

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

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

Die Wirkung von einem Smac-Mimetikum und
abgeleiteten Strukturen auf die Zelllinie JM

Dissertation

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

vorgelegt von
Bettina Skoupi geb. Stanitzki

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Das Staunen ist eine Sehnsucht nach Wissen

- *Thomas von Aquin* -

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

E. Carosati, N. van den Höfel, M. Reif, G. M. Randazzo, **B. Stanitzki**,
J. Stevens, H. E. Gabbert, G. Cruciani, R. Mannhold, C. Mahotka,
ChemMedChem, **2015**, *10*, 1700-1706. (Carosati et al., 2015)

Zusammenfassung

Menschliche Zellen existieren in einem fein regulierten Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod, um beispielsweise Wachstum und Abbau von Geweben gezielt zu steuern. Für die Entstehung von malignen Tumoren spielen fehlregulierte biochemische, molekular- sowie zellbiologische Prozesse, die eine Dysbalance dieser Homöostase bewirken, eine entscheidende Rolle. Die Beobachtung, dass sich maligne Zellen der Apoptose entziehen, ist oft verknüpft mit einer Fehlexpression von Zelltodregulatoren wie z.B. den *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAP). Da IAP die Apoptose als Antwort auf diverse Stimuli durch Interaktion mit Proteinen des Apoptosesignalwegs inhibieren, stellen sie vielversprechende Angriffspunkte für eine therapeutische Intervention dar. Dazu werden häufig niedermolekulare Substanzen genutzt, sogenannte *small molecules*, die in pharmazeutischen Screeningverfahren identifiziert werden. Bei synthetischen Smac-Mimetika, die von der Struktur des IAP-Antagonisten Smac abgeleitet sind, handelt es sich um ebensolche *small molecule drug candidates* (SMDC).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neun zuvor neu entwickelte Derivate eines Smac-Mimetikums bezüglich ihrer antiproliferativen Wirkung gegenüber der leukämischen Zelllinie JM (Jurkat) untersucht. Drei der neun getesteten Substanzen zeigten einen potenten und hochspezifischen antiproliferativen Effekt auf JM-Zellen mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich, der die Wirkung des in klinischen Studien befindlichen IAP-Antagonisten AT-406 übertrifft. Eine Hemmung der Proliferation von gesunden peripheren mononukleären Zellen war in Kontrolluntersuchungen nicht feststellbar. Für die drei wirksamen Kandidaten LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40 ergaben sich in weiteren Versuchen Hinweise auf die Art der Zelltodinduktion: Eine Erhöhung der Caspase-Aktivität sowie der per Durchflusszytometrie ermittelte Anteil apoptotischer Zellen legen einen apoptotischen Signalweg nahe. Bei den hier untersuchten Substanzen handelt es sich um Derivate des in Voruntersuchungen als wirksam identifizierten IAP-Antagonisten LBPS-01. Vergleiche der chemischen Substituentenmuster der wirksamen Smac-Mimetika mit dieser Grundsubstanz stellen eine Phenylgruppe als essentielles Element für die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Derivate heraus und geben weitere Hinweise auf relevante Strukturgruppen.

Basierend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich weiterführende Untersuchungen, die zur genaueren Klärung des Wirkmechanismus notwendig sind. Schon jetzt stellen die drei Substanzen vielversprechende Kandidaten für die gerichtete Krebstherapie als IAP-spezifische Wirkstoffe dar.

Summary

Human cells exist in a fine regulated balance between proliferation and cell death, for example to control the growth and degradation of tissue. Dysregulated biochemical, molecular and cellular processes that cause an imbalance of this homeostasis play a decisive role in the development of malignant tumors. The observation that malignant cells evade apoptosis is often associated with an altered expression level of cell death regulators such as the inhibitor of apoptosis proteins (IAP). Since IAP inhibit apoptosis in response to various stimuli through interaction with proteins of the apoptosis signaling pathway, they can be addressed as promising targets for therapeutic intervention. For this purpose, small molecules that may be identified in pharmaceutical screening procedures, are often used. Synthetic Smac mimetics derived from the structure of the IAP antagonist Smac are potential small molecule drug candidates (SMDC).

As part of this work, nine previously developed drug candidates of a Smac mimetic derivative were investigated with respect to their antiproliferative effect against the leukemic cell line JM (Jurkat). Three of the nine substances tested here showed a potent and highly specific antiproliferative effect on JM cells with IC_{50} levels in the micromolar range, exceeding the effect in clinical trials of the IAP antagonist AT-406. Inhibition of the proliferation of healthy peripheral mononuclear cells was not detectable in control studies. For the three effective candidates LBPS-38, LBPS-39 and LBPS-40 further experiments revealed indications of the type of cell death induction: An increase in caspase activity and the proportion of apoptotic cells determined by flow cytometry suggest an apoptotic signaling pathway. The substances examined here are derivatives of the IAP antagonist LBPS-01, which was identified as effective in preliminary studies. Comparisons of the chemical substituent patterns of the effective Smac mimetics with this basic substance highlight a phenyl-group as an essential element for the structure-activity-relationship of the derivatives and provide further indications of relevant structural groups.

In the scope of the herein describe results, it remains elusive to clarify the mode of action in a more precise manner. Hence, three effective substances resemble promising candidates for further developments therapy approaches utilizing IAP-specific agents.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma-2</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>
bzw.	beziehungsweise
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
Caspase	<i>cysteine-dependent aspartate directed protease</i>
c-IAP	<i>cellular IAP</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con A	Concanavalin A
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
E	Extinktion
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat, Isomer I
FSC	<i>Forward scatter</i> (vorwärts gestreutes Licht)
g	Erdbeschleunigung [m/s ²]
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethylsulfonsäure
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>

Ile	Isoleucin
l	Liter
LBPS	<i>Ligand-based-pan-selectiv</i>
Lys	Lysin
M	Mol
ml	Milliliter
nm	Nanometer
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PI	Propidiumiodid
Pro	Prolin
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RIP	<i>Receptor-interacting threonine/serine protein kinase 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
Smac	<i>Second mitochondrial-derived activator of caspases</i>
SMDC	<i>Small molecule drug candidates</i>
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
U/ml	Units pro Milliliter
XIAP	X-chromosomal verknüpftes IAP
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Summary.....	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Inhaltsverzeichnis.....	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Zellproliferation und Zellhomöostase	1
1.2 Tumorentstehung.....	2
1.2.1 Leukämie.....	3
1.3 Apoptose.....	4
1.3.1 Caspasen	6
1.3.2 Extrinsischer Signalweg	7
1.3.3 Intrinsischer Signalweg.....	10
1.3.4 Nekroptose	10
1.4 Inhibitor of apoptosis proteins (IAP)	10
1.4.1 Smac/DIABLO	12
1.4.2 Kommerzielle Smac-Mimetika	14
1.5 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien.....	16
2.1.2 Zellkulturmedien	16
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.5 Puffer und Lösungen	19

2.1.6	Neu entwickelte IAP-Antagonisten und der kommerzielle IAP-Antagonist AT-406.....	19
2.1.7	Laborgeräte	22
2.1.8	Software und Webtools	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zelllinie JM (Jurkat)	23
2.2.2	Kultivierung von JM Zellen	23
2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	24
2.2.4	Wachstumskinetik.....	24
2.2.5	Gewinnung mononukleärer Zellen aus humanem Blut	25
2.2.6	Kultivierung der T-Lymphozyten	26
2.2.7	Zellzahlbestimmung der T-Lymphozyten.....	27
2.2.8	Proliferationsassay und Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	27
2.2.9	Caspase-Aktivitätsmessung	27
2.2.10	Nicoletti-Assay, Apoptoserate	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Smac Mimetika: Proliferationsmodifikation von Tumorzellen	31
3.1.1	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40	33
3.2	Wirkung der Substanzen LBPS-38-40 auf native T-Lymphozyten	35
3.3	Caspase-Aktivität	36
3.4	Nicoletti-Assay, Apoptoserate	38
4	Diskussion	40
4.1	Drei wirksame Substanzen LBPS-38-40	40
4.2	Keine Wirkung auf native T-Lymphozyten.....	43
4.3	Caspase-Aktivierung	44
4.4	Apoptose-Induktion	45
4.5	Struktur-Wirkungsbeziehung.....	46

4.6	Ausblick.....	50
	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Zellproliferation und Zellhomöostase

Der Ausdruck Zellproliferation beschreibt das Zusammenspiel von Zellwachstum und Zellvermehrung durch Zellteilung (Schmidt et al., 2011).

Hinsichtlich ihrer Teilungsaktivität können sich Zellen dabei deutlich unterscheiden. Vereinfachend können drei Kategorien unterschieden werden: dauerhaft proliferierende Zellen wie z. B. erythropoetische Stammzellen des Knochenmarks oder lymphopoetische Zellen des Immunsystems; teilungs-inaktive Zellen wie z. B. die meisten Neuronen im Nervensystem, Skelettmuskelzellen oder Herzmuskelzellen; sowie ruhende Zellen, die nur bei Bedarf proliferieren, wie z. B. Fibroblasten der Haut oder Hepatozyten der Leber (Müller-Esterl, 2010).

In mehrzelligen adulten Organismen wird die Homöostase (griech. *homoi* gleich bleibend, konstant (Müller-Esterl, 2010)) jeder einzelnen Zellart durch ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod gewährleistet (Solary et al., 1996).

Zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts besitzen die meisten Gewebe spezielle Zellen, die durch Proliferation abgestorbene Zellen ihrer Umgebung ersetzen. Überdies gibt es in einigen Geweben Zellen, die sich kontinuierlich teilen, um Zellen mit einem hohen Umsatz zu ersetzen. Zelltod und Zellerneuerung sind daher sorgfältig balanciert, um Gewebe und Organe in Form und Funktion aufrechtzuerhalten. Dieser komplexe Prozess der Entwicklung involviert nicht nur Zellproliferation sondern auch den gezielten Zelltod (Cooper, 1997).

Obwohl Zellen auch als Ergebnis von unvorhergesehenen traumatischen Ereignissen, wie der Exposition gegenüber toxischen Substanzen, sterben können, erfolgt das häufigste Zellsterben aufgrund des normalen physiologischen Prozesses des programmierten Zelltods, der eine Schlüsselrolle sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in erwachsenen Geweben spielt (Cooper and Hausman, 2009).

Während der Entwicklung und auch für die Homöostase eines Organismus ist die Apoptose der primäre Mechanismus des programmierten Zelltods (Golstein, 1998).

1.2 Tumorentstehung

In Krebszellen ist die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod aus dem Gleichgewicht geraten (Wong, 2011). Im Gegensatz zu Erkrankungen, die mit einem vermehrten Zellsterben einhergehen, mangelt Krebszellen die Fähigkeit zum geregelten Zelltod (Solary et al., 1996). In gesunden Geweben würden im Falle einer DNA-Schädigung solche Zellen, die potenziell schädigende oder kanzerogene Mutationen aufweisen, durch Apoptose eliminiert inklusive solcher Zellen mit Mutationen, die möglicherweise zur Krebsentstehung führen (Savill and Fadok, 2000).

Krebszellen haben jedoch verschiedene Strategien zu unkontrolliertem Zellwachstum entwickelt. Die sechs Kennzeichen des Krebses lauten: Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern, Unabhängigkeit von proliferativen Wachstumssignalen, Umgehung der Apoptose, unbegrenztes replikatives Potential, anhaltende Angiogenese sowie Fähigkeit zur Gewebsinfiltration und Metastasierung. Jede dieser physiologischen Veränderungen repräsentiert ein erfolgreiches Durchbrechen der in Zellen und Geweben verankerten Abwehrmechanismen gegen fehlerhafte Zellproliferation (Hanahan and Weinberg, 2000).

Tumorgenese in humanen Zellen ist ein vielstufiger Prozess, dessen Stufen genetische Veränderungen darstellen, die die Transformation gesunder Zellen in hochmaligne Derivate befeuern (Renan, 1993). Auslösende Faktoren können neben kanzerogenen Noxen, Viren und Bakterien auch genetische Dispositionen sein, die schließlich zu Mutationen in der DNA führen (Alberts et al., 2011).

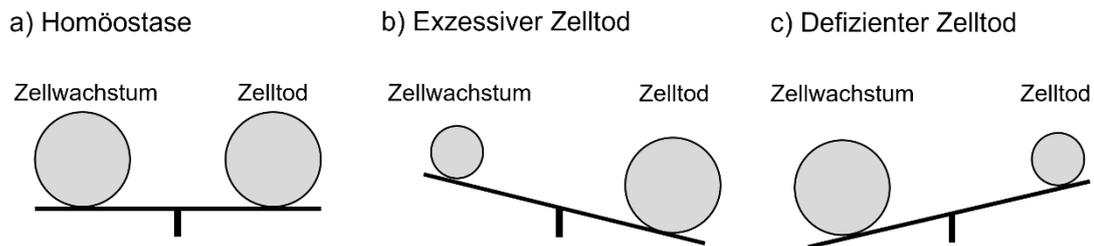


Abb. 1 – Homöostase. a) Ausgeglichenes Verhältnis zwischen Zellwachstum und Zelltod b) / c) Überschießende oder unzureichende Apoptoseraten sind in die Pathogenese einiger Erkrankungen involviert. So sind exzessive Zelltodraten beispielsweise bei ischämischen Geschehen problematisch, defiziente Raten führen zu beispielsweise malignen Erkrankungen. Bearbeitet nach (Solary et al., 1996)

1.2.1 Leukämie

Bei der Leukämie (*leukós haima* – Weißblütigkeit) handelt es sich um eine maligne Erkrankung des Knochenmarks, die durch eine ungehemmte klonale Proliferation hämatologischer Vorläuferzellen entsteht, die im Knochenmark die normale Hämatopoese und in anderen Organen die normalen ortsständigen Zellen verdrängen (Pschyrembel and Amberger, 2004).

Die sorgfältige Regulation des programmierten Zelltods erscheint besonders relevant in zellulären Kompartimenten, die einen hohen Zellumsatz besitzen, so auch im hämatopoetischen System. Daraus folgt, dass zu geringe Apoptoseraten gekoppelt mit malignen Transformationen zur Entstehung von Leukämien oder Lymphomen führen können. Onkogene Mutationen, die zu einer Blockierung der Apoptose führen, fördern so die Tumorentstehung und -progression, indem sie eine Zellumgebung schaffen, die genetische Instabilität toleriert und eine Häufung genetischer Mutationen ermöglicht (Fulda, 2009a). Unter dem Begriff Leukämie werden folgende Erkrankungen zusammengefasst: Akute myeloische Leukämie (AML), akute lymphatische Leukämie (ALL), chronisch myeloische Leukämie (CML) sowie chronisch lymphatische Leukämie (CLL). Die beiden letzteren werden heutzutage den myeloproliferativen

Erkrankungen zugeordnet bzw. als Non-Hodgkin-Lymphome bezeichnet (Herold, 2019).

Die ALL hat eine Gesamtinzidenz von 1/100.000 pro Jahr, wobei sie einen Häufigkeitsgipfel im Kindesalter und im hohen Erwachsenenalter zeigt. Bei der AML handelt sich um eine Erkrankung, die einen Häufigkeitsgipfel im höheren Erwachsenenalter besitzt. Bei Patienten über 70 Jahren liegt die Inzidenz bei 100/100.000. Die CLL ist die häufigste Leukämieform (Escherich).

Risikofaktoren für die Entstehung einer Leukämie sind neben einigen genetischen Syndromen wie dem Down-Syndrom oder der Neurofibromatose (Bhatia and Robison, 1999) auch äußere Umstände wie eine Exposition gegenüber ionisierenden Strahlungen oder Benzolen an bestimmten Arbeitsplätzen (Khalade et al., 2010).

Die Behandlung der Leukämien umfasst je nach Typ Chemotherapie, Bestrahlung, die Gabe monoklonaler Antikörper oder eine Stammzelltransplantation (Davis et al., 2014). Die Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren revolutionierte die bisherige Therapie, brachte jedoch auch keinen Erfolg im Sinne einer kurativen Therapie (Moen et al., 2007).

Die Prognose bezüglich des Langzeitüberlebens hängt von vielen Faktoren wie Alter, Komorbiditäten, Leukämiesubtyp sowie zytogenetischen und molekularen Charakteristiken ab (Davis et al., 2014). Obwohl supportive Maßnahmen und Risikostratifizierungen zu einer Optimierung der etablierten Therapien geführt haben, bleibt die Langzeit-Überlebensrate schlecht. Daher bedarf es der Identifikation neuer gezielter Therapeutika, die eine effektive anti-leukämische Aktivität bei geringer Toxizität für andere Gewebe bieten (De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016).

