. 1700–1706.
- Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C. and Brouckaert, P. (2003) 'Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2', *Nature immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 387–393.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000) 'Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO', *Nature*, vol. 406, no. 6798, pp. 855–862.
- Chan, H., Bartos, D. P. and Owen-Schaub, L. B. (1999) 'Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment', *Molecular and cellular biology*, vol. 19, no. 3, pp. 2098–2108.
- Chen, C. Y., Juo, P., Liou, J. S., Li, C. Q., Yu, Q., Blenis, J. and Faller, D. V. (2001) 'The recruitment of Fas-associated death domain/caspase-8 in Ras-induced apoptosis', *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 12, no. 6, pp. 297–306.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. and Huang, D. C. S. (2005) 'Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function', *Molecular cell*, vol. 17, no. 3, pp. 393–403.
- Cheung, H. H., St Jean, M., Beug, S. T., Lejmi-Mrad, R., LaCasse, E., Baird, S. D., Stojdl, D. F., Screaton, R. A. and Korneluk, R. G. (2011) 'SMG1 and NIK regulate apoptosis induced by Smac mimetic compounds', *Cell death & disease*, vol. 2, pp. e146.
- Cheville, J. C., Lohse, C. M., Zincke, H., Weaver, A. L. and Blute, M. L. (2003) 'Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma', *The American journal of surgical pathology*, vol. 27, no. 5, pp. 612–624.
- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M. and Chan, F. K.-M. (2009) 'Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation', *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1112–1123.
- Choyke, P. L.; Glenn, G. M.; Walther, M. M.; Zbar, B.; Linehan, W. M. (2003): Hereditary renal cancers. In: *Radiology* 226 (1), S. 33–46. DOI: 10.1148/radiol.2261011296.
- Christofferson, D. E. and Yuan, J. (2010) 'Necroptosis as an alternative form of programmed cell death', *Current opinion in cell biology*, vol. 22, no. 2, pp. 263–268.
- Chromik, J., Safferthal, C., Serve, H. and Fulda, S. (2014) 'Smac mimetic primes apoptosis-resistant acute myeloid leukaemia cells for cytarabine-induced cell death by triggering necroptosis', *Cancer letters*, vol. 344, no. 1, pp. 101–109.
- Chu, G. (2002): Global genomic repair and p53 in a dance after DNA damage. In: *Cancer biology & therapy* 1 (2), S. 150–151.
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H. and Ballard, D. W. (1997) 'Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 19, pp. 10057–10062.
- Collart, M. A., Baeuerle, P. and Vassalli, P. (1990) 'Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B', *Molecular and cellular biology*, vol. 10, no. 4, pp. 1498–1506.
- Crook, N. E., Clem, R. J. and Miller, L. K. (1993) 'An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif', *Journal of virology*, vol. 67, no. 4, pp. 2168–2174.
- Dai, Y., Desano, J., Qu, Y., Tang, W., Meng, Y., Lawrence, T. S. and Xu, L. (2011) 'Natural IAP inhibitor Embelin enhances therapeutic efficacy of ionizing radiation in prostate cancer', *American journal of cancer research*, vol. 1, no. 2, pp. 128–143.
- Davies, C. and Tournier, C. (2012) 'Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies', *Biochemical Society transactions*, vol. 40, no. 1, pp. 85–89.
- Davis, R. J. (2000) 'Signal transduction by the JNK group of MAP kinases', *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 239–252.
- Decker, H. J. (2007) 'Hereditäre Nierentumoren', *medizinische genetik*, vol. 19, no. 2, pp. 239–244.
- Declercq, W., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. (2009) 'RIP kinases at the crossroads of cell death and survival', *Cell*, vol. 138, no. 2, pp. 229–232.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A. and Yuan, J. (2008) 'Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins', *Nature chemical biology*, vol. 4, no. 5, pp. 313–321.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. and Yuan, J. (2005) 'Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury', *Nature chemical biology*, vol. 1, no. 2, pp. 112–119.
- Déjosez, M., Ramp, U., Mahotka, C., Krieg, A., Walczak, H., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D. (2000) 'Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan', *Cell death and differentiation*, vol. 7, no. 11, pp. 1127–1136.