1.3 Apoptose

Die Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod einer Zelle. Angelehnt ist die Bezeichnung an den altgriechischen Begriff *apóptosis* für herunterfallen oder abfallen. Diese Art Zelltod dient dem Organismus im Laufe seines Lebens

in drei Situationen: zur Entwicklung und Homöostase, als Verteidigung und im Alterungsprozess (Vaux and Strasser, 1996). So spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in vielen embryologischen Prozessen, wie der Ausbildung des Lumens in tubulären Strukturen, der Entwicklung von Gliedmaßen oder der Entstehung der interdigitalen Spalten (Kerr et al., 1972). Sie ist essenziell für die Homöostase des Körpers, im Besonderen für Gewebe mit einem erhöhten Zellumsatz wie dem Gastrointestinaltrakt, dem Immunsystem und der Haut (Bold et al., 1997). Eine fehlerhafte Apoptoseregulation trägt dagegen zur Entstehung von Krebs oder Autoimmunerkrankungen bei (Carson and Ribeiro, 1993).

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen streng regulierten Mechanismus, dessen genetischer Code während der Evolution von der Nematode zum Menschen konserviert blieb (Vaux and Strasser, 1996). Während bei der Nekrose zelluläre Bestandteile frei in die extrazelluläre Umgebung entlassen werden und so zu einer schweren Entzündungsreaktion führen, verhindert der Ablauf der Apoptose eben diese Reaktion des Immunsystems (Bold et al., 1997).

Die Apoptose ist durch verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert. Zunächst schrumpft die Zelle, deformiert sich und verliert den Kontakt zu benachbarten Zellen. Anschließend bilden sich Blasen auf der Zellmembran – das sogenannte *membrane blebbing*. Der Zellkern und das Chromatin werden degradiert, die Mitochondrien zerstört und die Zelle zerfällt in kleine, kompakte, membranumhüllte Fragmente, den sogenannten *apoptotic bodies*. Gleichzeitig werden normalerweise innen liegende Phosphatidylserine der Zellmembran an den *apoptotic bodies* exponiert und dienen so als Erkennungssignal für phagozytierende Zellen (Papaliagkas et al., 2007)

Ausgelöst wird die Apoptose über eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli, wie beispielsweise DNA-Schäden, Nahrungsmangel, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitze oder die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren an der Zelloberfläche (Negroni et al., 2015).

Die intrazelluläre biochemische Signaltransduktion der Apoptose erfolgt unabhängig von der Art des Stimulus immer über sogenannte Caspasen (vgl. Abschnitt 1.3.1).

1.3.1 Caspasen

Caspasen (*cysteinyI-aspartate specific protease*) stellen eine Familie von Cysteinproteasen dar, die ihr Substrat nach einem Aspartat-Aminosäuren-Rest spalten (Degterev and Yuan, 2008). Aktuell sind 11 humane Caspasen identifiziert (Lamkanfi et al., 2002). Das Substrat von Caspasen umfasst einen Inhibitor einer DNase, die nach ihrer Aktivierung für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist. Andere Aufgaben von Caspasen sind die Fragmentierung der Kernlamina, das Lösen von Zytoskelettproteinen und damit der Zusammenbruch des Zytoskeletts, sowie die Zellfragmentierung (Cohen, 1997).

Alle Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert, die aus einer Pro-Domäne, einer p20- und einer p10-Domäne bestehen (Degterev et al., 2003). Je nach Funktion erfolgt die Klassifizierung der Caspasen in Initiator- und Effektorcaspasen (McIlwain et al., 2013). Caspasen haben unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen in ihrer Pro-Domäne, die es ihnen erlauben Komplexe mit multiplen Adaptern zu bilden (McIlwain et al., 2013). Die Dimerisierung durch vorgelagerte Signale ermöglicht darüber hinaus eine autokatalytische Spaltung der Monomere in eine große und eine kleine Untereinheit, was eine Stabilisierung des Dimers zur Folge hat (McIlwain et al., 2013). Die beiden monomeren Initiatorcaspasen (Caspasen-8 und -9) werden durch Dimerisierung aktiviert. Die Assemblierung in Dimere wird durch verschiedene Adapterproteine unterstützt, die an spezifische Regionen der Pro-Domäne der Caspase binden können.

Effektorcaspasen (Caspasen-3, -6 und -7) hingegen werden durch Initiatorcaspasen zwischen ihrer großen und kleinen Untereinheit gespalten und ermöglichen so eine Änderung der Konformation, die beide aktiven Zentren der Effektorcaspasen dimerisieren lassen und so eine funktionell aktive Protease schafft (Riedl and Shi, 2004). Die proteolytische Kaskade, in der eine Caspase andere Caspasen aktiviert, verstärkt den apoptotischen Signalweg und führt

somit zu einem schnellen Zelltod (Elmore, 2007). In der Tat führt die Elimination der Caspase-Aktivität entweder durch Mutation oder durch kleine pharmakologische Inhibitoren zur Verlangsamung oder Verhinderung der Apoptose (Earnshaw et al., 1999).

Die Aktivität der Caspasen wird durch das Gleichgewicht der Aktivität von proapoptotischen und antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern bestimmt (Giam et al., 2008). Bcl-2 wurde zuerst als Protoonkogen im folliculären B-Zell-Lymphom identifiziert. Es handelt sich um das humane Homolog zu ced-9, einem Repressor der Apoptose in *C. elegans* (Antonsson and Martinou, 2000). Antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder agieren als Repressoren der Apoptose, indem sie die Cytochrom c Ausschüttung aus dem Mitochondrium hemmen, proapoptotische Mitglieder fördern die Apoptose (Ghobrial et al., 2005). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL stabilisieren beispielsweise das mitochondriale Membranpotenzial und verhindern so die Öffnung der Membranporen (Adams and Cory, 1998). Dabei ist nicht die absolute Zahl sondern eher die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen entscheidend, ob die Apoptose initiiert wird oder nicht (Wong, 2011). Einem Todessignal folgend, durchlaufen proapoptotische Proteine post-translationelle Modifikationen, inklusive Dephosphorylierung und proteolytischer Spaltung, die in ihrer Aktivierung resultieren und schließlich zur Apoptose der Zelle führen (Scorrano and Korsmeyer, 2003). Die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-xL ist mit vielen malignen Tumoren assoziiert (Coultas and Strasser, 2003).

Die zweite wichtige Familie von intrazellulären Apoptose-Kontrollproteinen sind die IAP (vgl. Kapitel 1.4).

1.3.2 Extrinsischer Signalweg

In Säugetierzellen gibt es zwei zentrale Signalwege der Apoptose: Den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg (Hassen et al., 2012).

Die beiden Signalwege unterscheiden sich in ihrer Aktivierung, sowie der Beteiligung von Bcl-2 Proteinen und durch die Identität der Caspasen, die den Zelltod initiieren (Neophytou et al., 2021).

Alle Signalwege enden jedoch in der gemeinsamen Exekutionsphase der Apoptose, die über Caspasen vermittelt wird (Wong, 2011) (siehe Abb. 2).

Der extrinsische Signalweg beginnt an Rezeptoren der Zelloberfläche, die durch pro-apoptotische Signale oder spezifische Liganden wie *tumor necrosis factor* (TNF) oder *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) aktiviert werden (O'Brien and Kirby, 2008). Diese gewöhnlich als Todesrezeptoren bezeichneten Rezeptoren gehören zur Familie der TNF-alpha Rezeptoren (Khosravi-Far and Esposti, 2004). Allen Rezeptoren gemein ist eine extrazelluläre Domäne, die aus zwei bis sechs cysteinreichen Motiven besteht. Des Weiteren enthalten Todesrezeptoren eine homologe intrazelluläre Sequenz in der Nähe des C-Terminus, die aus etwa 80 Aminosäuren besteht und als Todes-Domäne bezeichnet wird (Ashkenazi and Dixit, 1998). Obwohl diverse Todesrezeptoren beschrieben sind, sind die bekanntesten der Typ 1 TNF Rezeptor (Ashkenazi and Dixit) und CD95 (Ashkenazi and Dixit, 1998) (Hengartner, 2001).

Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor bindet dieser über seine intrazelluläre Todesdomäne an ein Adapterprotein wie *Fas-associated death domain* (FADD) und *TNF receptor-associated death domain* (TRADD). Diese Adapterproteine besitzen wiederum selbst eine Interaktionsdomäne, die *death effector domain* (DED) (Goldar et al., 2015). Die DED Domäne von FADD beispielsweise interagiert nun mit der DED der gering aktiven Pro-Caspase-8 und bildet so einen intrazellulären Multi-Protein-Komplex, den *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) (Khosravi-Far and Esposti, 2004). Der DISC-Komplex initiiert dann die Aktivierung der Pro-Caspase-8, welche nun als aktive Caspase-8 die Apoptose fördert, indem sie stromabwärts gelegene Effektorcaspasen aktiviert, was schließlich zum Zelltod führt (Karp, 2009).

Zusätzlich kann das Signal zur Apoptose über den mitochondrien-abhängigen intrinsischen Signalweg verstärkt werden. Hierfür wird BID, ein Mitglied der Bcl-2-Superfamilie gespalten und migriert zu den Mitochondrien. Dort vermittelt es die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und ermöglicht so die Cytochrom c Ausschüttung und damit den Beginn des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (vgl. Kapitel 1.3.3).

Extrinsischer Signalweg Intrinsischer Signalweg

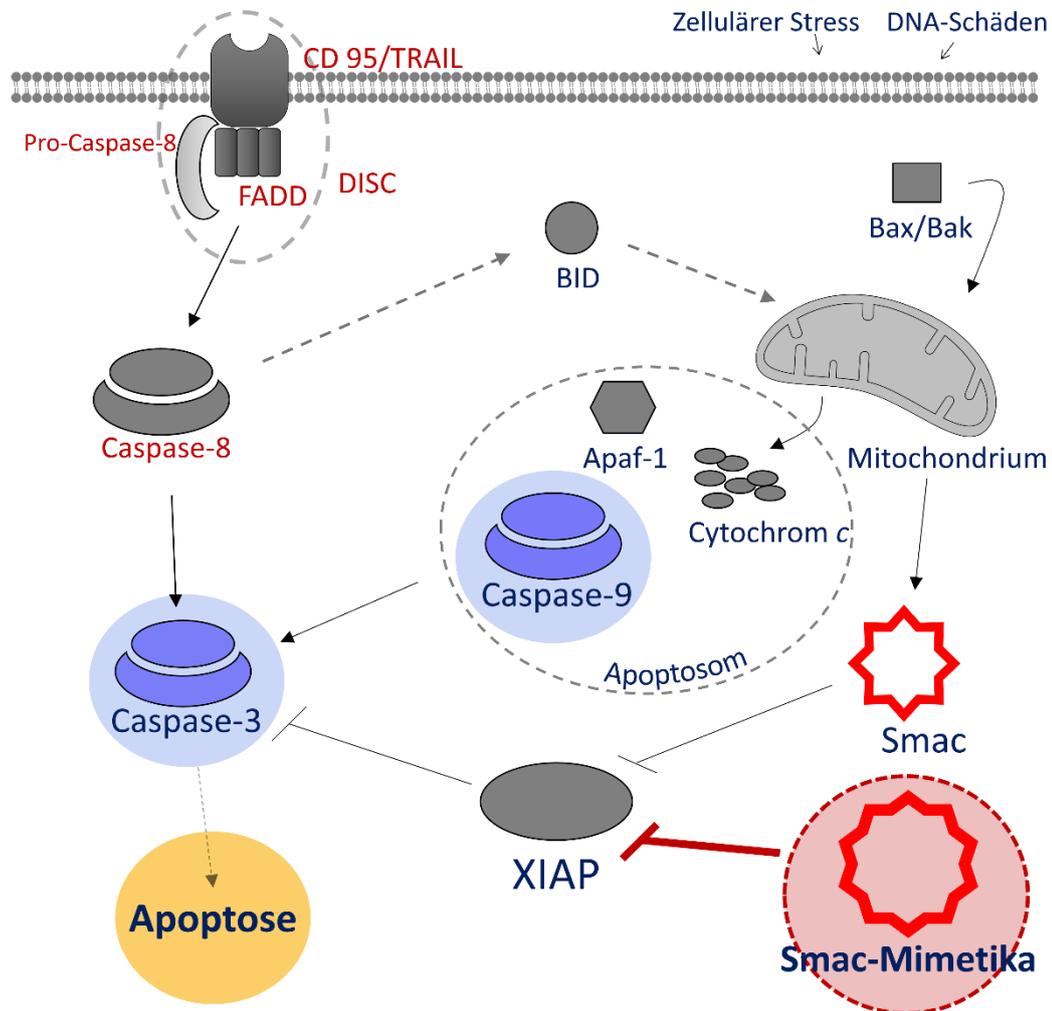


Abb. 2 – Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. Der extrinsische Signalweg beginnt an membranständigen Todesrezeptoren über eine Aktivierung durch spezifische Liganden wie TRAIL. Durch Ausbildung des *death-inducing signaling complex* (DISC) wird die Pro-Caspase-8 autoprotolytisch aktiviert und somit die nachstehende Signalkaskade ausgelöst. Einige Zellen benötigen darüber hinaus die Amplifizierung des Todessignals über Caspase-8. Diese spaltet *BH3-interacting domain death agonist* (BID) und ermöglicht so die Aktivierung über den intrinsischen Signalweg. Der intrinsische Signalweg verläuft über Mitochondrien als Antwort auf Zellstress (Hypoxie, oxidativer Stress, irreparable genetische Schädigung). Es kommt zur Freisetzung proapoptischer Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Apaf-1, Cytochrom c). Diese bilden nun zusammen mit der Pro-Caspase-9 das Apoptosom und führen so über die autokatalytische Aktivierung von Caspase-9 zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 und somit zur Apoptose. *Bearbeitet nach (Pistritto et al., 2016)*

1.3.3 Intrinsischer Signalweg

Bei zu starker Beschädigung oder Belastung besitzen Zellen die Fähigkeit, sich selbst zu töten, indem sie die Aggregation und Aktivierung der Pro-Caspasen von innerhalb der Zelle auslösen (Alberts et al., 2011).

Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg beginnt mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran der Mitochondrien einer Zelle. Diese erhöhte Permeabilität kann durch eine Reihe an Faktoren verursacht werden, wie beispielsweise oxidativem Stress, viraler Infektionen oder Ischämie einer Zelle (Kroemer et al., 1998). Anschließend werden durch die Aktivierung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Bax/Bak) die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 neutralisiert, was eine Störung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran induziert (Pistritto et al., 2016).

Die erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran ermöglicht nun den Ausstrom von Cytochrom c ins Zytosol. Dort bindet Cytochrom c an das Adapterprotein Apaf-1 (Apoptose-aktivierender Faktor 1) und fördert so die Bildung des Apoptosoms mit Pro-Caspase-9. Durch Autoprotolyse findet die Aktivierung zur Caspase-9 statt, die nun stromabwärts die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert (Pistritto et al., 2016).

1.3.4 Nekroptose

Das Konzept des Zelltods wurde in den letzten Jahren wissenschaftlich weiterentwickelt. Zuvor glaubte man, dass es sich bei Apoptose und Nekrose um zwei grundverschiedene Formen des Zelltods handelt - eine reguliert, die andere zufällig. Der aktuelle Kenntnisstand zeigt, dass auch die Nekroptose regulatorischen Mechanismen folgt (Khoury et al., 2020). Die Nekroptose ist eine Form des regulierten Zelltods, die von den Serin/Threonin-Kinasen (*receptor-interacting serine-threonine kinase*) RIPK3 und RIPK1 sowie von MLKL (*mixed lineage domain-like*) abhängig ist und sich morphologischen Auswirkungen der Nekrose bedient (Galluzzi et al., 2017). Obwohl Apoptose und Nekrose gemeinsame Auslöser haben, unterscheiden sich ihre Signalwege und zellulären Phänotypen deutlich (Gupta et al., 2018). Generell führt die

Apoptose zu geringeren inflammatorischen Prozessen, da sie die Integrität der Plasmamembran erhält und die Exposition des Zellinhalts nach außen verhindert (Pasparakis and Vandenabeele, 2015). Die Nekroptose bietet nicht nur einen fundamentalen Beitrag zur embryonalen und postnatalen Entwicklung, sondern ist auch an der Instandhaltung der Homöostase des adulten Organismus sowie vielen humanen Pathologien beteiligt (Conrad et al., 2016). Daher bieten Proteine, die für die Nekroptose relevant sind, attraktive Ziele für die Entwicklung von neuen Medikamenten (Galluzzi et al., 2017).

1.4 Inhibitor of apoptosis proteins (IAP)

Von den vielen an der Apoptose beteiligten Proteinen spielen die sogenannten *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP) eine entscheidende Rolle bei der Regulation, da sie durch verschiedene Enzyminteraktionen die Apoptose inhibieren können (Mannhold et al., 2010). Bei den IAP handelt es sich um eine Familie endogener Caspase-Inhibitoren, die während der Evolution hoch konserviert blieben (Fulda and Debatin, 2006). Im Menschen gibt es acht IAP: *X-chromosome-linked* IAP (XIAP / BIRC4), *cellular* IAP 1 (c-IAP1 / BIRC2), *cellular* IAP 2 (c-IAP2 / BIRC3), *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP / BIRC1), Survivin (TIAP / BIRC5), Apollon (Bruce / BIRC6), *melanoma* IAP (Livin / BIRC7) und *testis-specific* IAP (ts-IAP / BIRC8) (ILP2) (Silke and Vucic, 2014). Wichtiges Strukturmerkmal aller acht IAP ist die *Baculovirus IAP repeat* (BIR)-Domäne. Diese 70-80 Aminosäuren umfassende Domäne besteht aus einem dreigliedrigem antiparallelem beta-Faltblatt und fünf alpha-Helices, die mit drei Cystein- und einem Histidinrest ein Zink-Atom stabilisieren. Die Anzahl der BIR-Domäne variiert zwischen einer bis zu drei Domänen und vermittelt als N-terminale Domäne die Interaktion mit Caspasen (Silke and Vucic, 2014). IAP unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe. Sie variieren zwischen 102 und 4845 Aminosäuren. Wie in Abbildung 3 zu sehen, finden sich neben der BIR-Domäne in den jeweiligen IAP eine C-terminal gelegene Zink-Finger-Domäne (*really interesting new gene* RING), eine *caspase-recruitment domain* (CARD) sowie *ubiquitin-associated domains* (UBA) (Mace et al., 2010).

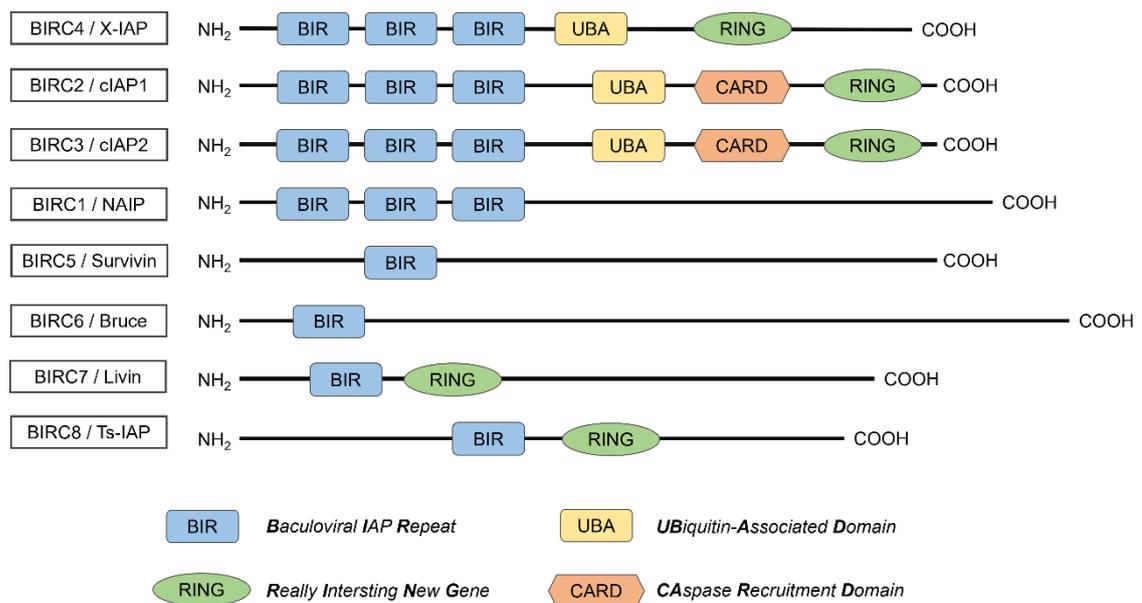


Abb. 3 - Schema der acht IAP. Aktuell gibt es acht in Säugetierzellen bekannte IAP. Als charakteristisches Merkmal allen gemeinsam ist die BIR-Domäne (*baculoviral IAP repeat*). Die Anzahl variiert von einer bis zu drei Repetitionen dieser Domänen. Neben der BIR-Domäne finden sich in den jeweiligen IAP zudem eine RING-Domäne, eine CARD-Domäne oder auch eine UBA-Domäne. Position und Größe der Domänen sind hier nicht repräsentativ. *Modifiziert nach (Mannhold et al., 2010)*

Neben seiner Rolle als direkter Caspase-Inhibitor kann XIAP die Apoptose über die Ligase-Aktivität seiner RING-Domäne blockieren, die die proteasomale Degradation proapoptotischer Signale vermittelt (Schile et al., 2008).

Neben den Bcl-2-Familienmitgliedern stellen die zuvor beschriebenen IAP die zweite wichtige Proteinfamilie dar, die für die Regulation der Apoptose essenziell sind. Dafür interagieren die IAP direkt mit den Caspasen und unterdrücken die Apoptose indem sie entweder die Pro-Caspase-Aktivierung hemmen oder die Caspasen für die Ubiquitinylierung und damit den Abbau im Proteasom markieren (Mannhold et al., 2010).

1.4.1 Smac/DIABLO

Smac ist ein mitochondriales Protein, welches in das Zytosol freigesetzt wird, wenn in einer Zelle der apoptotische Zelltod eingeleitet wird (Du et al., 2000). *Second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac) kann als natürlicher Inhibitor von IAP die Aktivität ebendieser regulieren (Du et al., 2000). Ein anderer Name für Smac ist DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*),

Smac bezeichnet dabei das humane Protein, DIABLO das Protein der Maus (Verhagen et al., 2000).

Smac wird als Vorläuferprotein bestehend aus 239 Aminosäuren synthetisiert, wobei 55 Aminosäuren am N-Terminus als Signalpeptid fungieren, das nach Transport in die Mitochondrien abgespalten wird (Du et al., 2000). Endogenes Smac liegt als Homodimer vor und interagiert sowohl mit der BIR2 als auch der BIR3 Domäne von XIAP (siehe Abb. 4). Verliert Smac über Punktmutationen die Fähigkeit zur Dimerisierung, kann es nicht länger die BIR2 Domäne von XIAP binden, die Bindung an die BIR3 Domäne ist jedoch weiterhin möglich (Chai et al., 2000).

Durch strukturelle Ansätze wurde anhand von Kristallstrukturanalysen erkannt, dass Smac mit seinem N-terminalen AVPI-Aminosäure-Rest eine Furche von XIAP-BIR3 bindet (Wu et al., 2000).

Die aktivierte Caspase-9 exponiert einen N-Terminus, ähnlich zu dem von Smac, der für die Interaktion mit der BIR3 Domäne des XIAP notwendig ist (Shiozaki et al., 2003). Daher kann Smac die Inhibierung der Caspase-9 durch XIAP neutralisieren, da es um dieselbe spezifische Bindungsstelle am XIAP konkurriert (Gao et al., 2007).

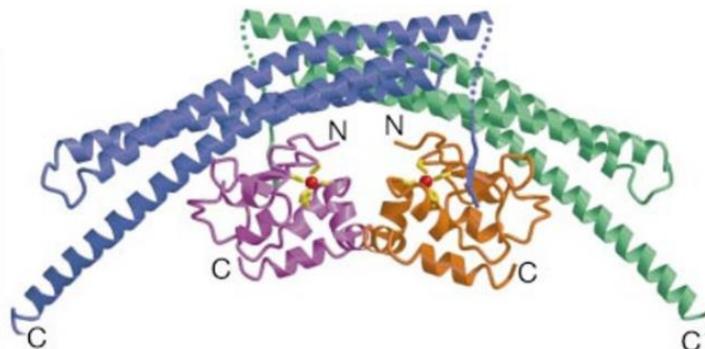


Abb. 4 - Kristallstruktur von Smac mit zwei BIR3 Domänen von XIAP. Struktur eines Smac-Homodimers. Die Monomere sind in blau bzw. grün dargestellt. Hier dargestellt ist die Interaktion mit zwei BIR3 Domänen von XIAP. Die zwei benachbarten BIR3 Domänen (violett und orange) liegen nebeneinander unter dem bogenförmig angeordneten Smac-Homodimer. *Modifiziert nach (Wu et al., 2000).*

1.4.2 Kommerzielle Smac-Mimetika

Eine Überexpression von IAP geht bei vielen malignen Erkrankungen mit einer schlechten Prognose einher. Klinisch wurde beobachtet, dass Patienten mit einem höheren Gehalt von Smac oftmals eine bessere Prognose mit höheren Remissionsraten und einem längeren Überleben zeigten (Fulda and Vucic, 2012). Studien, in denen synthetische Smac-Proteine eingesetzt wurden, zeigten, dass damit behandelte Krebszellen sich erneut einer Chemotherapie zuführen ließen (Carter et al., 2003). Davon motiviert wurde die pharmakologische Entwicklung sogenannter Smac-Mimetika angestoßen. Smac-Mimetika ahmen das N-terminale Tetrapeptid (NH₂-AVPI) strukturell nach, das an die BIR-Domäne von cIAP1/2 und XIAP bindet (Kipp et al., 2002). Aktuell befinden sich acht Substanzen in klinischen Studien für die Therapie verschiedener Krebserkrankungen. Dazu zählen neben anderen Birinapant, AT-406 (siehe Abb. 5, Abschnitt 2.1.6) und GDC-0152 (Morrish et al., 2020).

Bei AT-406 handelt es sich um ein oral verfügbares Smac-Mimetikum, welches das AVPI-Peptid des Smac mimikriert, indem es an die BIR3 Domäne von XIAP bindet, wodurch es ebenso wie Smac selbst das XIAP inhibiert. So soll die Hemmung der IAP und damit die Apoptosebereitschaft wiederhergestellt werden. (Cai et al., 2011)

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die zehn Smac-Mimetika LBPS-31-40 (*Ligand-based-pan-selective*) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation von leukämischen JM Zellen sowie ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in eben diesen Zellen untersucht werden.

Zum Vergleich mit kommerziell erhältlichen IAP-Antagonisten und zur Einordnung der Effektivität der Wirkung sollen die IC₅₀-Werte der Substanzen bestimmt werden. Ebenso soll eine Wirkung der Substanzen auf native T-Lymphozyten untersucht werden, um das Ausbleiben von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu untersuchen. Dies stellt eine relevante Eigenschaft für potenzielle Chemotherapeutika dar. Zudem sollen Hinweise erarbeitet werden, die Aufschluss über die Art des ablaufenden Signalwegs ermöglichen, der den Zelltod induziert. Dazu sollen die Apoptoseraten mittels Nicoletti-Methode und der Grad der Aktivierung von Caspasen bestimmt werden.

Abschließend soll anhand eines Vergleichs der Muttersubstanz mit den getesteten Substanzen eine Struktur-Wirkungs-Beziehung diskutiert werden, um die chemischen Gruppen zu identifizieren, die für eine Wirkung relevant sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

JM (Jurkat) Humane T-Lymphozyten Krebszelllinie aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter T-Zell Leukämie (akute lymphatische Leukämie)

2.1.2 Zellkulturmedien

<i>Medium</i>	<i>Zusammensetzung</i>
RPMI für JM	RPMI-1640 mit 4,5 g/l Glucose (SIGMA) 10 % Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (100 U/ml)/ (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (GIBCO) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES
JM (zur Behandlung)	RPMI-1640 mit 4,5 g/l Glucose (SIGMA) 2 % Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (100 U/ml)/ (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (GIBCO) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES

RPMI für Lymphozyten	RPMI-1640 mit 4,5 g/l Glucose (SIGMA) 10 % Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (100 U/ml)/ (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (GIBCO) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES Con A 1µl/ml IL-2 100 U/ml
RPMI für Lymphozyten (zur Behandlung)	RPMI-1640 mit 4,5 g/l Glucose (SIGMA) 2 % Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (100 U/ml)/ (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (GIBCO) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES Con A 1µl/ml IL-2 100 U/ml

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
Ammoniumchlorid	Apotheke UKD (Düsseldorf)
AT-406 (MW 561,72 g/mol)	Sigma-Aldrich (München)
Biocoll 1077 g/ml	Biochrom AG (Berlin)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg)
DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine	PAA Laboratories (Cölbe)
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol 70 %	Merck (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Green-Caspase-3 Staining Kit	PromoKine (Heidelberg)
HEPES	Thermo Fisher (Waltham, USA)
L-Glutamin	Thermo Fisher (Waltham, USA)

Chemikalien	Hersteller
MEM Nicht essentielle Aminosäure Lösung 100x	Sigma-Aldrich (München)
Methyl α -D-mannopyranoside	Sigma-Aldrich (München)
PBS	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (München)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (München)
Red-Caspase-9 Staining Kit	PromoKine (Heidelberg)
RNase A	Fermentas (Waltham, USA)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (München)
Sheath Fluid	Partec (Münster)
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich (München)
Trypsin 10x Solution	Thermo Fisher (Waltham, USA)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
FACS Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 0,2-2 ml	Eppendorf (Escherich)
Incidur [®] Spray	ECOLAB (Saint Paul, USA)
BD Falcon [®] 75 cm ²	BD Biosciences (Heidelberg)
CELLSTAR [®] Polypropylen Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
CELLSTAR [®] Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Corning [®] Costar [®] Stripette [®] 5 ml	Sigma-Aldrich (München)
Corning [®] Costar [®] Stripette [®] 10 ml	Sigma-Aldrich (München)
Falcon Tubes mit Kissen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturtestplatte 6/12/24/96 Vertiefungen	TPP [®] (Trasadingen, Schweiz)
Objektträger zur Zellzählung mit TC20 [™]	Bio-Rad (Hercules, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Escherich)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)

Material	Hersteller
Nitrilhandschuhe	Ansell (Richmond, Australien)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
PI-staining buffer	50 µl Propidiumiodid (100µg/ml in PBS) 2 µl RNase A 1 mg/ml in PBS mit PBS auf 1 ml auffüllen
PI-Lysepuffer	0,1 % (w/v) Natrium Citrat-2-Hydrat 0,1 % (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Propidiumiodid mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

2.1.6 Neu entwickelte IAP-Antagonisten und der kommerzielle IAP-Antagonist AT-406

Die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen wurden erstmals von Dr. E. Carosati und Prof. G. Cruciani (Universität Perugia) synthetisiert. Es handelt sich dabei um neu entwickelte IAP-Antagonisten, die jedoch nicht selektiv an ein bestimmtes IAP binden, sondern vielmehr so designt wurden, dass sie unterschiedliche IAP binden können. Daher auch der Name „*ligand-based-pan-selective*“ (LBPS). Sämtliche Substanzen wurden in 100 % DMSO gelöst. Für die Versuche fand jeweils eine Verdünnung auf 0,1 % DMSO statt, um toxische Wirkungen des DMSO zu minimieren (Strukturen vgl. Abb. 6 und Abschnitt 4.5).