- Denault, J.-B. and Salvesen, G. S.** (2002) 'Caspases: keys in the ignition of cell death', *Chemical reviews*, vol. 102, no. 12, pp. 4489–4500.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF** (2015) *Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnose, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Kurzversion 1*. [Online] (AWMF Registernummer: 043/0170). Available at <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Accessed 23 May 2016).
- Deutsches Krebsforschungszentrum Krebsinformationsdienst** (2014) *Zielgerichtete Krebstherapien: Wie funktionieren sie?* [Online]. Available at <https://www.krebsinformationsdienst.de/wegweiser/iblatte/iblatte-zielgerichtete-krebstherapien.pdf>.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C.** (1999) 'IAP family proteins--suppressors of apoptosis', *Genes & development*, vol. 13, no. 3, pp. 239–252.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997) 'X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases', *Nature*, vol. 388, no. 6639, pp. 300–304.
- DiPersio, J. F., Erba, H. P., Larson, R. A., Luger, S. M., Tallman, M. S., Brill, J. M., Vuagniaux, G., Rouits, E., Sorensen, J. M. and Zanna, C.** (2015) 'Oral Debio1143 (AT406), an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins, combined with daunorubicin and cytarabine in patients with poor-risk acute myeloid leukemia--results of a phase I dose-escalation study', *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, vol. 15, no. 7, pp. 443–449.
- Dixit, V. M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L. B., Wolf, F. W., O'Rourke, K., Ward, P. A., Prochownik, E. V. and Marks, R. M.** (1990) 'Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin', *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 5, pp. 2973–2978.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A. I., Bogen, B., Biberfeld, P. and Grandien, A.** (1999) 'The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors', *The Journal of experimental medicine*, vol. 190, no. 7, pp. 1025–1032.
- Dogan, B., Canda, A. E., Akbulut, Z. and Balbay, M. D.** (2010) 'Re: histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma: B. C. Leibovich, C. M. Lohse, P. L. Crispen, S. A. Boorjian, R. H. Thompson, M. L. Blute and J. C. Cheville J Urol 2010; 183: 1309-1316', *The Journal of urology*, vol. 184, no. 5, pp. 2211; author reply 2211-2.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X.** (2000) 'Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition', *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 33–42.
- Duan, H. and Dixit, V. M.** (1997) 'RAIDD is a new 'death' adaptor molecule', *Nature*, vol. 385, no. 6611, pp. 86–89.
- Dynek, J. N., Goncharov, T., Dueber, E. C., Fedorova, A. V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D. S. and Vucic, D.** (2010) 'c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling', *The EMBO journal*, vol. 29, no. 24, pp. 4198–4209.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H.** (1999) 'Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis', *Annual review of biochemistry*, vol. 68, pp. 383–424.
- el-Deiry, W. S.** (1998) 'Regulation of p53 downstream genes', *Seminars in cancer biology*, vol. 8, no. 5, pp. 345–357.
- Eschenburg, G., Eggert, A., Schramm, A., Lode, H. N. and Hundsdoerfer, P.** (2012) 'Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF-alpha-independent apoptosis', *Cancer research*, vol. 72, no. 10, pp. 2645–2656.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. and Laurenzi, V. de** (2012) 'Role of apoptosis in disease', *Aging*, vol. 4, no. 5, pp. 330–349.
- Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P. D., Shirley, S., Condon, S. M., Chunduru, S. K., McKinlay, M. A., Vaux, D. L., Silke, J. and Day, C. L.** (2011) 'Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization', *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 19, pp. 17015–17028.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G. and Leverkus, M.** (2011) 'cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms', *Molecular cell*, vol. 43, no. 3, pp. 449–463.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S. and Vandenabeele, P.** (2007) 'RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die', *Cell death and differentiation*, vol. 14, no. 3, pp. 400–410.
- Flygare, J. A., Beresini, M., Budha, N., Chan, H., Chan, I. T., Cheeti, S., Cohen, F., Deshayes, K., Doerner, K., Eckhardt, S. G., Elliott, L. O., Feng, B., Franklin, M. C., Reisner, S. F., Gazzard, L., Halladay, J., Hymowitz, S. G., La, H., LoRusso, P., Maurer, B., Murray, L., Plise, E., Quan, C., Stephan, J.-P., Young, S. G., Tom, J., Tsui, V., Um, J., Varfolomeev, E., Vucic, D., Wagner, A. J., Wallweber, H. J. A., Wang, L., Ware, J., Wen, Z., Wong, H., Wong, J. M., Wong, M., Wong, S., Yu, R., Zobel, K. and Fairbrother, W. J.** (2012) 'Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152)', *Journal of medicinal chemistry*, vol. 55, no. 9, pp. 4101–4113.
- Fridman, J. S. and Lowe, S. W.** (2003) 'Control of apoptosis by p53', *Oncogene*, vol. 22, no. 56, pp. 9030–9040.
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Pincus, M. R. and Ronai, Z.** (1998) 'MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 18, pp. 10541–10546.
- Fulda, S.** (2015) 'Smac mimetics as IAP antagonists', *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 39, pp. 132–138.
- Fulda, S. and Vucic, D.** (2012) 'Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer', *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 11, no. 2, pp. 109–124.
- Gaither, A., Porter, D., Yao, Y., Borawski, J., Yang, G., Donovan, J., Sage, D., Slisz, J., Tran, M., Straub, C., Ramsey, T., Iourgenko, V., Huang, A., Chen, Y., Schlegel, R., Labow, M., Fawell, S., Sellers, W. R. and Zawel, L.** (2007) 'A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling', *Cancer research*, vol. 67, no. 24, pp. 11493–11498.