Tabelle 1 - IAP-Antagonisten und deren Molekulargewichte

LBPS	Molekulares Gewicht [g/mol]	LBPS	Molekulares Gewicht [g/mol]
1	411,10	36	306,05
32	305,31	37	306,05
33	349,08	38	394,14
34	295,04	39	393,14
35	321,05	40	468,05

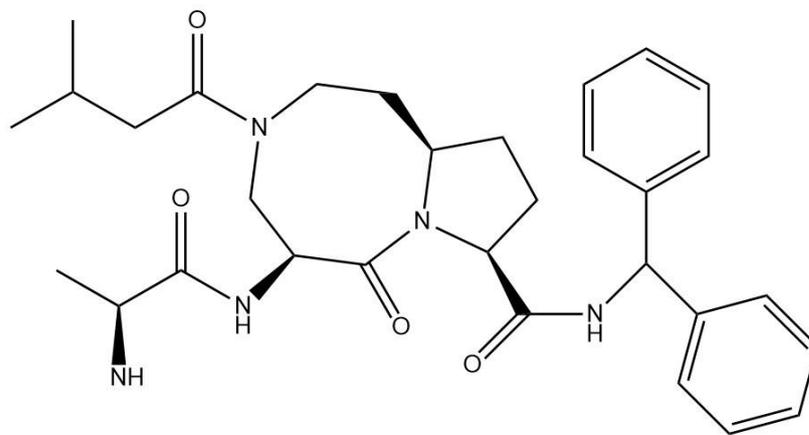
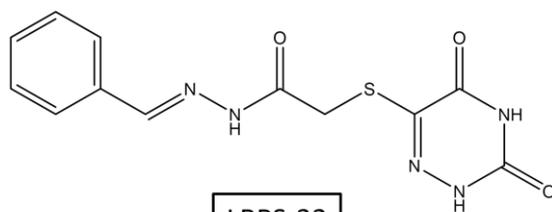
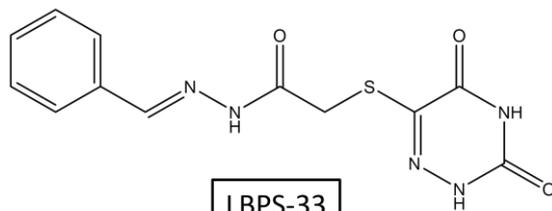


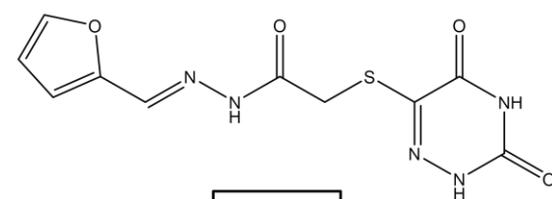
Abb. 5 - AT-406: Kommerzieller IAP-Antagonist. Strukturformel des kommerziellen IAP-Antagonisten AT-406. Das Molekulargewicht beträgt 561,72 g/mol.



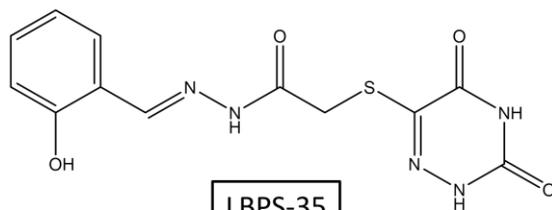
LBPS-32



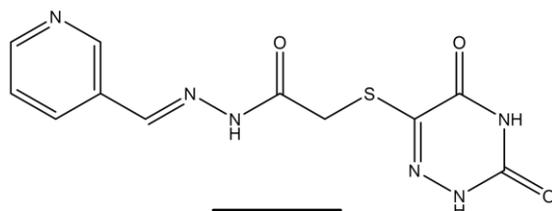
LBPS-33



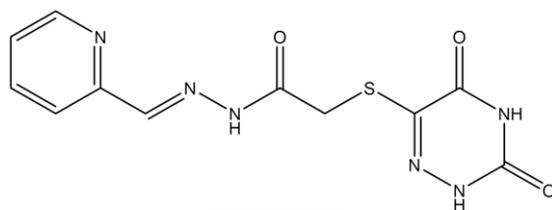
LBPS-34



LBPS-35



LBPS-36



LBPS-37

Abb. 6 - Strukturen der Smac-Mimetika ohne antiproliferativen Effekt. Gezeigt sind die Strukturen der sechs Substanzen, die in den Proliferationsassays keinen antiproliferativen Effekt aufwiesen. LBPS-31 wurde bei mangelnder Löslichkeit diesen Versuchen nicht zugeführt. Im Vergleich zu den wirksamen Substanzen fehlt hier die N-(2-ortho-benzyloxy)-benzyliden-Gruppe. (vgl. Abschnitt 4.5)

2.1.7 Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systemec (Linden)
Brutschrank Haeraus HS 12	Kendro (Hanau)
Durchflusszytometer CyFlow space	Sysmex (Norderstedt)
Durchlichtmikroskop Labovert FS	Leica (Wetzlar)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubator	Thermo fisher (Waltham, USA)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach)
pH-Meter	HANNAinstruments (Wonnsocket, USA)
Pipetboy accu	Integra Bioscience (Biebertal)
Pipetten	Eppendorf (Escherich)
Sterilbank Clean Air NSF49 BS5726	Clean Air (Nordhorn)
TC20™ automated cell counter	Bio-Rad (Hercules, USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus Sepatech (Hanau)
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf (Escherich)
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

2.1.8 Software und Webtools

EndNote X9

FlowMax Software (2.82)

Microsoft Excel, Powerpoint, Word (16.32)

PubMed (<http://ncbi.nlm.gov/pubmed>)

www.aatbio.com/tools/ic50-calculator

2.2 Methoden

Zur Wahrung der Sterilität wurden sämtliche zellbiologische Arbeiten an einer Sterilbank durchgeführt. Soweit nicht steril verpackt, wurden Verbrauchsmaterialien zuvor autoklaviert.

2.2.1 Zelllinie JM (Jurkat)

Die Zellen für diese Arbeit wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt

Sämtliche Versuche wurden an der Suspensionszelllinie JM durchgeführt (Carosati et al., 2015). Dabei handelt es sich um einen Subklon der Jurkat-Zelllinie. Jurkat Zellen sind Klone von T-Zell Leukämie Zellen, die ursprünglich einem 14-jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie entnommen wurden (Schneider et al., 1977).

2.2.2 Kultivierung von JM Zellen

Zur Vermeidung der Synchronisation der Suspensionszellen wurden die Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Hierfür wurden die Zellen in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte regelmäßig passagiert. Die verwendeten Zellzahlen sowie die optimalen Zeiträume zwischen den Passagierungen wurden durch eine Wachstumskinetik ermittelt.

Die Kultivierung der JM Zellen erfolgte in 75 cm² großen Zellkulturflaschen in RPMI-1640 Medium, welches mit 10 % FCS, 2 nM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin sowie 10 mM HEPES versetzt wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Zur Subkultivierung wurde die gesamte Zellsuspension aus einer Zellkulturflasche in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml sterilem auf 37°C vorgewärmten PBS resuspendiert. Nun erfolgte die erneute Zentrifugation bei 800 g und 4 °C für 5 Minuten. Der

Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem, 37 °C warmen Medium aufgenommen. Zuletzt wurden 0,5-5 ml dieser Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche geben, in die zuvor 15-19,5 ml frischen Mediums gegeben wurde, sodass das Gesamtvolumen 20 ml entsprach. Das eingesetzte Volumen der Zellsuspension richtete sich dabei nach geplanter erneuter Passagierung sowie gewünschter Zelldichte.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die Zellen in Medium mit nur 2 % FCS kultiviert, um so unerwünschte Wechselwirkungen zwischen dem FCS und den untersuchten Substanzen zu minimieren. Die Kultivierung der Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls mit 2 % FCS (Carosati et al., 2015).

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde der TC20™ Cell Counter der Firma Biorad genutzt. Für eine Messung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau 0,4 % verdünnt und anschließend 10 µl dieser Suspension in die Kammer einer gerätespezifischen Einmalzählkammer gegeben. Die Füllung der Zählkammer erfolgte dabei durch passive Kapillarkräfte. Nach Einführen der Zählkammer in das Gerät ermittelt dieses automatisiert die Gesamt- sowie die Lebendzellzahl pro Milliliter. Darüber hinaus sind noch weitere automatisierte Funktionen des Gerätes abrufbar, die zum Beispiel eine Eingrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation ermöglichen.

2.2.4 Wachstumskinetik

Hierfür wurden auf einer 6-Loch-Platte $1,5 \times 10^5$ Zellen in je 3 ml Medium pro Vertiefung ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden jeweils 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und anschließend die Zellzahl wie unter 2.2.3 beschrieben am TC20™ Zählautomat bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte so immer nach 24-stündiger Inkubation bis zu 96 h.

2.2.5 Gewinnung mononukleärer Zellen aus humanem Blut

Um die Effekte der untersuchten Substanzen auf gesunde Zellen des Menschen zu untersuchen, wurden Lymphozyten aus einer Blutkonserve gewonnen und kultiviert.

Die antikoagulierte, tagesfrische Blutkonserve wurde freundlicherweise vom Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat keine grundsätzlichen ethischen oder rechtliche Bedenken gegen die Durchführung der Experimente dieser Arbeit. Studiennummer 4827 (Carosati et al., 2015).

Die Gewinnung erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation mit BioColl® als Trennmittel (s. Abb. 7).

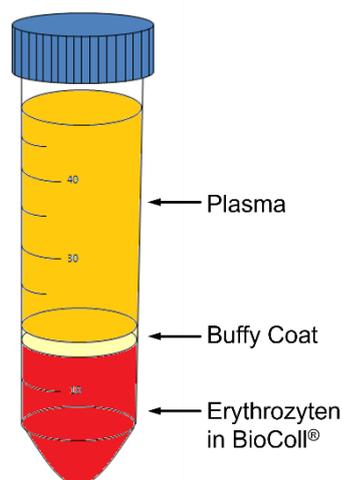


Abb. 7 - Schematische Darstellung der Blutfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. Die festen Blutbestandteile (Erythrozyten, Granulozyten) setzen sich im unteren Bereich, dem Pellet, ab. Der Überstand besteht aus Plasma und Thrombozyten. Die Interphase - der *buffy coat* - enthält die zu isolierenden Lymphozyten und Monozyten.

Ca. 50 ml Vollblut wurden aus der Konserve in einen Messzylinder überführt. Das Vollblut wurde dann mit PBS 1:6 verdünnt. Ein zuvor mit 15 ml BioColl® gefülltes Falconröhrchen mit Kissen wurde für 2 Minuten bei 391 rcf zentrifugiert. Dann wurden je 30 ml der Blutsuspension in die Falconröhrchen überführt. Diese wurden dann für 20 Minuten bei 600 g und 0°C ungebremst zentrifugiert. Durch die Zentrifugation präzipitierten die Blutbestandteile am Ort

der spezifischen Dichte. Der dadurch sichtbar gewordene Interphasering mit den darin enthaltenen Lymphozyten konnte nun vorsichtig abpipettiert und in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt werden. Die abpipettierte Lösung wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei 300 g und 10°C ebenfalls ungebremst zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml 0,8% NH₄Cl resuspendiert. Bei der anschließenden Inkubation für 5 Minuten bei 4°C erfolgte die Lyse von versehentlich mit überführten Erythrozyten. Anschließend wurde zunächst erneut bei 300 g, 10 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 300 g, 10 °C für 4 Minuten zentrifugiert und schließlich in Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nun automatisiert. Die Zellen wurden nun in den Konzentrationen 5x10⁵ und 1x10⁶ in vorbereitete Zellkulturflaschen überführt.

Um zu gewährleisten, dass tatsächlich nur T-Lymphozyten in Kultur wachsen, muss den Zellen, die eine Mischpopulation aus B- und T-Lymphozyten darstellen, 1 µg/ml Concanavalin A (Con A) sowie initial 100 U/ml Interleukin- 2 (IL-2) zugesetzt werden (Carosati et al., 2015). Die Kombination aus Con A mit einer hohen Dosis IL-2 stimuliert die T-Lymphozyten zur Proliferation und verhindert zudem spenderspezifische Einflüsse auf das Wachstum der Zellen. Concanavalin A ist ein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliertes Protein, welches zur Gruppe der Lektine gehört. Es handelt sich um ein gut studiertes Lektin, welches eine hohe mitogene Aktivität auf humane T-Lymphozyten besitzt (Beckert and Sharkey, 1970).

2.2.6 Kultivierung der T-Lymphozyten

Die Inkubation der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 24 h Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt. Dafür wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, die entstandenen Zellcluster durch vorsichtiges Pipettieren gelöst und anschließend im Cell Counter vermessen. Dann wurden zu jeder Zellkulturflasche je 0,5 µl (20U/ml) Interleukin-2 hinzugefügt, um die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase zu bringen und erneut für 24 h inkubiert.

Für Untersuchungen mit den Testsubstanzen wurden ein Medium mit nur 2 % FCS verwandt. Für die Versuche wurden die Zellen in einer definierten Anzahl auf Zellkulturplatten ausgesät und dort behandelt.

2.2.7 Zellzahlbestimmung der T-Lymphozyten

Ab 48 h Inkubation werden die Zellen vor der Zellzahlbestimmung mit α -Methylmannopyranose (0,1 M) für 5 Minuten inkubiert, um entstandene Zellcluster zu lösen, dann erfolgt die Zellzählung im Cell Counter.

2.2.8 Proliferationsassay und Bestimmung der IC₅₀-Werte

Zur Identifizierung relevanter proliferationshemmender Substanzen wurde zunächst der Einfluss auf das Wachstum mittels Bestimmung der Zellzahl nach bis zu 96 Stunden bestimmt. Hierfür wurden in vier 96-Loch-Platten 1×10^4 Zellen in 200 μ l 2%-FCS Medium ausgesät. Als Negativkontrolle diente DMSO, zur Positivkontrolle wurde AT-406 genutzt. Nach Inkubation über 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Zellzahl mittels automatisierter Durchflusszytometrie bestimmt.

Hierfür wurden in einer 96-Loch-Platte 1×10^4 Zellen in 200 μ l pro Vertiefung ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit den relevanten Substanzen LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40 behandelt. Nach Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 96 Stunden wurde die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie unter Nutzung des RobbyWell™ bestimmt.

Die IC₅₀-Werte sind nicht direkt messbar, sondern müssen mittels grafischer Auftragung einer Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt werden (Carosati et al., 2015).

2.2.9 Caspase-Aktivitätsmessung

Da Caspasen eine große Rolle im apoptotischen Signalweg spielen, wurde die Aktivität ebendieser mittels fluoreszenzmarkierter Caspase-Inhibitoren *in situ* bestimmt (Carosati et al., 2015). Hierfür wurden die Caspase-staining Kits der

Firma PromoKine genutzt. Bestandteil dieser Kits sind spezifisch und irreversibel bindende Caspase-Inhibitoren, die durch ihren Fluoreszenzmarker leicht mittels Durchflusszytometrie messbar sind. Zudem sind sie gut zellpermeabel und ungiftig.

Bei der Bestimmung der Caspase-3 wird in den genutzten Kits der Caspase-Inhibitor DEVD-FMK konjugiert an FITC (FITC-DEVD-FMK) als Marker verwendet. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgt im FL-1 Kanal, bzw. bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm. Als Marker für die Bestimmung der Caspase-9 diente der Caspase-Inhibitor LEHD-FMK konjugiert an Sulfo-Rhodamin (Red-LEHD-FMK). Auch dieser Marker ist ungiftig, gut zellpermeabel und bindet spezifisch und irreversibel an die aktivierte Caspase-9. Messbar ist er im FL-2 Kanal des Durchflusszytometers, entsprechend einer Extinktion von 540 nm und einer Emission von 570 nm.

Zur Durchführung der Assays wurden die JM Zellen in einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml in 2 % FCS Medium aufgenommen. Je 1000 μ l dieser Lösung wurden in 14 Vertiefungen einer 24-well Zellkulturplatte gegeben. Dann wurden die Zellen in je zwei Vertiefungen mit einer Substanz in der Konzentration 10 μ M behandelt. Nach einer Inkubation über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die einzelnen Proben in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden dann bei 6 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde der Caspase-Mix angesetzt. Dazu wurden das Green Caspase-3 und das Red Caspase-9 staining Kit jeweils in 10 % FCS Medium gelöst. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der Proben verworfen und die Pellets in je 100 μ l des Caspase-Mix resuspendiert. Die ungefärbten Proben wurden in 100 μ l 10 % FCS Medium aufgenommen. Die geöffneten Reaktionsgefäße wurden nun bei 37°C für 30-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie für 3 Minuten bei 17 rcf zentrifugiert. Danach wurden die Proben zweimal mit je 500 μ l kaltem Wash Buffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Proben erneut wie zuvor zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in je 1000 μ l Wash Buffer resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden nun auf Eis gelagert und zügig im Durchflusszytometer vermessen.

2.2.10 Nicoletti-Assay, Apoptoserate

Grundlage für den Nicoletti-Assay ist die Tatsache, dass während der Apoptose eine DNA-Fragmentierung und somit ein Verlust der nukleären DNA stattfindet. Nutzt man nun ein Fluorochrom, welches DNA durch Interkalierung markieren kann, können so in der Durchflusszytometrie der zelluläre DNA Gehalt gemessen und die hypoploiden Zellen identifiziert werden (Riccardi and Nicoletti, 2006). Dieses Testprinzip entwickelten Nicoletti et al. im Jahr 1991 (Carosati et al., 2015).

Für die Untersuchung wurden vier 24-well Platten (für 24, 48, 72 und 96 h) mit 1000 μ l/well versehen. Die Zellen lagen in einer Konzentration von 10^5 /ml vor. Sowohl die zu testenden Substanzen als auch AT-406 als Positivkontrolle, sowie DMSO als Negativkontrolle wurden in der Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Nach je 24 h Inkubation wurden die behandelten Zellen in Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 97 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 μ l PI-Lyse-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend im Eisbad gelagert und direkt mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL-2 also bei 590 nm gemessen. Vor der Messung wurden die Proben zunächst mit Wash Buffer auf 700 μ l aufgefüllt.

3 Ergebnisse

Von den in Deutschland im Jahr 2012 insgesamt 478.000 neu aufgetretenen Krebserkrankungen machen Erkrankungen des blutbildenden Systems ca. 2,6 % der Fälle aus. Eine Fehlregulation der Apoptose ist meist Ursache der malignen Entartung. Die Widerstandsfähigkeit gegen die Apoptose resultiert primär aus hohen Expressionsraten von *Bcl-2-family anti-apoptotic proteins* und *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP). IAP sind als relevante Ziele für eine therapeutische Intervention erkannt und einige *small molecules* wurden designt, um IAP zu inhibieren. Smac und somit auch Smac-Mimetika können IAP binden und inaktivieren und damit eine Apoptose ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war es zehn neue Derivate eines Smac-Mimetikums bezüglich ihrer antiproliferativen Wirkung gegenüber der leukämischen Zelllinie Jurkat M (JM) zu untersuchen. Dafür wurden sowohl Proliferationsraten als auch IC₅₀-Konzentrationen bestimmt. Die wirksam getesteten Kandidaten wurden zum Vergleich an gesunden peripheren mononukleären Zellen getestet. Des Weiteren sollten Hinweise bezüglich des ablaufenden Signalwegs gewonnen werden, indem die Aktivitäten der Caspasen-3 und -9 untersucht wurden. Außerdem sollten die Substituentenmuster hinsichtlich ihrer wirksamen Komponenten anhand von Struktur-Wirkungs-Beziehungen analysiert werden.

3.1 Smac Mimetika: Proliferationsmodifikation von Tumorzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die zehn neu synthetisierten Substanzen LBPS-31-40 hinsichtlich ihrer antiproliferativen Wirkung auf maligne JM-Zellen untersucht.

Hierzu wurden, nachdem die Zellen mit den Substanzen in der Konzentration von 10 μM für 24-96 Stunden inkubiert wurden, alle 24 Stunden die Zellüberlebensrate relativ zur DMSO Kontrolle bestimmt. Die Substanz LBPS-31 war in DMSO nicht löslich, daher wurden mit dieser Substanz keine weiteren Bestimmungen durchgeführt (Carosati et al., 2015). Bereits nach 72 Stunden Inkubationszeit konnte ein deutlicher Einfluss auf das Zellüberleben durch die Substanzen LBPS-38, LBPS-39 sowie LBPS-40 gezeigt werden. Nach 96-stündiger Inkubation nahm dieser Einfluss noch weiter zu. Abbildung 8 zeigt die relativen Zellzahlen in Bezug zur DMSO Kontrolle nach bis zu 96 Stunden Inkubation für die Substanzen LBPS-32-40 sowie LBPS-01 und das kommerzielle Smac-Mimetikum AT-406. Bei LBPS-01 handelt es sich um die Ausgangssubstanz, die Vorlage für das Screening einer kommerziellen Datenbank war. Die Substanzen LBPS-31-40 sind Teil der insgesamt 31 detektierten Substanzen. LBPS-01 wurde in Vorarbeiten bereits als antiproliferativ wirksam ermittelt (van den Höfel and H. E. and Mahotka, 2014). Deutlich zu erkennen ist, dass die Substanzen LBPS-38-40 eine direkte Reduzierung der Zellzahlen hervorrufen und damit einen eindeutigen Effekt auf die Proliferation der malignen Zellen haben. So wurden nach 96 Stunden Inkubation die Zellzahlen durch LBPS-38 um $91,5 \pm 9,9 \%$ reduziert. Für LBPS-39 lag die Reduktion bei $86,3 \pm 18,5 \%$, sowie für LBPS-40 bei $88,8 \pm 7,7 \%$ jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Ebenso sind der deutliche Einfluss der Substanz LBPS-01 und der fehlende Einfluss von AT-406 ohne zusätzlichen Induktor gezeigt.

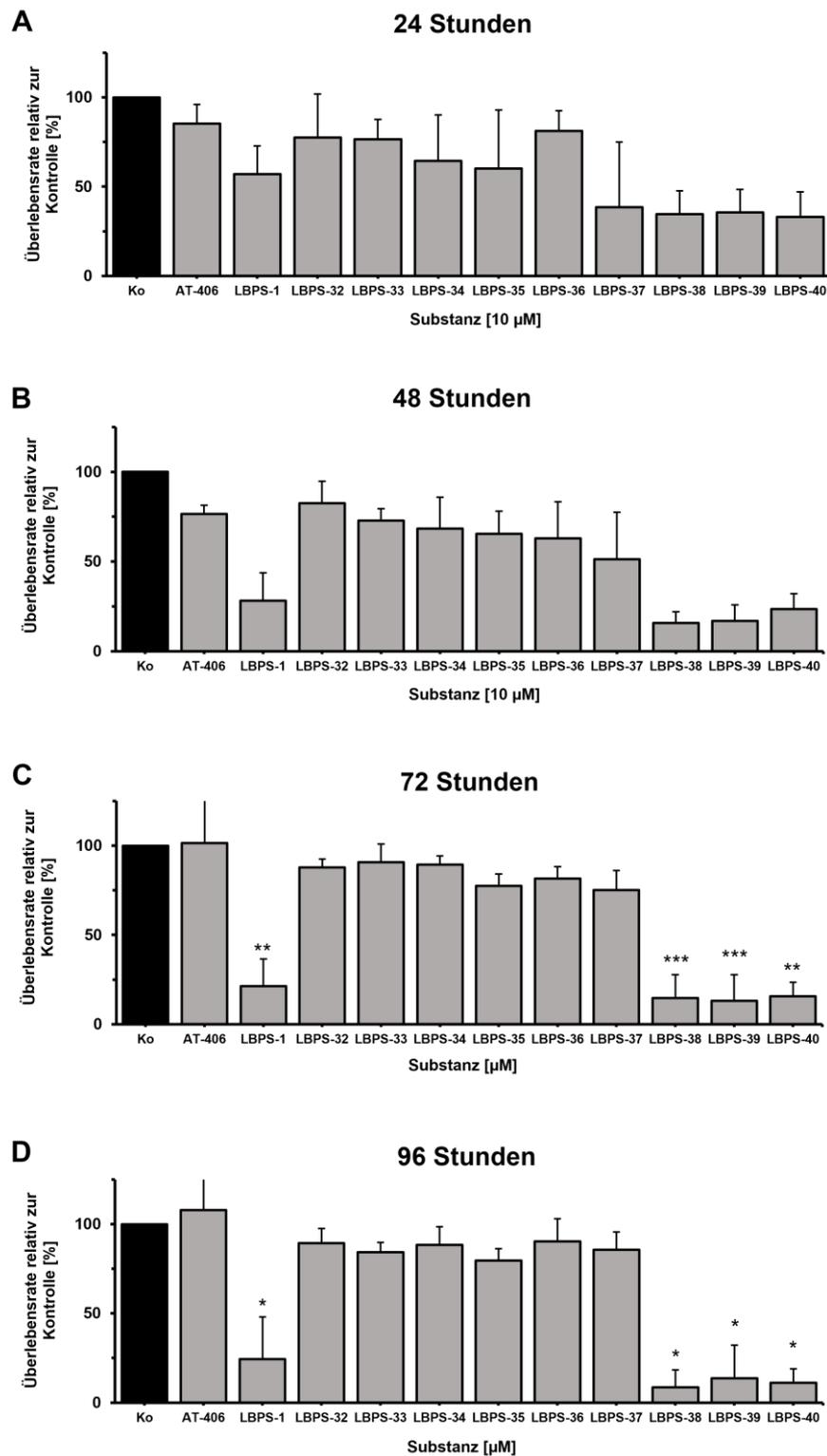


Abb. 8 - Wirkung von AT-406 sowie der Smac-Mimetika LBPS-01 und LBPS-32-40 auf die relative Überlebensrate von JM Zellen. Die Inkubation der malignen Zellen erfolgte in einer Substanzkonzentration von 10 µM über 24-96 h. Alle 24 h erfolgte die Ermittlung der Überlebensrate relativ zur Kontrolle mittels Durchflusszytometrie. Eine signifikante Abnahme der Überlebensraten war ab 72-stündiger Behandlung (C und D) bei den Substanzen LBPS-01 sowie LBPS-38-40 festzustellen. A 24 Stunden, B 48 Stunden, C 72 Stunden, D 96 Stunden. (Ko = Kontrolle; * = $p < 0,05$ signifikant; ** = $p < 0,01$ sehr signifikant; *** = $p < 0,005$ hoch signifikant). $n \geq 3$.

3.1.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte von LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40

Um eine Aussage zur klinischen Relevanz der untersuchten Substanzen zu treffen, wurden die drei Substanzen, die bei den Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung der Proliferation einen Effekt zeigten, hinsichtlich ihrer IC₅₀-Werte untersucht. Dafür wurden die JM Zellen jeweils für 96 h mit den drei zu testenden Substanzen LBPS-38-40 in definierten Konzentrationen zwischen 0,1 und 25 µM inkubiert und deren Überlebensraten relativ zur Kontrollgruppe per Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte anschließend grafisch anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven. Nachfolgend sind sowohl die Dosis-Wirkungskurven der einzelnen Substanzen als auch die daraus ermittelten IC₅₀-Werte abgebildet (Carosati et al., 2015).

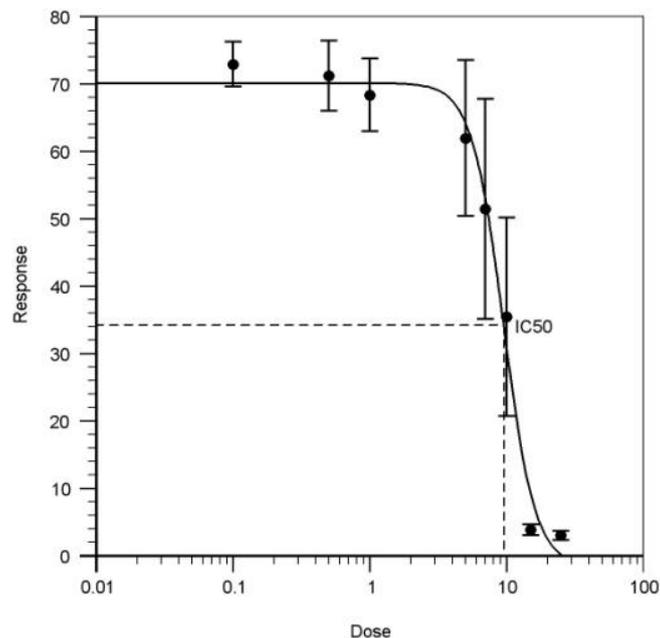


Abb. 9 – Dosis-Wirkungs-Kurve von LBPS-38. Für die Ermittlung der Kurve wurde das Online-Tool von AAT Bioquest® genutzt. Die Bestimmung der Werte erfolgte in drei unabhängigen Versuchsreihen.

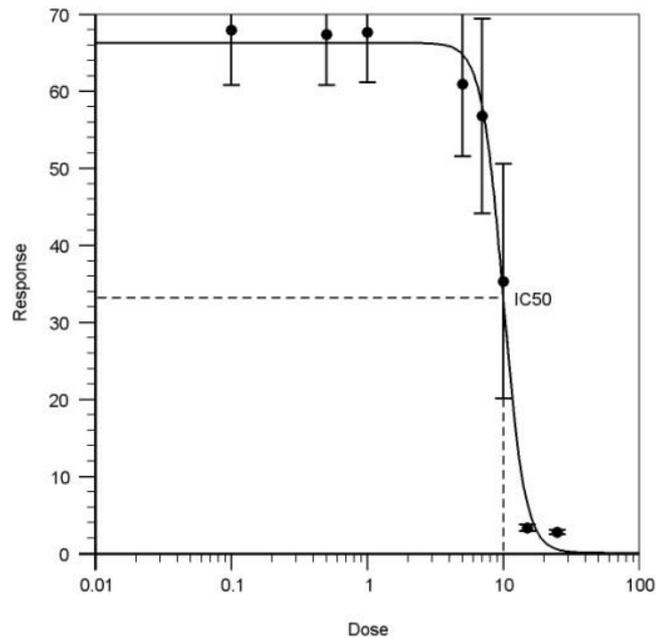


Abb. 10 – Dosis-Wirkungs-Kurve von LBPS-39. Für die Ermittlung der Kurve wurde das Online-Tool von AAT Bioquest® genutzt. Die Bestimmung der Werte erfolgte in drei unabhängigen Versuchsreihen.

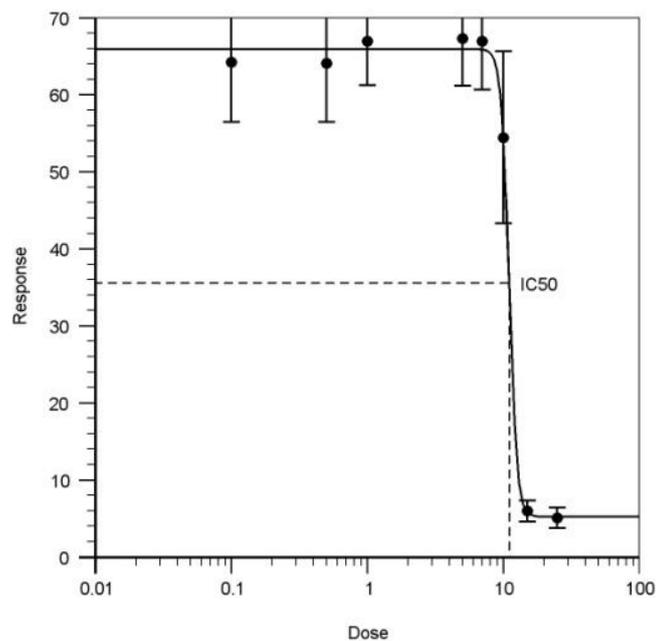


Abb. 11 – Dosis-Wirkungs-Kurve von LBPS-40. Für die Ermittlung der Kurve wurde das Online-Tool von AAT Bioquest® genutzt. Die Bestimmung der Werte erfolgte in drei unabhängigen Versuchsreihen.

Tabelle 2 - IC50 Werte von LBPS-38, -39 und -40 ermittelt mittels oben gezeigter Dosis-Wirkungskurven. Die Durchführung der zur Ermittlung der Werte notwendigen Untersuchung erfolgte in drei unabhängigen Versuchsreihen.

Substanz	LBPS-38	LBPS-39	LBPS-40
IC50 Wert [μM]	9,5	10,0	11,0

3.2 Wirkung der Substanzen LBPS-38-40 auf native T-Lymphozyten

Um zu überprüfen, ob es sich bei den zuvor gezeigten Effekten auf maligne JM Zellen um spezifische Effekte handelt, sollte getestet werden, ob die drei wirksamen Substanzen auch auf native T-Lymphozyten aus PBMCs eine antiproliferative Wirkung haben. Dafür wurden die eigenhändig isolierten Zellen mit den Substanzen LBPS-38-40 in einer Konzentration von 10 μM für einen Zeitraum von 24-96 h inkubiert und nach jeweils 24 h mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihrer Überlebensraten relativ zur Kontrollgruppe (10 μM DMSO) vermessen.

Anhand der in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse ist zu erkennen, dass keine der neu getesteten Substanzen einen negativen Einfluss auf die Überlebensraten im Vergleich zur Kontrollgruppe hat. Die Zellüberlebensraten liegen allesamt über 100% im Vergleich zur DMSO Kontrolle, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind hier maximal geringe Effekte möglich.