- Gerharz, C. D., Ramp, U., Déjosez, M., Mahotka, C., Czarnotta, B., Bretschneider, U., Lorenz, I., Müller, M., Krammer, P. H. and Gabbert, H. E. (1999) 'Resistance to CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas: an important factor for evasion from negative growth control', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 79, no. 12, pp. 1521–1534.
- Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W. W.-L., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J. and Leverkus, M. (2009) 'Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment', *The Journal of cell biology*, vol. 187, no. 7, pp. 1037–1054.
- Godefroy, N., Lemaire, C., Renaud, F., Rincheval, V., Perez, S., Parvu-Ferecatu, I., Mignotte, B. and Vayssiere, J.-L. (2004) 'p53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis', *Cell death and differentiation*, vol. 11, no. 7, pp. 785–787.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. and Steller, H. (2000) 'Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function', *The EMBO journal*, vol. 19, no. 4, pp. 589–597.
- Gu, L., Zhu, N., Zhang, H., Durden, D. L., Feng, Y. and Zhou, M. (2009) 'Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation', *Cancer cell*, vol. 15, no. 5, pp. 363–375.
- Gyrd-Hansen, M. and Meier, P. (2010) 'IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer', *Nature reviews. Cancer*, vol. 10, no. 8, pp. 561–574.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, Paula C A, Zvelebil, M., Bujnicki, J. M., Lowe, S., Silke, J. and Meier, P. (2008) 'IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis', *Nature cell biology*, vol. 10, no. 11, pp. 1309–1317.
- Haas, Tobias L.; Emmerich, Christoph H.; Gerlach, Bjorn; Schmukle, Anna C.; Cordier, Stefanie M.; Rieser, Eva et al. (2009): Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. In: *Molecular cell* 36 (5), S. 831–844. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.10.013.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993) 'The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases', *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 805–816.
- Harvey, N. L. and Kumar, S. (1998) 'The role of caspases in apoptosis', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 62, pp. 107–128.
- He, K.-L. and Ting, A. T. (2002) 'A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells', *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 17, pp. 6034–6045.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L. and Wang, X. (2009) 'Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha', *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1100–1111.
- Heaney, M. L. and Golde, D. W. (1998) 'Soluble receptors in human disease', *Journal of leukocyte biology*, vol. 64, no. 2, pp. 135–146.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K. (2005) 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*, vol. 115, no. 1, pp. 1–20.
- Heinzelmann, S. and Bauer, G. (2010) 'Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells', *Biological chemistry*, vol. 391, no. 6, pp. 675–693.
- Hengartner, M. O. (2000) 'The biochemistry of apoptosis', *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–776.
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. and Murphy, M. (2002) 'Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53', *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 5, pp. 3247–3257.
- Holland, J. F., Frei, E. and Kufe, D. W. (2003) *Cancer medicine: Chapter 3 Cell Proliferation and Differentiation*, Hamilton, Ont., Decker.
- Horke, S., Witte, I., Wilgenbus, P., Altenhofer, S., Kruger, M., Li, H. and Forstermann, U. (2008) 'Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis', *The Biochemical journal*, vol. 416, no. 3, pp. 395–405.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V. (1995) 'The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation', *Cell*, vol. 81, no. 4, pp. 495–504.
- Hu, R., Li, J., Liu, Z., Miao, M. and Yao, K. (2015) 'GDC-0152 induces apoptosis through down-regulation of IAPs in human leukemia cells and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway', *Tumor Biology*, vol. 36, no. 2, pp. 577–584.
- Hughes, A. L. (2002) 'Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts', *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, vol. 2, no. 1, pp. 3–10.
- Hunt, J. D., van der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P. and Brennan, P. (2005) 'Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies', *International journal of cancer*, vol. 114, no. 1, pp. 101–108.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C. and Korneluk, R. G. (2007) 'The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets', *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, vol. 12, no. 9, pp. 1543–1568.
- Hussain, A. R., Bu, R., Ahmed, M., Jehan, Z., Beg, S., Al-Sobhi, S., Al-Dayel, F., Siraj, A. K., Uddin, S. and Al-Kuraya, K. S. (2015) 'Role of X-Linked Inhibitor of Apoptosis as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Papillary Thyroid Carcinoma', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 100, no. 7, p. E974-85.
- Hussain, S. P. and Harris, C. C. (1998) 'Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes', *Cancer research*, vol. 58, no. 18, pp. 4023–4037.

- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G. (1997) 'CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, pp. 10717–10722.
- Inoue, H. and Tani, K. (2014) 'Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments', *Cell death and differentiation*, vol. 21, no. 1, pp. 39–49.
- Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. and Tschoop, J. (1997) 'Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP', *Nature*, vol. 388, no. 6638, pp. 190–195.
- Jang, T.-H. and Park, H. H. (2013) 'PIDD mediates and stabilizes the interaction between RAIDD and Caspase-2 for the PIDDosome assembly', *BMB Reports*, vol. 46, no. 9, pp. 471–476.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. (2002) 'Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy', *Cell*, vol. 108, no. 2, pp. 153–164.
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C. S., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A. and Kaufmann, T. (2009) 'XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis', *Nature*, vol. 460, no. 7258, pp. 1035–1039.
- Jost, P. J. and Ruland, J. (2007) 'Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications', *Blood*, vol. 109, no. 7, pp. 2700–2707.
- Kaczmarek, A., Vandenebeele, P. and Krysko, D. V. (2013) 'Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance', *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 209–223.
- Kaiser, W. J., Upton, J. W. and Mocarski, E. S. (2013) 'Viral modulation of programmed necrosis', *Current opinion in virology*, vol. 3, no. 3, pp. 296–306.
- Keeney, S., Chang, G. J. and Linn, S. (1993) 'Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E', *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 28, pp. 21293–21300.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *British journal of cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257.
- Khanna, K. K. and Jackson, S. P. (2001) 'DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection', *Nature genetics*, vol. 27, no. 3, pp. 247–254.
- Khoo, K. H., Verma, C. S. and Lane, D. P. (2014) 'Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy', *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 13, no. 3, pp. 217–236.
- Kim, J.-Y., Choi, J.-Y., Lee, H.-J., Byun, C. J., Park, J.-H., Park, J. H., Cho, H.-S., Cho, S.-J., Jo, S. A. and Jo, I. (2015) 'The Green Tea Component (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Sensitizes Primary Endothelial Cells to Arsenite-Induced Apoptosis by Decreasing c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Catalase Activity', *PLoS one*, vol. 10, no. 9, pp. e0138590.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P. H. and Peter, M. E. (1995) 'Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor', *The EMBO journal*, vol. 14, no. 22, pp. 5579–5588.
- Ko, L. J. and Prives, C. (1996) 'p53: puzzle and paradigm', *Genes & development*, vol. 10, no. 9, pp. 1054–1072.
- Krepler, C., Chunduru, S. K., Halloran, M. B., He, X., Xiao, M., Vultur, A., Villanueva, J., Mitsuuchi, Y., Neiman, E. M., Benetatos, C., Nathanson, K. L., Amaravadi, R. K., Pehamberger, H., McKinlay, M. and Herlyn, M. (2013) 'The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 19, no. 7, pp. 1784–1794.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H. (2001) 'NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling', *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 12, pp. 3964–3973.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenebeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., el-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschoop, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovskiy, B. and Melino, G. (2009) 'Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell death and differentiation*, vol. 16, no. 1, pp. 3–11.
- Kroemer, G. and Martin, S. J. (2005) 'Caspase-independent cell death', *Nature medicine*, vol. 11, no. 7, pp. 725–730.
- Kunsch, C. and Rosen, C. A. (1993) 'NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter', *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 10, pp. 6137–6146.
- Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. (1996): Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. In: Science 274 (5289), S. 948–953. DOI: 10.1126/science.274.5289.948.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S. and Korneluk, R. G. (2008) 'IAP-targeted therapies for cancer', *Oncogene*, vol. 27, no. 48, pp. 6252–6275.
- Lane, D. P. (1992) 'Cancer. p53, guardian of the genome', *Nature*, vol. 358, no. 6381, pp. 15–16.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L. and et, a. (1993) 'Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 260, no. 5112, pp. 1317–1320.
- Lavrik, I. N., Golks, A. and Kramer, P. H. (2005) 'Caspases: pharmacological manipulation of cell death', *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 10, pp. 2665–2672.
- Lawrence, C. P. and Chow, S. C. (2005) 'FADD deficiency sensitises Jurkat T cells to TNF-alpha-dependent necrosis during activation-induced cell death', *FEBS letters*, vol. 579, no. 28, pp. 6465–6472.

- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C.** (1994) 'Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE', *Nature*, vol. 371, no. 6495, pp. 346–347.
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P. and Ma, A.** (2000) 'Failure to regulate TNF-induced NF- κ B and cell death responses in A20-deficient mice', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 289, no. 5488, pp. 2350–2354.
- Lee, E.-W. and Song, J.** (2016) 'USP11: A key regulator of cIAP2 stability and sensitivity to SMAC mimetics', *Molecular & cellular oncology*, vol. 3, no. 3, pp. e1029829.
- Levine, A. J.** (1997) 'p53, the cellular gatekeeper for growth and division', *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 323–331.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F. K.-M. and Wu, H.** (2012) 'The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis', *Cell*, vol. 150, no. 2, pp. 339–350.
- Li, M., Song, T., Yin, Z.-f. and Na, Y.-q.** (2007) 'XIAP as a prognostic marker of early recurrence of nonmuscular invasive bladder cancer', *Chinese medical journal*, vol. 120, no. 6, pp. 469–473.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X.** (1997) 'Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade', *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 479–489.
- Li, W., Li, B., Giacalone, N. J., Torossian, A., Sun, Y., Niu, K., Lin-Tsai, O. and Lu, B.** (2011) 'BV6, an IAP antagonist, activates apoptosis and enhances radiosensitization of non-small cell lung carcinoma in vitro', *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 1801–1809.
- Liao, D., Sun, L., Liu, W., He, S., Wang, X. and Lei, X.** (2014) 'Necrosulfonamide inhibits necroptosis by selectively targeting the mixed lineage kinase domain-like protein', *MedChemComm*, vol. 5, no. 3, p. 333.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y. and Liu, Z. G.** (1999) 'Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis', *Genes & development*, vol. 13, no. 19, pp. 2514–2526.
- Lin, Y., Ma, W. and Benchimol, S.** (2000) 'Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis', *Nature genetics*, vol. 26, no. 1, pp. 122–127.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408.
- Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T., Marconi, L., Merseburger, A. S., Mulders, P., Powles, T., Staehler, M., Volpe, A. and Bex, A.** (2015) 'EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update', *European urology*, vol. 67, no. 5, pp. 913–924.
- Lu, J., Bai, L., Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., McEachern, D., Qiu, S., Miller, R. S., Yi, H., Shangary, S., Sun, Y., Meagher, J. L., Stuckey, J. A. and Wang, S.** (2008) 'SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP', *Cancer research*, vol. 68, no. 22, pp. 9384–9393.
- Lu, M., Lin, S.-C., Huang, Y., Kang, Y. J., Rich, R., Lo, Y.-C., Myszka, D., Han, J. and Wu, H.** (2007) 'XIAP induces NF- κ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization', *Molecular cell*, vol. 26, no. 5, pp. 689–702.
- Lutter, M., Perkins, G. A. and Wang, X.** (2001) 'The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites', *BMC cell biology*, vol. 2, p. 22.
- Mandal, P., Berger, S. B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J. D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., Ouellette, M., King, B. W., Wisnoski, D., Lakdawala, A. S., DeMartino, M. P., Casillas, L. N., Haile, P. A., Sehon, C. A., Marquis, R. W., Upton, J., Daley-Bauer, L. P., Roback, L., Ramia, N., Dovey, C. M., Carette, J. E., Chan, F. K.-M., Bertin, J., Gough, P. J., Mocarski, E. S. and Kaiser, W. J.** (2014) 'RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity', *Molecular cell*, vol. 56, no. 4, pp. 481–495.
- Mannhold, R., Fulda, S. and Carosati, E.** (2010) 'IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy', *Drug discovery today*, vol. 15, 5-6, pp. 210–219.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R.** (1995) 'Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl', *The Journal of experimental medicine*, vol. 182, no. 5, pp. 1545–1556.
- Matsui, Hirotoishi; Grubb, Barbara R.; Tarran, Robert; Randell, Scott H.; Gatzky, John T.; Davis, C. William; Boucher, Richard C.** (1998): Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease. In: *Cell* 95 (7), S. 1005–1015. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81724-9.
- Matsuyoshi, S., Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E. and Konishi, N.** (2006) 'FADD phosphorylation is critical for cell cycle regulation in breast cancer cells', *British journal of cancer*, vol. 94, no. 4, pp. 532–539.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J.** (2001) 'NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP', *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 16, pp. 5299–5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C. and Grutter, M. G.** (2002) 'The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex', *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 47, pp. 45162–45171.
- Micheau, O. and Tschopp, J.** (2003) 'Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes', *Cell*, vol. 114, no. 2, pp. 181–190.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B. and Liu, S.** (2002) 'Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway', *Oncogene*, vol. 21, no. 17, pp. 2613–2622.
- Mizutani, Y., Nakanishi, H., Li, Y. N., Matsubara, H., Yamamoto, K., Sato, N., Shiraishi, T., Nakamura, T., Mikami, K., Okihara, K., Takaha, N., Ukimura, O., Kawachi, A., Nonomura, N., Bonavida, B. and Miki, T.** (2007) 'Overexpression of

- XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis', *International journal of oncology*, vol. 30, no. 4, pp. 919–925.
- Moussata, D., Amara, S., Siddeek, B., Decaussin, M., Hehlgans, S., Paul-Bellon, R., Mornex, F., Gerard, J.-P., Romestaing, P., Rodel, F., Flourie, B., Benahmed, M. and Mauduit, C.** (2012) 'XIAP as a radioresistance factor and prognostic marker for radiotherapy in human rectal adenocarcinoma', *The American journal of pathology*, vol. 181, no. 4, pp. 1271–1278.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P. H.** (1998) 'p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs', *The Journal of experimental medicine*, vol. 188, no. 11, pp. 2033–2045.
- Muller-Sienerth, N., Dietz, L., Holtz, P., Kapp, M., Grigoleit, G. U., Schmuck, C., Wajant, H. and Siegmund, D.** (2011) 'SMAC mimetic BV6 induces cell death in monocytes and maturation of monocyte-derived dendritic cells', *PLoS one*, vol. 6, no. 6, pp. e21556.
- Nagata, S.** (1997) 'Apoptosis by death factor', *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 355–365.
- Nakamura, T., Wang, L., Wong, C. C. L., Scott, F. L., Eckelman, B. P., Han, X., Tzitzilonis, C., Meng, F., Gu, Z., Holland, E. A., Clemente, A. T., Okamoto, S.-i., Salvesen, G. S., Riek, R., Yates, J. R. 3. and Lipton, S. A.** (2010) 'Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death', *Molecular cell*, vol. 39, no. 2, pp. 184–195.
- Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M. and Vousden, K. H.** (2000) 'A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73', *Oncogene*, vol. 19, no. 37, pp. 4283–4289.
- Ndubaku, C., Varfolomeev, E., Wang, L., Zobel, K., Lau, K., Elliott, L. O., Maurer, B., Fedorova, A. V., Dynek, J. N., Koehler, M., Hymowitz, S. G., Tsui, V., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Flygare, J. A. and Vucic, D.** (2009) 'Antagonism of c-IAP and XIAP proteins is required for efficient induction of cell death by small-molecule IAP antagonists', *ACS chemical biology*, vol. 4, no. 7, pp. 557–566.
- Ng, C. J., Wadleigh, D. J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V. R., Navab, M., Fogelman, A. M. and Reddy, S. T.** (2001) 'Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein', *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 48, pp. 44444–44449.
- Nikolovska-Coleska, Z., Xu, L., Hu, Z., Tomita, Y., Li, P., Roller, P. P., Wang, R., Fang, X., Guo, R., Zhang, M., Lippman, M. E., Yang, D. and Wang, S.** (2004) 'Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database', *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, no. 10, pp. 2430–2440.
- Nurse, P.** (1990): Universal control mechanism regulating onset of M-phase. In: *Nature* 344 (6266), S. 503–508. DOI: 10.1038/344503a0.
- Obexer, P. and Ausserlechner, M. J.** (2014) 'X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy', *Frontiers in oncology*, vol. 4, p. 197.
- Ofengeim, D. and Yuan, J.** (2013) 'Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death', *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 14, no. 11, pp. 727–736.
- Oost, T. K., Sun, C., Armstrong, R. C., Al-Assaad, A.-S., Betz, S. F., Deckwerth, T. L., Ding, H., Elmore, S. W., Meadows, R. P., Olejniczak, E. T., Oleksijew, A., Oltersdorf, T., Rosenberg, S. H., Shoemaker, A. R., Tomaselli, K. J., Zou, H. and Fesik, S. W.** (2004) 'Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer', *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, no. 18, pp. 4417–4426.
- Opel, D., Schnaiter, A., Dodier, D., Jovanovic, M., Gerhardinger, A., Idler, I., Mertens, D., Bullinger, L., Stilgenbauer, S. and Fulda, S.** (2015) 'Targeting inhibitor of apoptosis proteins by Smac mimetic elicits cell death in poor prognostic subgroups of chronic lymphocytic leukemia', *International journal of cancer*, vol. 137, no. 12, pp. 2959–2970.
- Opiari, A. W., JR, Hu, H. M., Yabkowitz, R. and Dixit, V. M.** (1992) 'The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity', *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 18, pp. 12424–12427.
- Owens, T. W., Gilmore, A. P., Streuli, C. H. and Foster, F. M.** (2013) 'Inhibitor of Apoptosis Proteins: Promising Targets for Cancer Therapy', *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, Suppl 14.
- Pasparakis, M. and Vandenabeele, P.** (2015) 'Necroptosis and its role in inflammation', *Nature*, vol. 517, no. 7534, pp. 311–320.
- Pavlovich, C. P. and Schmidt, L. S.** (2004) 'Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma', *Nature reviews. Cancer*, vol. 4, no. 5, pp. 381–393.
- Petersen, S. L., Peyton, M., Minna, J. D. and Wang, X.** (2010) 'Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 26, pp. 11936–11941.
- Petersen, S. L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P. and Wang, X.** (2007) 'Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis', *Cancer cell*, vol. 12, no. 5, pp. 445–456.
- Petrucci, E., Pasquini, L., Bernabei, M., Saulle, E., Biffoni, M., Accarpio, F., Sibio, S., Di Giorgio, A., Di Donato, V., Casorelli, A., Benedetti-Panici, P. and Testa, U.** (2012) 'A small molecule SMAC mimic LBW242 potentiates TRAIL- and anticancer drug-mediated cell death of ovarian cancer cells', *PLoS one*, vol. 7, no. 4, pp. e35073.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. and Gabai, V. L.** (2003) 'Necrosis: a specific form of programmed cell death?', *Experimental cell research*, vol. 283, no. 1, pp. 1–16.
- Ramp, U., Caliskan, E., Mahotka, C., Krieg, A., Heikaus, S., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D.** (2003) 'Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage', *British journal of cancer*, vol. 88, no. 11, pp. 1800–1807.