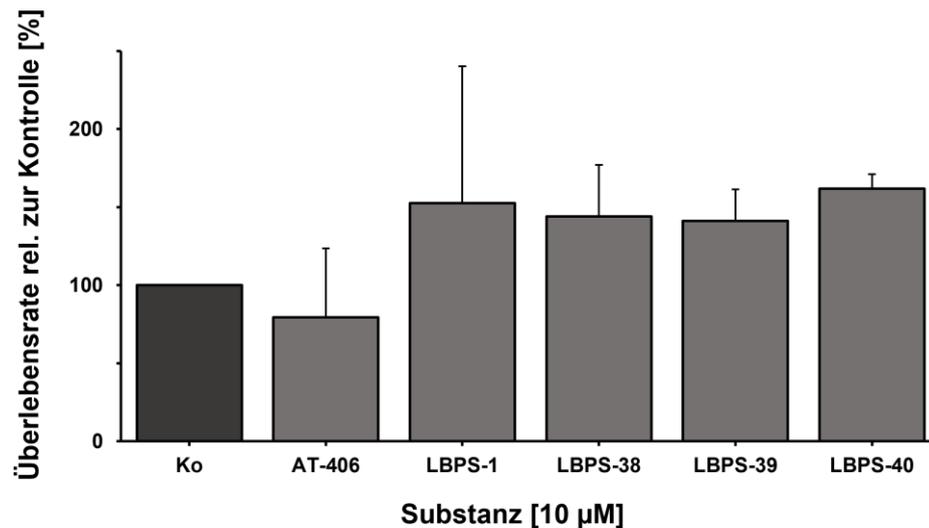


Abb. 12 – Wirkung von AT-406 sowie der Smac-Mimetika LBPS-01 und LBPS-38-40 auf die relative Überlebensrate von gesunden aus Vollblut isolierten T-Lymphozyten. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei einer Substanzkonzentration von 10 µM über 96 h. Die Auszählung der Lebendzellzahlen erfolgte per automatisiertem CellCounter (BioRad), die Berechnung der Überlebensraten relativ zur DMSO Kontrolle. Es zeigte sich bei allen getesteten Substanzen keine Abnahme der Überlebensrate. $n \geq 3$.

3.3 Caspase-Aktivität

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Smac-Mimetika handelt es sich um IAP-Antagonisten. Durch Bindung und damit Inhibition der hemmenden IAP soll den Zellen folglich die Fähigkeit zur Apoptose zurückgegeben werden. Die Untersuchung der Aktivierung der Caspasen-3 und -9 soll Hinweise auf einen möglichen apoptotischen Wirkmechanismus geben. Dafür wurde die Aktivität der Caspasen nach direkter Fluoreszenzmarkierung der aktivierten Caspasen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Aktivitäten der Initiatorcaspase-9 zeigt Abbildung 13. Hier ist ein eindeutiger Anstieg der Aktivität für die Substanzen LBPS-38 und LBPS-39 zu verzeichnen. LBPS-38 weist mit $13,9 \pm 3,7$ % nach 48 h Inkubation die höchste Aktivität auf. Und auch LBPS-39 zeigt nach 72 h eine deutliche Zunahme der Aktivität auf $10,5 \pm 2,7$ %.

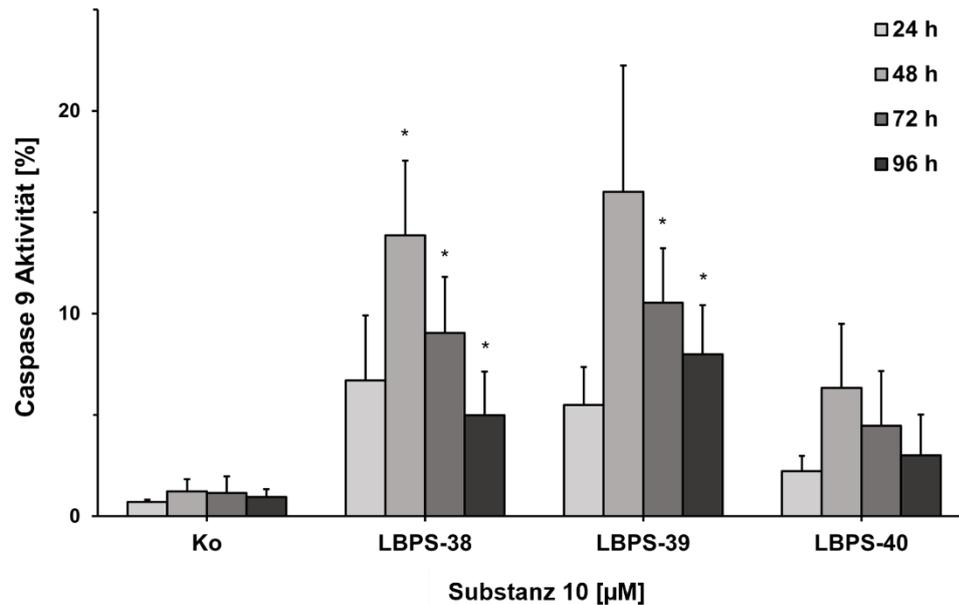


Abb. 13 – Relative Caspase-9 Aktivität in JM Zellen nach Inkubation mit den jeweiligen Smac-Mimetika. Die malignen JM Zellen wurden über einen Zeitraum von 24-96 h mit den Substanzen LBPS-38-40 in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO in 0,1%iger Konzentration. Nach Inkubation wurde die Aktivität der Caspase-9 mittels Partec® Durchflusszytometrie bestimmt. Mittelwert + STABW; n≥3. Ko = Kontrolle; * = p < 0,05 signifikant.

In Abbildung 14 sind die Aktivitäten der Caspase-3 dargestellt. Alle drei Wirkstoffkandidaten zeigen einen deutlichen Anstieg der Aktivität nach 48 h Inkubation. Die stärkste Aktivität und auch höchste Signifikanz weist LBPS-39 mit einer Caspaseaktivität von $20,1 \pm 2,7$ % nach 48 h auf. Die geringste gesamte Aktivität zeigt LBPS-40 mit einer maximalen Aktivität von $7,6 \pm 2,2$ % nach 72 h. Aber auch dies stellt einen Anstieg der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe dar, die nach 96 h eine maximale Aktivität von $2,8 \pm 0,9$ % aufwies.

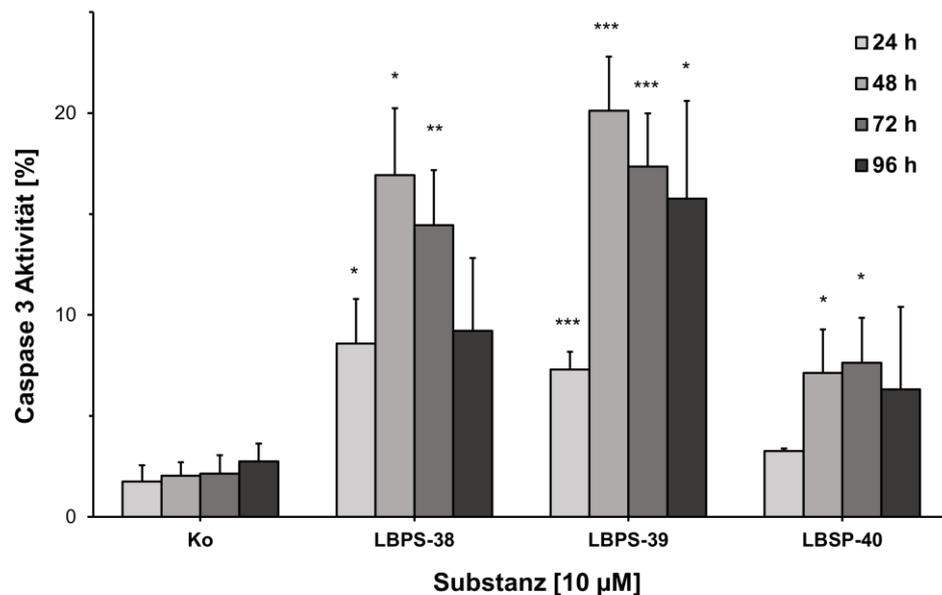


Abb. 14 - Relative Caspase-3 Aktivität in JM Zellen nach Inkubation mit den jeweiligen Smac-Mimetika. Die malignen JM Zellen wurden über einen Zeitraum von 24-96 h mit den Substanzen LBPS-38-40 in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO in 0,1%iger Konzentration. Nach Inkubation wurden die Aktivitäten der Caspase-3 mittels Partec® Durchflusszytometrie bestimmt. Mittelwert + STABW; n≥3. Ko = Kontrolle; * = p < 0,05 signifikant; ** = p < 0,01 sehr signifikant; *** = p < 0,005 hoch signifikant).

3.4 Nicoletti-Assay, Apoptoserate

Um einen weiteren Hinweis bezüglich eines apoptotischen Signalwegs zu erhalten, wurde der relative Anteil an Zellen mit einem hypoploiden DNA-Gehalt, der aus einer gerichteten Degradation der DNA während der Apoptose resultiert und damit für einen apoptotischen Signalweg sprechen würde, nach der Nicoletti-Methode durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden die JM Zellen mit den Substanzen LBPS-38-40 behandelt und für einen Zeitraum von 24-96 h inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils nach 24 h die Lyse der Zellen mit Propidiumiodid-Lysepuffer und die durchflusszytometrische Messung. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Messungen nach 48 sowie 72 Stunden dargestellt.

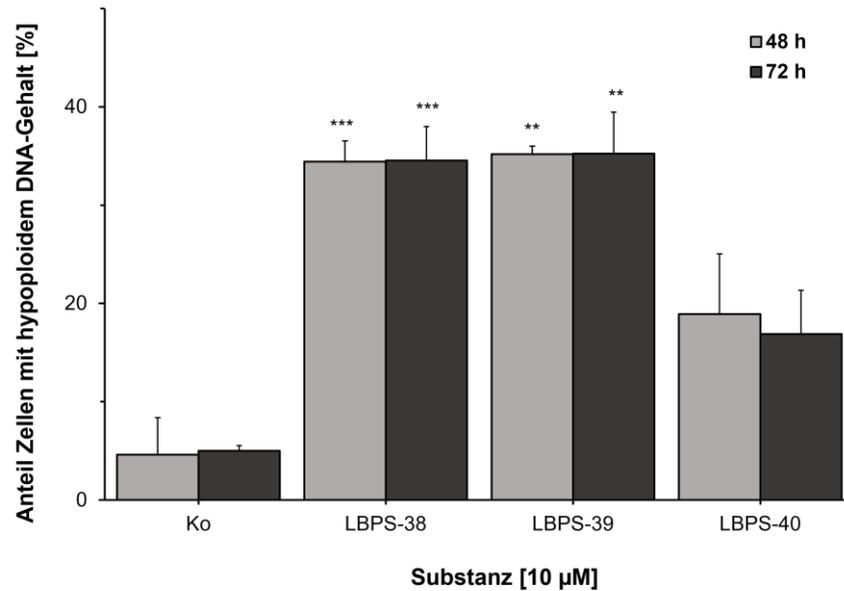


Abb. 15 – Anteil an Zellen mit hypoploidem DNA-Gehalt relativ zur Kontrolle nach Behandlung mit den Substanzen LBPS-38-40. Per Durchflusszytometrie wurde hier der Anteil an Zellen in Relation zur Kontrolle bestimmt, der nach Inkubation mit den Testsubstanzen einen hypoploiden DNA-Gehalt aufweist (Sub G1 Peak, Nicoletti-Methode). Die Bestimmung erfolgte jeweils nach 48 und 72 h Inkubation. Mittelwert \pm STABW; $n \geq 3$; ** = $p < 0,01$ sehr signifikant; *** = $p < 0,005$ hoch signifikant.

4 Diskussion

Der Begriff Leukämie fasst eine Vielzahl von malignen Neoplasien hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen zusammen, die allesamt zum Tode führen können (Siegel et al., 2017). In den letzten Jahren sind die Überlebensraten signifikant gestiegen aufgrund der Entwicklung von individuellen Chemotherapien und der *biological-targeted therapy*. Dennoch bleibt die hohe Rate an Therapieresistenzen eine große Herausforderung für die Forschung (Feldmann et al., 2017). Wie in vielen Tumoren bilden die Fehlregulation von Zelltod-Signalwegen als auch die mangelnde Fähigkeit chemotherapie-induzierte Apoptose zu begehen Hauptmechanismen für die Therapieresistenz der akuten lymphatischen Leukämie (Fulda, 2009b).

Hier bieten Smac-Mimetika, die als IAP-Antagonisten wirken, eine Option. Ein gutes Beispiel für ein erfolgreiches Smac-Mimetikum ist Birinapant, welches sich bereits in klinischen Studien für die Therapie von Ovarialkarzinomen befindet (Morrish et al., 2020).

In dieser Arbeit wurden zehn potenzielle Smac-Mimetika hinsichtlich ihrer antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung untersucht.

4.1 Drei wirksame Substanzen LBPS-38-40

Von den zehn zu testenden Substanzen LBPS-31-40 konnten nur neun Substanzen den geplanten Proliferationsassays zugeführt werden, da die Substanz LBPS-31 weder in wässrigen Lösungen noch in 100% DMSO zu lösen war. Von den neun Substanzen zeigten die Substanzen LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40 einen signifikanten bis hoch signifikanten antiproliferativen Effekt gegenüber Tumorzellen in einer Substanzkonzentration von 10 μM (vgl. Kapitel 3.1) (Carosati et al., 2015). So wurden nach 96 Stunden Inkubation die Zellzahlen durch LBPS-38 um $91,5 \pm 9,9$ % reduziert, für LBPS-39 lag die Reduktion bei $86,3 \pm 18,5$ %, sowie für LBPS-40 bei $88,8 \pm 7,7$ % jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die übrigen Substanzen zeigten keinen antiproliferativen Effekt in der Substanzkonzentration von 10 μM . Daher wurde

von weitergehenden Untersuchungen der wenig potenten Kandidaten abgesehen. Als Vergleichssubstanzen dienten das kommerziell erhältliche Smac-Mimetikum AT-406 sowie die Ausgangsubstanz der hier getesteten Substanzen LBPS-01. Für LBPS-01 wurde in den Masterarbeiten von Frau N. van den Höfel und Frau J. Stevens bereits sowohl für JM Zellen als auch für ClearCa 2, HepG2 und HCT116 Zellen eine signifikante Induktion des Zelltods beschrieben. Der mangelnde antiproliferative Effekt von AT-406 in einer Konzentration von 10 μM auf die untersuchten JM Zellen deckte sich ebenfalls mit den Beobachtungen von Frau van den Höfel. Studien an soliden Tumoren hingegen hatten IC_{50} -Werte für AT-406 im nanomolaren Bereich gezeigt (Cai et al., 2011).

Alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurden fortan mit den Substanzen LBPS-38-40 durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden jeweils für 96 Stunden durchgeführt, da ein solcher zeitverzögerter Effekt bereits für AT-406 beschrieben wurde (Lu et al., 2014).

Um die Relevanz für klinische Studien einschätzen zu können, wurden die IC_{50} -Werte für LBPS-38-40 ermittelt. Sämtliche IC_{50} -Werte lagen mit 9,5 μM für LBPS-38, 10,0 μM für LBPS-39 und 11,0 μM für LBPS-40 im unteren mikromolaren Bereich und machen sie daher für klinische Studien interessant. Beispielsweise besitzt das kommerziell erhältliche Smac-Mimetikum LCL161 (Abb. 16) von Novartis, welches in B-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als Einzeltherapie eine antiproliferative Wirkung zeigt, ähnliche IC_{50} -Werte wie die in dieser Arbeit getesteten Substanzen (Weisberg et al., 2010).

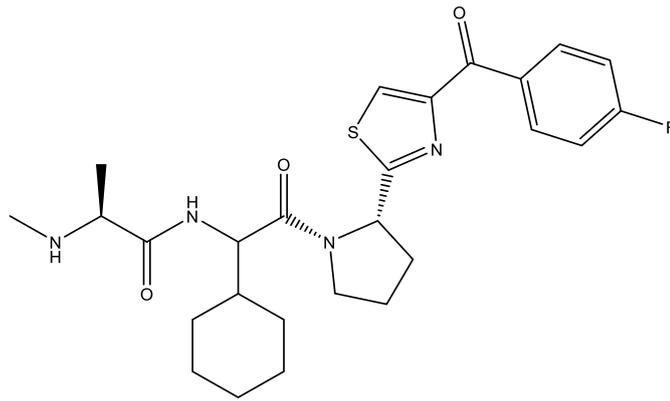


Abb. 16 - LCL161: Kommerzieller IAP-Antagonist. Strukturformel des kommerziellen IAP-Antagonisten LCL161. Das Molekulargewicht beträgt 500,63 g/mol.

In der Zelllinie Hep3B (humanes hepatozelluläres Karzinom) weist LCL161 als Einzelsubstanz einen IC_{50} von 10-19 μM auf (Chen et al., 2012). Für Birinapant wurde gezeigt, dass es als Einzelsubstanz auf Melanom-Zellen nur einen geringen Effekt ausübt mit hohen IC_{50} -Werten. In Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ konnten hingegen IC_{50} -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich ermittelt werden (Krepler et al., 2013). Allein für die Substanz GDC-0152 (Abb. 17) bestimmten Hu et al. 2014 IC_{50} -Werte in humanen Leukämiezellen im nanomolaren Bereich (Hu et al., 2015).

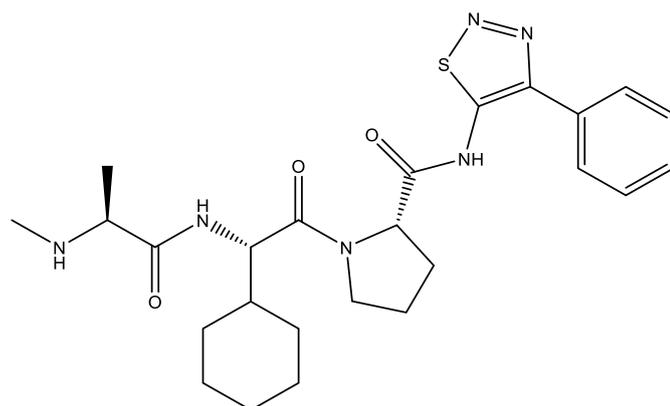


Abb. 17 - GDC-0152: Kommerzieller IAP-Antagonist. Strukturformel des kommerziellen IAP-Antagonisten GDC-0152. Das Molekulargewicht beträgt 498,64 g/mol.

Die IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit getesteten Substanzen liegen im unteren mikromolaren Bereich, für klinische Studien schon relevant, allerdings wäre die Senkung der IC₅₀-Werte durch Kombinationstherapien beispielsweise mit TNF α oder anderen Chemotherapeutika wünschenswert (Carosati et al., 2015).

4.2 Keine Wirkung auf native T-Lymphozyten

Neben einer effizienten Induktion der Apoptose in Tumorzellen muss ein potenzielles Chemotherapeutikum spezifisch an Tumorzellen binden, um gesunde Gewebe zu schonen. Um die spezifische Wirkung der untersuchten Substanzen auf Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Substanzen an nativen T-Lymphozyten getestet. Diese wurden zuvor aus Vollblut isoliert und kultiviert. Es zeigte sich, dass die drei zuvor bei JM Zellen als hochwirksam antiproliferativ getesteten Substanzen LBPS-38-40 keinen antiproliferativen Effekt auf native T-Lymphozyten ausübten (vgl. Kapitel 3.2). Die durchschnittlichen Überlebensraten relativ zur DMSO-Kontrolle lagen allesamt über 100%. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sind hier maximal geringe Effekte möglich. Die relativ hohen Standardabweichungen könnten bei gepoolten Blutkonserven spenderspezifischen Ursprungs sein.

Die hier durchgeführten Untersuchungen entsprechen nur bedingt den Bedingungen *in vivo*, da den aus Vollblut gewonnen T-Zellen zur Proliferationsanregung IL-2 und Concanavalin A zugefügt wurde, dennoch zeichnen sie Hinweise für eine spezifische Bindung der getesteten Substanzen ab.

Einen mangelnden Einfluss auf native Zellen geben auch erste humane *in vivo* Studien wieder. Für acht Smac-Mimetika konnte eine gute Akzeptanz bei vorhandener Anti-Tumor-Aktivität gezeigt werden (Morrish et al., 2020). Die Smac-Mimetika wiesen keinen toxischen Effekt auf gesunde Gewebe auf. Gänzlich verstanden ist der Grund dafür noch nicht, allerdings besteht der Verdacht, dass die sehr spezifische Interaktion mit dem IAP-Signalweg ursächlich dafür ist und damit im Gegensatz zu Chemotherapeutika steht, die mit mehreren Signalwegen interagieren (Hannan et al., 2013, Bywater et al., 2012). Ein gerichteter Therapieansatz scheint vielversprechend um uner-

wünschte Arzneimittelwirkungen der etablierten Verfahren für Patienten zu minimieren.

4.3 Caspase-Aktivierung

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen stellen Smac-Mimetika, also pan-selektive IAP-Antagonisten dar. Sie sollen somit die Aktivität der inhibierten Caspasen wiederherstellen. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aktivierung der Caspasen-3 und -9 bestimmt (vgl. Kapitel 3.3). Alle drei Wirkstoffkandidaten zeigten einen deutlichen Anstieg der Aktivitäten sowohl der Caspase-3 als auch von Caspase-9 nach 48 h. Die stärkste Aktivität der Caspase-3 wies LBPS-39 mit $20,1 \pm 2,7$ % nach 48 h auf. Die geringste gesamte Aktivität zeigte LBPS-40 mit einer maximalen Aktivität von $7,6 \pm 2,2$ % nach 72 h. Aber auch dies stellte einen Anstieg der Caspaseaktivität für die Caspase-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe dar, die nach 96 h eine maximale Aktivität von $2,8 \pm 0,9$ % aufwies.

Die Aktivierung der Caspasen insbesondere bei den Substanzen LBPS-38 und LBPS-39 spricht für die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs. Dabei sind beide Caspasen wichtige Bestandteile sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalwegs (vgl. Kapitel 1.3). Die Aktivierung der Caspasen durch LBPS-40 ist deutlich geringer, daher lässt dies auf einen anderen Signalweg schließen als die Apoptose. In einem weiteren Experiment wurde daher die Apoptoseinduktion bestimmt (s. Abschnitt 4.4).

Auch für GDC-0152 wurde die Aktivierung der Caspasen-3 und -9 bestätigt. Hu et al. kultivierten humane Leukämiezellen neben GDC-0152 mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK. Letzterer verhinderte die Inhibition der Zellproliferation durch GDC-0152. Dies legt einen Wirkmechanismus über eine Caspase-abhängige Apoptose nahe (Hu et al., 2015). Ein Wirkmechanismus über einen apoptotischen Signalweg wäre wünschenswert, da hier die inflammatorische Reaktion des umgebenden Gewebes minimal gehalten wird.

4.4 Apoptose-Induktion

Zur weiteren Differenzierung, ob es sich bei der Proliferationsbeeinflussung tatsächlich um die Induktion des apoptotischen Signalwegs handelt, wurde mittels Propidiumiodid-Methode der Zellanteil untersucht, der in der Durchflusszytometrie einen hypoploiden DNA-Gehalt in Form eines SubG1-Peaks aufwies. Dies gilt als Zeichen für die Apoptose (Nicoletti et al., 1991). Die Bestimmung erfolgte jeweils nach 48 und 72 h Inkubationszeit. Sowohl die Substanz LBPS-38 als auch LBPS-39 zeigte eine signifikante Verschiebung in Richtung SubG1 (vgl. Kapitel 3.4). Die Substanz LBPS-40 zeigte eine deutlich geringere Zunahme des hypoploiden Anteils. Für LBPS-38 und -39 liegt damit ein apoptotischer Signalweg nahe. Die Substanz LBPS-40 induziert in Zusammenschau mit der geringeren Caspaseaktivierung den Zelltod höchwahrscheinlich über einen anderen als den apoptotischen Signalweg. Dies bedarf weiterer Untersuchungen, um zu differenzieren, ob es sich um eine gewünschte Arzneimittelreaktion oder eine unerwünschte toxische Reaktion handelt.

Letztlich ist die Form des Zelltods, der durch Smac-Mimetika induziert wird, nicht abschließend geklärt. Miles et al. vermuten, dass eine Exposition gegenüber hohen Smac-Mimetika-Konzentrationen vielmehr zu einer Zelllyse führen als einen apoptotischen oder nekroptotischen Signalweg zu induzieren (Miles et al., 2020).

Mrkvová et al. hingegen zeigten in ihren Untersuchungen, dass für die Auslösung des Zelltods FADD und mindestens eine der Effektorcaspasen-3, -6, -7 essenziell sind. Zudem zeigten sie, dass eine Kombination von LCL161 mit TNF α die Wirkung des Smac-Mimetikums deutlich verstärkt. In WT-Zellen findet eine Apoptose statt, knockout-Zellen für FADD und Caspasen-3, -6, und -7 sterben mittels RIP1-vermittelter Nekroptose (Mrkvová et al., 2021). Diese Untersuchungen decken sich auch mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen für Hinweise zur Induktion der Apoptose für LBPS-38 und -39. Die Apoptose-Resistenz ist ein häufiges therapeutisches Problem im Rahmen der Krebstherapie (Chumduri et al., 2015). Daher repräsentiert die Nekroptose eine alternative Strategie um den Zelltod zu induzieren (Su et al., 2016). Koch

et al. zeigten, dass die Behandlung von Burkitt-Lymphom Zellen mit dem Smac-Mimetikum BV6 in Kombination mit TRAIL zur Induktion der Nekroptose führte, wenn die Caspasen inhibiert waren. Sie konnten auch für weitere Smac-Mimetika (AT-406, LCL-161 und Birinapant) die Nekroptose in Burkitt-Lymphom Zellen nachweisen und damit die Beteiligung des IAP-Antagonismus an nekroptotischen Signalwegen bestätigen (Koch et al., 2021). Dies steht im Einklang mit vorhergehenden Studien, die zeigten, dass die IAP-Antagonisierung durch Smac-Mimetika zur Nekroptose-Induktion in Zellen einer Akuten Myeloischen Leukämie sowie Zellen eines Pankreaskarzinoms führen, wenn die Caspasen blockiert sind (Safferthal et al., 2017).

4.5 Struktur-Wirkungsbeziehung

Um die essenziellen strukturellen Elemente der wirksamen Smac-Mimetika zu charakterisieren, wurden die chemischen Strukturen der drei wirksamen Testsubstanzen in einer kurzen Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung mit der Muttersubstanz LBPS-01 verglichen (siehe Abb. 18). Die Struktur von LBPS-01 zeichnet sich durch ein offenkettiges Acetohydrazon aus (siehe schwarze Strukturbereiche in Abb. 18). Dieses zentrale Hydrazon von LBPS-01 ist über das ungesättigte Stickstoffatom mit einem bicyklischen N-(2-ortho-benzyloxy)-benzyliden-Substituenten verknüpft (siehe graue Strukturbereiche in Abb. 18). Das carbonylseitige Ende des Acetohydrazons ist in LBPS-01 durch einen Thioether mit einem heterozyklischen 1,2,4,-triazin-3,5-(2H,4H)-dion versehen (siehe blaue Strukturbereiche in Abb. 18).

Aus der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Durchmusterung von neun Substanzen hinsichtlich einer Apoptose-aktivierenden Wirkung, zeigten die Substanzen LBPS-38, LBPS-39 und LPBS-40 erhöhte Wirkungen gegenüber LBPS-01. Alle Strukturen dieser vier wirksamen Substanzen präsentieren als gemeinsames Motiv den sterisch anspruchsvollen ortho-benzyloxy-phenyl-Substituenten N-ständig am Hydrazon (vgl. graue Molekülbereiche in Abb. 18) (Carosati et al., 2015). Monozyklische Substituentenmuster in diesem Molekülbereich hatten ausschließlich zu schlechteren Wirkungen geführt.

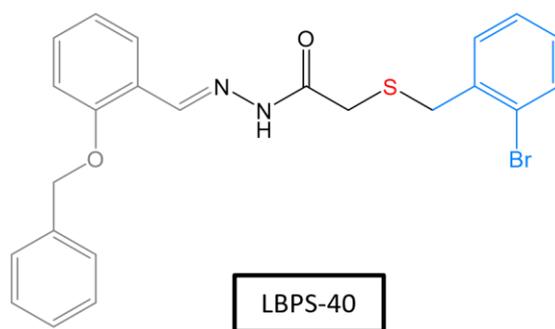
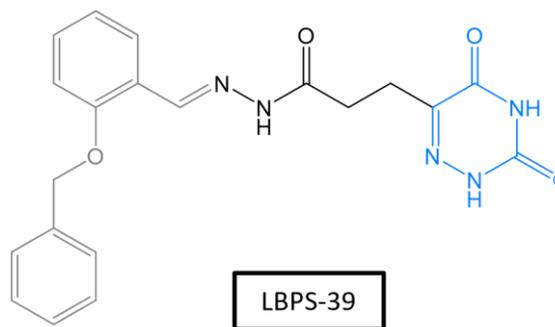
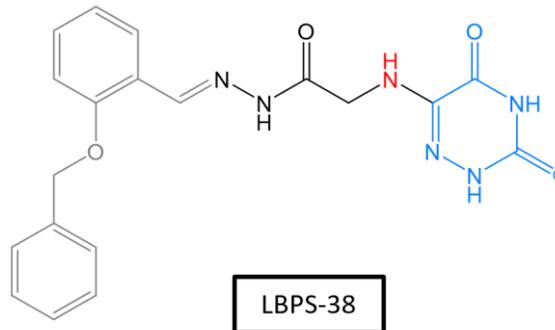
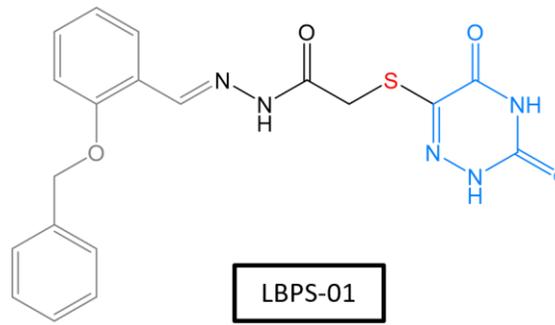


Abb. 18 – Struktur-Wirkungsbeziehung von wirksamen Smac-Mimetika. Vergleich der chemischen Strukturen der Muttersubstanz LBPS-01 und der wirksamen Substanzen LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40. Wichtige Molekülbereiche sind farblich dargestellt in schwarz (Acetohydrazone), grau (N-(2-ortho-benzyloxy)-benzyliden), blau (1,2,4-Triazin-3,5-(2H,4H)-dion oder ortho-Bromphenyl) und die Substitution des Moleküls zur Verknüpfung des Heterozyklus ist in rot markiert (S, N oder C). (Daten zur Wirkung der Substanzen sind in Kapitel 3 beschrieben).

Offenbar vermittelt das hier beschriebene Strukturmotiv mit zwei aromatischen Ringen als essenzielles Element einen wichtigen Beitrag zur Bindung an das Zielprotein. Vermutlich werden dabei hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet, die nur unter Einsatz von zwei im Vergleich zu einer Phenyl- oder Benzylgruppen entstehen und notwendig sind (vgl. nicht-wirksame Substanzen Abb. 6).

Die als wirksam getesteten Substanzen unterscheiden sich im Atom, welches zur Verknüpfung des Heterozyklus am carbonylständigen Ende des Acetohydrazons (vgl. rote Markierung in Abb. 18) dient. So führte die Substitution des Thioether-Schwefelatoms (LBPS-01) zu einer 3,3-fachen Wirkung durch Einsatz eines sekundären Amins (LBPS-38) und zu einer 4,8-fachen Aktivität durch Einsatz einer Methylgruppe (LBPS-39) (Carosati et al., 2015). Diese Beobachtung legt nahe, dass an dieser Molekülposition offenbar keine Wasserstoffbrückenbindung wirkungsverstärkend mit dem Zielprotein ausgebildet wird. Möglicherweise ist der Zugang zur Substratbindung in diesem Bereich durch einen sterisch anspruchsvollen und elektronenreichen Aminosäurerest limitiert. Außerdem könnten bei diesem Vergleich der Linkeratome auch Einflüsse auf die Elektronendichte im benachbarten Heterozyklus zu tragen kommen. Je weniger freie Elektronenpaare an dieser Position präsentiert werden, umso stärker nimmt die Aktivierung der Wirkung zu.