- Ramp, U., Dejosez, M., Mahotka, C., Czarnotta, B., Kalinski, T., Wenzel, M., Lorenz, I., Müller, M., Krammer, P., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D. (2000) 'Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma', *British journal of cancer*, vol. 82, no. 11, pp. 1851–1859.
- Ramp, U., Mahotka, C., Kalinski, T., Ebel, E., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D. (2001) 'Topotecan (Hycamtin) responsiveness in human renal carcinoma cell lines of the clear cell and papillary types', *Anticancer research*, vol. 21, no. 5, pp. 3509–3517.
- Ramp, U., Krieg, T., Caliskan, E., Mahotka, C., Ebert, T., Willers, R., Gabbert, H. E. and Gerharz, C. D. (2004) 'XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas', *Human pathology*, vol. 35, no. 8, pp. 1022–1028.
- Reiter, M., Eckhardt, I., Haferkamp, A. and Fulda, S. (2016) 'Smac mimetic sensitizes renal cell carcinoma cells to interferon-alpha-induced apoptosis', *Cancer letters*, vol. 375, no. 1, pp. 1–8.
- Remijns, Q., Goossens, V., Grootjans, S., van den Haute, C., Vanlangenakker, N., Dondelinger, Y., Roelandt, R., Bruggeman, I., Goncalves, A., Bertrand, M. J. M., Baekelandt, V., Takahashi, N., Berghe, T. V. and Vandenabeele, P. (2014) 'Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis', *Cell death & disease*, vol. 5, pp. e1004.
- Ribe, E. M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N. and Troy, C. M. (2008) 'Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players', *The Biochemical journal*, vol. 415, no. 2, pp. 165–182.
- Riccardi, C. and Nicoletti, I. (2006) 'Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry', *Nature protocols*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A. (2008) 'Transcriptional control of human p53-regulated genes', *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 9, no. 5, pp. 402–412.
- Robert Koch-Institut (2015) *Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10. Ausg. 2015.*
- Roesler, S., Eckhardt, I., Wolf, S. and Fulda, S. (2016) 'Cooperative TRAIL production mediates IFNalpha/Smac mimetic-induced cell death in TNFalpha-resistant solid cancer cells', *Oncotarget*, vol. 7, no. 4, pp. 3709–3725.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C. and Vousden, K. H. (2001) 'Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein', *Current opinion in cell biology*, vol. 13, no. 3, pp. 332–337.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P. (2004) 'Toxic proteins released from mitochondria in cell death', *Oncogene*, vol. 23, no. 16, pp. 2861–2874.
- Salvesen, G. S. (2002) 'Caspases and apoptosis', *Essays in biochemistry*, vol. 38, pp. 9–19.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996) 'Common principles of protein translocation across membranes', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 271, no. 5255, pp. 1519–1526.
- Schilling, R., Geserick, P. and Leverkus, M. (2014) 'Characterization of the ripoptosome and its components: implications for anti-inflammatory and cancer therapy', *Methods in enzymology*, vol. 545, pp. 83–102.
- Schneider, P., Baier, B., Holotiuk, O., Meinhardt, M., Stade, J., Meye, A., Rolle, A. and Wirth, M. P. (2007) 'MP-16.18: Expression of the apoptosis inhibitors survivin and XIAP in pulmonary metastases of renal cell carcinoma (RCC)', *Urology*, vol. 70, no. 3, pp. 127–128.
- Schutysse, E., Struyf, S. and van Damme, J. (2003) 'The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 14, no. 5, pp. 409–426.
- Schwartz, P. S. and Hockenbery, D. M. (2006) 'Bcl-2-related survival proteins', *Cell death and differentiation*, vol. 13, no. 8, pp. 1250–1255.
- Scott, F. L., Denault, J.-B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M. and Salvesen, G. S. (2005) 'XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs', *The EMBO journal*, vol. 24, no. 3, pp. 645–655.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A. and Jongeneel, C. V. (1990) 'Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages', *The Journal of experimental medicine*, vol. 171, no. 1, pp. 35–47.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. and Kumar, S. (2015) 'Old, new and emerging functions of caspases', *Cell death and differentiation*, vol. 22, no. 4, pp. 526–539.
- Shi, Y. (2002) 'A conserved tetrapeptide motif: Potentiating apoptosis through IAP-binding', *Cell Death and Differentiation*, vol. 9, no. 2, pp. 93–95.
- Shin, H., Okada, K., Wilkinson, J. C., Solomon, K. M., Duckett, C. S., Reed, J. C. and Salvesen, G. S. (2003) 'Identification of ubiquitination sites on the X-linked inhibitor of apoptosis protein', *The Biochemical journal*, vol. 373, Pt 3, pp. 965–971.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R. and Shi, Y. (2003) 'Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9', *Molecular cell*, vol. 11, no. 2, pp. 519–527.
- Shirley, S. and Micheau, O. (2013) 'Targeting c-FLIP in cancer', *Cancer letters*, vol. 332, no. 2, pp. 141–150.
- Shuch, B., Amin, A., Armstrong, A. J., Eble, J. N., Ficarra, V., Lopez-Beltran, A., Martignoni, G., Rini, B. I. and Kutikov, A. (2015) 'Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity', *European urology*, vol. 67, no. 1, pp. 85–97.
- Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R. C., van der Hoven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G. (1996) 'MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2', *The EMBO journal*, vol. 15, no. 19, pp. 5349–5357.
- Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994) 'The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death', *Cell*, vol. 76, no. 6, pp. 959–962.

- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R. U.** (2006) 'p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation', *Cancer research*, vol. 66, no. 23, pp. 11254–11262.
- Solary, E., Dubrez, L. and Eymin, B.** (1996) 'The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases', *The European respiratory journal*, vol. 9, no. 6, pp. 1293–1305.
- Song, Z., Yao, X. and Wu, M.** (2003) 'Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis', *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 25, pp. 23130–23140.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S.** (1998) 'Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization', *Molecular cell*, vol. 1, no. 7, pp. 949–957.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. and Alnemri, E. S.** (2001) 'A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis', *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 112–116.
- Stahler, G. and Pomer, S.** (1997) *Nierentumoren: Grundlagen, Diagnostik, Therapie* [Online], Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg. Available at <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60332-7>.
- Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E. and Seed, B.** (1995) 'RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death', *Cell*, vol. 81, no. 4, pp. 513–523.
- Statistisches Bundesamt** (2015) *Gesundheit: Todesursachen in Deutschland* [Online], Wiesbaden (Reihe 4). Available at https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400147004.pdf?__blob=publicationFile (Accessed 5 October 2016).
- Stehlik, C., Martin, R. de, Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R. and Lipp, J.** (1998) 'Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis', *The Journal of experimental medicine*, vol. 188, no. 1, pp. 211–216.
- Stevens, J., Carosati, E., Randazzo, G., Mannhold, R., Horsch, L. D., Schneider, A., Heikhaus, S., Cruciani, G., Gabbert, H. E. and Mahotka, C.** (2014) 'Novel apoptosis inducers overcome IAP-mediated resistance of the renal cell carcinoma cell line ClearCa-2', *Oncology Research and Treatment (Volume 37, Issue: Suppl. 1)*, p. 23.
- Stevens, J., Carosati, E., Randazzo, G. M., Mannhold, R. and Mahotka, C.** (2016) 'LBPS03, a novel apoptosis inducer, overcomes a XIAP-mediated resistance by reactivation of caspases in the multidrug-resistant RCC cell line ClearCa-2', *Oncology Research and Treatment (Volume 39, Issue: Suppl. 1)*, no. 39, p. 68 [Online]. Available at <https://www.karger.com/Article/Pdf/444354>.
- Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Bagchi, S. and Raychaudhuri, P.** (2009) 'DDB2 decides cell fate following DNA damage', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 26, pp. 10690–10695.
- Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.-Y., Qian, D., Lu, J., Qiu, S., Bai, L., Peng, Y., Cai, Q. and Wang, S.** (2008) 'Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic Smac mimetics', *Accounts of chemical research*, vol. 41, no. 10, pp. 1264–1277.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X. and Wang, X.** (2012) 'Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase', *Cell*, vol. 148, 1-2, pp. 213–227.
- Talks, K. L.; Turley, H.; Gatter, K. C.; Maxwell, P. H.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. (2000):** The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. In: *The American journal of pathology* 157 (2), S. 411–421.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T. and Reed, J. C.** (1998) 'IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs', *Cancer research*, vol. 58, no. 23, pp. 5315–5320.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y.** (2000) 'A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage', *Nature*, vol. 404, no. 6773, pp. 42–49.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K. and Meier, P.** (2011) 'The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs', *Molecular cell*, vol. 43, no. 3, pp. 432–448.
- Theis, R. P., Dolwick, G. S. M., Burr, D., Siddiqui, T. and Asal, N. R.** (2008) 'Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study', *BMC cancer*, vol. 8, p. 387.
- Thoenes, W., St. Störkel and Rumpelt, H. J.** (1986) 'Histopathology and Classification of Renal Cell Tumors (Adenomas, Oncocytomas and Carcinomas)', *Pathology - Research and Practice*, vol. 181, no. 2, pp. 125–143.
- Thompson, C. B.** (1995) 'Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 267, no. 5203, pp. 1456–1462.
- Thompson, D. A.; Belinsky, G.; Chang, T. H.; Jones, D. L.; Schlegel, R.; Munger, K.** (1997): The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. In: *Oncogene* 15 (25), S. 3025–3035. DOI: 10.1038/sj.onc.1201495.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W.** (1997) 'A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis', *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 29, pp. 17907–17911.
- Tian, H., Wittmack, E. K. and Jorgensen, T. J.** (2000) 'p21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis', *Cancer research*, vol. 60, no. 3, pp. 679–684.
- Tiemann, A.** (2014) *Das Nierenzellkarzinom* [Online]. Available at <http://www.urologenportal.de/nierenzellkarzinom0.html>.