In Bezug auf den Heterozyklus wurde anhand des Vergleichs von LBPS-01 mit der Substanz LBPS-40 eine weitere wichtige Erkenntnis gewonnen. In LBPS-40 wurde der Triazindion-Heterozyklus durch eine aromatische *ortho*-Brom-Phenylgruppe ersetzt und in der Durchmusterung wurde diese Substanz mit einer 2,2-fachen Wirkung im Vergleich zu LBPS-01 primär als wirksam befunden (Carosati et al., 2015). Die Aktivierung der Apoptose und der Caspasen fand jedoch nicht im gleichen Ausmaß statt wie mit LBPS-38 und LBPS-39, deren Strukturen weiterhin den Heterozyklus aufwiesen (vgl. Kapitel 3.3, 3.4). Aus diesen Erkenntnissen kann abgeleitet werden, dass der *ortho*-Brom-Phenylsubstituent zu einer unselektiven Induktion des Zelltodes führt. Vermutlich werden andere Zielproteine unspezifisch aktiviert. Es liegt daher nahe, dass der in LBPS-38, LBPS-39 und in der Muttersubstanz LBPS-01

enthaltene Triazindion-Heterozyklus als konserviertes Element für eine spezifische Induktion der Apoptose im Sinne einer Wirkung eines Smac-Mimetikums vorliegen muss. Weiterführende Untersuchungen könnten sterisch und elektronisch vergleich-bare Substanzen umfassen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit fanden sich für die drei proliferationshemmenden Smac-Mimetika LBPS-38, LBPS-39 und LBPS-40 Hinweise auf den durch sie ausgelösten Signalweg. Für LBPS-38 und LBPS-39 sprechen sowohl die Induktion der Caspasen als auch die Degradation der DNA für einen apoptotischen Signalweg. Da die Ergebnisse für LBPS-40 eine geringere Aktivität der Caspasen sowie nur eine geringe Verschiebung Richtung hypodiploidem DNA-Gehalt (SubG1Peak) zeigten, liegt hier ein anderer als der apoptotische Signalweg nahe. Hierbei könnte es sich um einen nekroptotischen Signalweg handeln. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Dafür könnte der Einfluss dieser Smac-Mimetika auf Caspase-defiziente Zellen getestet werden wie bereits für LCL161 durch Mrkvová et al. geschehen.

Die bessere Verträglichkeit der Substanzen sollte über die Senkung der IC₅₀-Werte erzielt werden. Dies ist höchstwahrscheinlich durch Kombinationstherapien erreichbar.

Das Smac-Mimetikum LCL161 wurde zur Wirkungsverstärkung mit Paclitaxel für die Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms kombiniert. Dies ergab eine erhöhte Expression von TNF, eine Degradation von cIAP1/2 und die Aktivierung des Caspase-8 abhängigen Signalwegs und machte die Tumorzellen so *in vitro* für die Therapie empfindlich (Yang et al., 2016). Auch für Birinapant sind aktuell Kombinationstherapien Gegenstand klinischer Studien. So werden aktuell Kombinationen mit Pembrolizumab für solide Tumoren und die Kombination mit Bestrahlung für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Bereichs getestet (NCT02587962, NCT03803774).

Bisher ist wenig über die Fähigkeit von Smac-Mimetika andere IAP außer XIAP und cIAP1/2 anzuvisieren bekannt. Daher ist es möglich, dass Veränderungen der chemischen Struktur neue Interaktionen mit anderen IAP möglich machen (Miles et al., 2020).

Zudem könnten sterisch und elektronisch vergleichbare Substanzen weiteren Screeninguntersuchungen zugeführt werden und auch die Synthese bivalenter Strukturen, die damit der homodimeren Struktur von Smac ähneln, wäre möglich.

Außerdem wäre die Kombination mit Substanzen denkbar, die die Bindung der Smac-Mimetika an XIAP nutzen können, um so in die Nähe ihres eigentlichen Zielproteins verbracht zu werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADAMS, J. M. & CORY, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-6.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. & HÄCKER, B. 2011. *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH-Verlag.
- ANTONSSON, B. & MARTINO, J.-C. 2000. The Bcl-2 Protein Family. *Experimental Cell Research*, 256, 50-57.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- BECKERT, W. H. & SHARKEY, M. M. 1970. Mitogenic activity of the jack bean (*Canavalia ensiformis*) with rabbit peripheral blood lymphocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 39, 337-41.
- BHATIA, S. & ROBISON, L. L. 1999. Epidemiology of leukemia and lymphoma. *Curr Opin Hematol*, 6, 201-4.
- BOLD, R. J., TERMUHLEN, P. M. & MCCONKEY, D. J. 1997. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol*, 6, 133-42.
- BYWATER, M. J., POORTINGA, G., SANIJ, E., HEIN, N., PECK, A., CULLINANE, C., WALL, M., CLUSE, L., DRYGIN, D., ANDERES, K., HUSER, N., PROFFITT, C., BLIESATH, J., HADDACH, M., SCHWAEBE, M. K., RYCKMAN, D. M., RICE, W. G., SCHMITT, C., LOWE, S. W., JOHNSTONE, R. W., PEARSON, R. B., MCARTHUR, G. A. & HANNAN, R. D. 2012. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*, 22, 51-65.
- 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. & 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. *J Med Chem*, 54, 2714-26.
- CAROSATI, E., VAN DEN HOFEL, N., REIF, M., RANDAZZO, G. M., STANITZKI, B., STEVENS, J., GABBERT, H. E., CRUCIANI, G., MANNHOLD, R. & MAHOTKA, C. 2015. Discovery of Novel, Potent, and Specific Cell-Death Inducers in the Jurkat Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *ChemMedChem*.
- CARSON, D. A. & RIBEIRO, J. M. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet*, 341, 1251-4.
- CARTER, B. Z., MILELLA, M., TSAO, T., MCQUEEN, T., SCHOBER, W. D., HU, W., DEAN, N. M., STEELMAN, L., MCCUBREY, J. A. & ANDREEFF, M. 2003. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 17, 2081-2089.
- CHAI, J., DU, C., WU, J. W., KYIN, S., WANG, X. & SHI, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406, 855-62.
- CHEN, K. F., LIN, J. P., SHIAU, C. W., TAI, W. T., LIU, C. Y., YU, H. C., CHEN, P. J. & CHENG, A. L. 2012. Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 84, 268-77.
- CHUMDURI, C., GILLISSEN, B., RICHTER, A., RICHTER, A., MILOJKOVIC, A., OVERKAMP, T., MÜLLER, A., POTT, C. & DANIEL, P. T. 2015. Apoptosis resistance, mitotic catastrophe, and loss of ploidy control in Burkitt lymphoma. *Journal of Molecular Medicine*, 93, 559-572.
- COHEN, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 (Pt 1), 1-16.

- CONRAD, M., ANGELI, J. P., VANDENABEELE, P. & STOCKWELL, B. R. 2016. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 15, 348-66.
- COOPER, G. M. 1997. *The Cell: A Molecular Approach*, ASM Press.
- COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E. 2009. *The Cell: A Molecular Approach*, ASM Press.
- COULTAS, L. & STRASSER, A. 2003. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*, 13, 115-23.
- DAVIS, A. S., VIERA, A. J. & MEAD, M. D. 2014. Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician*, 89, 731-8.
- DE KOUCHKOVSKY, I. & ABDUL-HAY, M. 2016. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*, 6, e441.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. & YUAN, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-67.
- DEGTEREV, A. & YUAN, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 378-90.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ESCHERICH, G. H., SCHRAPPE, MARTIN (KIEL), CREUTZIG, URSULA (HANNOVER) 2016. S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter *AWMF Online*.
- FELDMANN, F., SCHENK, B., MARTENS, S., VANDENABEELE, P. & FULDA, S. 2017. Sorafenib inhibits therapeutic induction of necroptosis in acute leukemia cells. *Oncotarget*, 8, 68208-68220.
- FULDA, S. 2009a. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia*, 23, 467-76.
- FULDA, S. 2009b. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*, 124, 511-5.
- FULDA, S. & DEBATIN, K. M. 2006. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for diagnosis and treatment of human diseases. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1, 81-9.
- FULDA, S. & VUCIC, D. 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 109-124.
- GALLUZZI, L., KEPP, O., CHAN, F. K. & KROEMER, G. 2017. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol*, 12, 103-130.
- GAO, Z., TIAN, Y., WANG, J., YIN, Q., WU, H., LI, Y. M. & JIANG, X. 2007. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem*, 282, 30718-27.
- GHOBRAL, I. M., WITZIG, T. E. & ADJEI, A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 55, 178-94.
- GIAM, M., HUANG, D. C. & BOUILLET, P. 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S128-36.
- GOLDAR, S., KHANIANI, M. S., DERAKHSHAN, S. M. & BARADARAN, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 2129-44.
- GOLSTEIN, P. 1998. Cell death in us and others. *Science*, 281, 1283.
- GUPTA, K., PHAN, N., WANG, Q. & LIU, B. 2018. Necroptosis in cardiovascular disease - a new therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol*, 118, 26-35.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

- HANNAN, R. D., DRYGIN, D. & PEARSON, R. B. 2013. Targeting RNA polymerase I transcription and the nucleolus for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 17, 873-8.
- HASSEN, S., ALI, N. & CHOWDHURY, P. 2012. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 3, 71-9.
- HENGARTNER, M. O. 2001. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104, 325-8.
- HEROLD, G. 2019. *Innere Medizin: 2020 : eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*, Herold, Gerd.
- HU, R., LI, J., LIU, Z., MIAO, M. & YAO, K. 2015. GDC-0152 induces apoptosis through down-regulation of IAPs in human leukemia cells and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway. *Tumour Biol*, 36, 577-84.
- KARP, G. 2009. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, John Wiley & Sons.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KHALADE, A., JAAKKOLA, M. S., PUKKALA, E. & JAAKKOLA, J. J. 2010. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health*, 9, 31.
- KHOSRAVI-FAR, R. & ESPOSTI, M. D. 2004. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*, 3, 1051-7.
- KHOURY, M. K., GUPTA, K., FRANCO, S. R. & LIU, B. 2020. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol*, 190, 272-285.
- KIPP, R. A., CASE, M. A., WIST, A. D., CRESSON, C. M., CARRELL, M., GRINER, E., WIITA, A., ALBINIAK, P. A., CHAI, J., SHI, Y., SEMMELHACK, M. F. & MCLENDON, G. L. 2002. Molecular Targeting of Inhibitor of Apoptosis Proteins Based on Small Molecule Mimics of Natural Binding Partners. *Biochemistry*, 41, 7344-7349.
- KOCH, A., JEILER, B., ROEDIG, J., VAN WIJK, S. J. L., DOLGIKH, N. & FULDA, S. 2021. Smac mimetics and TRAIL cooperate to induce MLKL-dependent necroptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. *Neoplasia*, 23, 539-550.
- 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. & HERLYN, M. 2013. The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 19, 1784-94.
- KROEMER, G., DALLAPORTA, B. & RESCHE-RIGON, M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 619-42.
- LAMKANFI, M., DECLERCQ, W., KALAI, M., SAELENS, X. & VANDENABEELE, P. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ*, 9, 358-61.
- LU, J., QIN, Q., ZHAN, L. L., LIU, J., ZHU, H. C., YANG, X., ZHANG, C., XU, L. P., LIU, Z. M., WANG, D., CUI, H. Q., MENG, C. C., CAI, J., CHENG, H. Y. & SUN, X. C. 2014. AT-406, an IAP inhibitor, activates apoptosis and induces radiosensitization of normoxic and hypoxic cervical cancer cells. *J Pharmacol Sci*, 126, 56-65.
- MACE, P. D., SHIRLEY, S. & DAY, C. L. 2010. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ*, 17, 46-53.
- MANNHOLD, R., FULDA, S. & CAROSATI, E. 2010. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Drug Discov Today*, 15, 210-9.
- MCILWAIN, D. R., BERGER, T. & MAK, T. W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008656.

- MILES, M. A., CARUSO, S., BAXTER, A. A., POON, I. K. H. & HAWKINS, C. J. 2020. Smac mimetics can provoke lytic cell death that is neither apoptotic nor necroptotic. *Apoptosis*, 25, 500-518.
- MOEN, M. D., MCKEAGE, K., PLOSKER, G. L. & SIDDIQUI, M. A. 2007. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*, 67, 299-320.
- MORRISH, E., BRUMATTI, G. & SILKE, J. 2020. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells*, 9.
- MRKVOVÁ, Z., PORTEŠOVÁ, M. & SLANINOVÁ, I. 2021. Loss of FADD and Caspases Affects the Response of T-Cell Leukemia Jurkat Cells to Anti-Cancer Drugs. *Int J Mol Sci*, 22.
- MÜLLER-ESTERL, W. 2010. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler [Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger]*, Spektrum Akademischer Verlag.
- NEGRONI, A., CUCCHIARA, S. & STRONATI, L. 2015. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm*, 2015, 250762.
- NEOPHYTOU, C. M., TROUGAKOS, I. P., ERIN, N. & PAPAGEORGIS, P. 2021. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel)*, 13.
- NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M. C., GRIGNANI, F. & RICCARDI, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139, 271-9.
- O'BRIEN, M. A. & KIRBY, R. 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18, 572-585.
- PAPALIAGKAS, V., ANOGIANAKI, A., ANOGIANAKIS, G. & ILONIDIS, G. 2007. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia*, 11, 108-13.
- PASPARAKIS, M. & VANDENABEELE, P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 311-20.
- PISTRITTO, G., TRISCIUOGLIO, D., CECI, C., GARUFI, A. & D'ORAZI, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8, 603-19.
- PSCHYREMBEL, W. & AMBERGER, S. 2004. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter.
- RENAN, M. J. 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*, 7, 139-46.
- RICCARDI, C. & NICOLETTI, I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1, 1458-61.
- RIEDL, S. J. & SHI, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 897-907.
- SAFFERTHAL, C., ROHDE, K. & FULDA, S. 2017. Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 36, 1487-1502.
- SAVILL, J. & FADOK, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407, 784-8.
- SCHILE, A. J., GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. & STELLER, H. 2008. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev*, 22, 2256-66.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2011. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- SCHNEIDER, U., SCHWENK, H. U. & BORNKAMM, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19, 621-6.

- SCORRANO, L. & KORSMEYER, S. J. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 437-44.
- SHIOZAKI, E. N., CHAI, J., RIGOTTI, D. J., RIEDL, S. J., LI, P., SRINIVASULA, S. M., ALNEMRI, E. S., FAIRMAN, R. & SHI, Y. 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, 11, 519-27.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67, 7-30.
- SILKE, J. & VUCIC, D. 2014. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol*, 545, 35-65.
- SOLARY, E., DUBREZ, L. & EYMIN, B. 1996. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J*, 9, 1293-305.
- SU, Z., YANG, Z., XIE, L., DEWITT, J. P. & CHEN, Y. 2016. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death & Differentiation*, 23, 748-756.
- 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*, 37(suppl 1), 130.
- VAUX, D. L. & STRASSER, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2239-44.
- VERHAGEN, A. M., EKERT, P. G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J. & VAUX, D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53.
- WEISBERG, E., RAY, A., BARRETT, R., NELSON, E., CHRISTIE, A. L., PORTER, D., STRAUB, C., ZAWEL, L., DALEY, J. F., LAZO-KALLANIAN, S., STONE, R., GALINSKY, I., FRANK, D., KUNG, A. L. & GRIFFIN, J. D. 2010. Smac mimetics: implications for enhancement of targeted therapies in leukemia. *Leukemia*, 24, 2100-9.
- WONG, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87.
- WU, G., CHAI, J., SUBER, T. L., WU, J. W., DU, C., WANG, X. & SHI, Y. 2000. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, 408, 1008-12.
- YANG, C., WANG, H., ZHANG, B., CHEN, Y., ZHANG, Y., SUN, X., XIAO, G., NAN, K., REN, H. & QIN, S. 2016. LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res*, 35, 158.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. I. Eposito für die Möglichkeit in Ihrem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. C. Mahotka, der mir während der gesamten Zeit der praktischen Durchführung als auch während der Schreibphase unterstützend zur Seite stand. Er hatte stets Zeit für Fragen und half beim Wiederfinden des roten Fadens.

Ich bedanke mich beim gesamten Team der Arbeitsgruppe, die für alle Fragen auch in wiederholter Form parat und mit Geduld bei der praktischen Einarbeitung zur Seite standen. Hier sind insbesondere Natascha und Julia zu erwähnen, die mir auch Tipps und Tricks gezeigt haben. Es war eine großartige Truppe, die ich auch gern außerhalb des Labors getroffen habe.

Ein Dank gilt meinen Eltern, die mein Medizinstudium und damit auch diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Auch danke ich meinen Mädels, deren Ohren einiges Gerede über die Doktorarbeit ertragen mussten.

Und ich danke meinem Mann, dass er ist, wie er ist und wir sind, was wir nun sind.