- Tinel, A. and Tschopp, J.** (2004) 'The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 304, no. 5672, pp. 843–846.
- Toledo, F. and Wahl, G. M.** (2007) 'MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy', *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, 7-8, pp. 1476–1482.
- van den Höfel, N., Carosati, E., Randazzo, G., Abo Houf, A., Mannhold, R., Cruciani, G., Funke, S., Heikaus, S., Gabbert, H. E. and Mahotka, C.** (2014) 'Novel apoptosis inducers in the acute lymphatic leukemia cell line JM.', *Oncology Research and Treatment (Volume 37, Issue: Suppl. 1)*, p. 23.
- van Gorp, Maria; Festjens, Nele; van Loo, Geert; Saelens, Xavier; Vandenabeele, Peter** (2003): Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. In: Biochemical and biophysical research communications 304 (3), S. 487–497.
- Vanden, B. T., Linkermann, A., Jouan-Lanhout, S., Walczak, H. and Vandenabeele, P.** (2014) 'Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways', *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 15, no. 2, pp. 135–147.
- Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. and Vandenabeele, P.** (2015) 'Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling', *Molecular & cellular oncology*, vol. 2, no. 4, pp. e975093.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., van Herreweghe, F. and Vanden Berghe, T.** (2010) 'The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis', *Science signaling*, vol. 3, no. 115, pp. re4.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J. N., Elliott, L. O., Wallweber, H. J. A., Flygare, J. A., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., Dixit, V. M. and Vucic, D.** (2007) 'IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis', *Cell*, vol. 131, no. 4, pp. 669–681.
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Dynek, J. N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W. J. and Vucic, D.** (2008) 'c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation', *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 36, pp. 24295–24299.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W. and Vandenabeele, P.** (1998) 'Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor', *The Journal of experimental medicine*, vol. 187, no. 9, pp. 1477–1485.
- Verhagen, A. M., Coulson, E. J. and Vaux, D. L.** (2001) 'Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs', *Genome biology*, vol. 2, no. 7, pp. REVIEWS3009.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L.** (2000) 'Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins', *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 43–53.
- Vince, J. E., Wong, W. W.-L., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Condon, S. M., McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B. A., Koentgen, F., Vaux, D. L. and Silke, J.** (2007) 'IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis', *Cell*, vol. 131, no. 4, pp. 682–693.
- Vucic, D., Kaiser, W. J. and Miller, L. K.** (1998) 'Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM', *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 6, pp. 3300–3309.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G. and Rauch, C. T.** (1997) 'TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL', *The EMBO journal*, vol. 16, no. 17, pp. 5386–5397.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S., JR** (1998) 'NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5383, pp. 1680–1683.
- Wang, L., Du, F. and Wang, X.** (2008) 'TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways', *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 693–703.
- Weisberg, E.; Kung, A. L.; Wright, R. D.; Moreno, D.; Catley, L.; Ray, A. et al.** (2007): Potentiation of antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: effects on mutant FLT3-expressing cells. In: Molecular cancer therapeutics 6 (7), S. 1951–1961. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0810.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V. and Dixit, V. M.** (2004) 'De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling', *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 694–699.
- Wilson, N. S., Dixit, V. and Ashkenazi, A.** (2009) 'Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks', *Nature immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 348–355.
- Witte, I., Foerstermann, U., Devarajan, A., Reddy, S. T. and Horke, S.** (2012) 'Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer', *Journal of lipids*, vol. 2012, p. 342806.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X. and Shi, Y.** (2000) 'Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO', *Nature*, vol. 408, no. 6815, pp. 1008–1012.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R. 3., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W. S.** (1997) 'KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene', *Nature genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 141–143.
- Wu, Y., Mehew, J. W., Heckman, C. A., Arcinas, M. and Boxer, L. M.** (2001) 'Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells', *Oncogene*, vol. 20, no. 2, pp. 240–251.
- Xanthoulea, S., Pasparakis, M., Kousteni, S., Brakebusch, C., Wallach, D., Bauer, J., Lassmann, H. and Kollias, G.** (2004) 'Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases', *The Journal of experimental medicine*, vol. 200, no. 3, pp. 367–376.

- Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., Yuan, J. and Shi, Y.** (2013) 'Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins', *Structure (London, England : 1993)*, vol. 21, no. 3, pp. 493–499.
- Xu, K., Liu, P. and Wei, W.** (2014) 'mTOR signaling in tumorigenesis', *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1846, no. 2, pp. 638–654.
- Xu, Y.; Baltimore, D.** (1996): Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. In: *Genes & development* 10 (19), S. 2401–2410. DOI: 10.1101/gad.10.19.2401.
- Yan, Y., Mahotka, C., Heikau, S., Shibata, T., Wethkamp, N., Liebmann, J., Suschek, C. V., Guo, Y., Gabbert, H. E., Gerharz, C. D. and Ramp, U.** (2004) 'Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas', *British journal of cancer*, vol. 91, no. 7, pp. 1349–1357.
- Yang, Y.** (2000) 'Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli', *Science*, vol. 288, no. 5467, pp. 874–877.
- Yee, K. S. and Vousden, K. H.** (2005) 'Complicating the complexity of p53', *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 8, pp. 1317–1322.
- Yu, J. W., Jeffrey, P. D. and Shi, Y.** (2009) 'Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 20, pp. 8169–8174.

6. Danksagung

Mein Dank gilt dem ehemaligen Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert, der mir die Möglichkeit geboten hat an seinem Institut meiner Doktorarbeit anzufertigen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei meiner Institutsdirektorin Frau Prof. I. Esposito, die nach Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert, die Institutsleitung übernommen hat und mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. C. Mahotka, der es mir ermöglicht hat nach meiner Masterarbeit mein Forschungsthema fortzusetzen, wissenschaftlich bedeutende Erkenntnisse zu gewinnen und mir stets neue Denkanstöße gab. Neben der fachlichen Erfahrung schätzte ich die Möglichkeit mich persönlich weiterzuentwickeln.

Bei Frau Prof. Dr. H. Heise, die mich als Mentorin im Rahmen meiner Promotion begleitet hat, möchte ich recht herzlich bedanken.

Mein Dank gibt auch Frau PD Dr. I. Regel, die mir in dem letzten Jahr meiner Promotion viele neue Ideen zur Umsetzung meiner Pläne gegeben hat.

Ich bedanke mich bei meinen Laborkollegen, die über die letzten vier Jahre nicht nur Kollegen für mich waren, sondern auch Freunde. Danke Natascha und Nina, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und mir stets mit fachlichen wie auch persönlichen Ratschlägen zur Seite standet.

Ein ganz großer Dank gilt meinem Freund, der immer zu mir steht, mich in jeder Hinsicht unterstützt und immer für mich da ist. Danke, dass du immer an mich glaubst. Du bist ein ganz besonderer Mensch für mich.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meinen Eltern, die mir stets zur Seite stehen, an mich glauben und schon immer wussten, was meine Stärken sind. Ohne euch wäre ich heute nicht hier wo ich stehe. Das bedeutet mir so viel. Danke für alles!

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

Julia Stevens