

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

Direktorin: Univ.- Prof. Dr. Irene Esposito

Die Wirkung neuer Smac-Mimetika auf eine Leukämie-Zelllinie

Dissertation

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

vorgelegt von

Amira Biezan Abo Houf

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

Zusammenfassung

Zusammenfassung (deutsch)

In soliden Tumoren und Leukämien führt das Auftreten von Resistenzen gegenüber etablierten Therapieverfahren zu einer schlechteren Überlebensprognose. Die Überexpression von antiapoptotischen Proteinen (IAPs) in Tumorzellen bedingt eine Fehlregulation der Apoptose und fördert unkontrollierte Zellproliferation und Metastasierung. Das mitochondriale Smac-Protein, wird bei Apoptosestimuli in das Zytoplasma freigesetzt und bewirkt eine Antagonisierung dieser IAPs. Daher bieten neuartige Smac-Mimetika und ihre abgeleiteten Strukturen therapeutische Möglichkeiten, IAP-vermittelt Resistenzen zu überkommen und Apoptose gezielt und effektiv in Tumorzellen einzuleiten. In dieser Arbeit wurden die Effekte der bislang nicht charakterisierten Smac-Mimetika LBPS01, 02, 03, 05 und 06 auf die Proliferation der Jurkat-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck sollten Methoden etabliert werden, die den Einfluss der Mimetika auf die Proliferation der Jurkat-Zellen darstellen. Des Weiteren sollten erste Hinweise des zugrunde liegenden Zelltodmechanismus beleuchtet und Kombinations-therapien in Betracht gezogen werden. Die Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 konnten in Jurkat-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellzahl induzieren. Es wurde untersucht, wann die größte proapoptotische Wirksamkeit der Mimetika nachgewiesen werden kann, um die Behandlungsdauer gezielt festzulegen. Alle drei im Proliferationsassay als sehr effektiv eingestuftes Smac-Mimetika zeigten vergleichbar starke zellzahlreduzierende Effekte auch in anderen Tumorzelllinien. Die Substanz LBPS03 aktiviert Apoptose relevante Signalwege, indem cIAP1 und XIAP degradiert und Caspasen-9 und -3 aktiviert werden. Auch LBPS01 führt zu einer signifikanten Zunahme des hypodiploiden DNA-Gehaltes und Aktivierung der Caspase-9 und -3. Für die Mimetika LBPS 02 und -06 konnten in Einzelbehandlungen keine signifikanten Effekte auf die Reduktion der Zellzahl erzielt werden. Um die Wirkung möglicher synergistischer Effekte von schwach wirksamen Mimetika in fortführenden Arbeiten weiter untersuchen zu können, wurde eine Kombinationsbehandlung mit AT-406 und TRAIL etabliert. Die Smac-Mimetika LBPS01 und -03 können zellübergreifend per se Apoptose einleiten ohne dabei toxische Effekte in normalen Zellen aufzuweisen. LBPS05 zeigt eine etwas schwächere Wirkung und könnte eine potentielle Substanz für eine Kombinationsbehandlung darstellen. In Zusammenschau dieser Ergebnisse, könnten diese neuartigen Smac-Mimetika einen wesentlichen Bestandteil einer personalisierten zielgerichteten Therapie darstellen.

Zusammenfassung (englisch)

Inhibition of apoptosis proteins are overexpressed in many human cancer cells such as T-cell leukemia and have been related to therapy resistance and poor prognosis. A promising approach in cancer therapy is targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) with second mitochondria-derived activator of caspase (smac) or smac mimetics, which sensitize different cell lines for apoptosis. Consequently, smac mimetics and their related structures provide new therapeutical options to overcome IAP-mediated drug resistance in cancer cells and to induce cell death.

The aim of this work was to establish methods that allow to investigate the effects of five substances, LBPS01, -02, -03, -05 and -06 on cell proliferation of Jurkat-cells and to point out mechanisms behind cell death. The smac mimetics LBPS01, -03 and -05 significantly inhibited cell proliferation in Jurkat-cells. Similar cell reducing effects could be seen in other cancer cell lines such as renal carcinoma cells. Further, the time and concentration of inducing cell death with smac mimetics was investigated to determine the length and concentration of treatment. It can be assumed that LBPS01 and LBPS03 induce cell reduction via apoptosis. This fact is supported by the results of further assays that showed an increase in subG1 levels, activation of caspase-3 as well as caspase-9. In addition LBPS03 induces degradation of XIAP and cIAP1. The cell death aktivator LBPS05 shows an overall weaker effect on inducing apoptosis and activation of caspases. Further possible synergistic effects of the smac mimetics with a cytostatic agent were examined and established using AT-406 and TRAIL.

During the thesis project at hand, assays were successfully established that demonstrate in a time dependent course the effects and possible mechanisms of the smac mimetics on cellular level. Further three of the tested mimetics were found to have micromolar potencies in proliferation assays with the Jurkat acute lymphatic leukemic cell line. The three hits were found to exhibit higher potency than clinically tested cell-death inducers and show almost no influence on normal cells, which makes these substances a potent therapeutic intervention in future cancer treatment. Altogether these novel smac mimetics represent new interesting candidates as part of a personalized targeted therapy for future clinical trials by successfully interrupting the tumor program and by precisely inducing cell death.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

‰	Promille
% (v/v)	ml/100
°C	Grad Celsius
α	Alpha
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
A	Absorption
Ala	Alanin
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP repeat
BMFZ	Bio-Medizinisches Forschungszentrum
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CD95	Cluster of differentiation 95
c-IAP	zelluläre IAP
cm ²	Quadratcentimeter
Cyt C	Cytochrom c
d	Schichtdicke
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRAQ5™	Deep red fluoescing agent
Em _{λmax}	Emmissionsmaximum
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat, Isomer I
FSC	Forward Scatter
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293
HEPES	N-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-Ethylsulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
I	elektrischer Strom
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
Ile	Isoleucin
m	milli
M	Mol
ml	Milliliter
ML-IAP	Melanoma-IAP
MW	Molekulargewicht
l	Liter
IBM	IAP binding motif
Lys	Lysin
NF- κ B	Nuclear-Factor- κ B
NIAP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered Saline
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
Pro	Prolin
R	Widerstand
RING	Really interesting new gene
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
Smac	Second mitochondrial-derived activator of caspases
SSC	Side Scatter

Tab	Tabelle
TAT	Transactivator of transcription
tBid	truncated BH3 interacting domain death agonist
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
U	Spannung
V_t	Gesamtvolumen
Vol%	Volumen Prozent
XIAP	X-chromosomal verknüpftes IAP

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
<hr/>	
ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)	I
ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)	II
VERZEICHNISSE	III
<hr/>	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
<hr/>	
1.1 LEUKÄMIE	1
1.1.1 THERAPIEFORMEN UND IHRE LIMITATION	3
1.2 BEDEUTUNG DER APOPTOSE FÜR DIE TUMORENTSTEHUNG	3
1.2.1 APOPTOSE	4
1.2.2 DIE "HALLMARKS OF CANCER"	5
1.3 CASPASEN – WICHTIGE PROTEASEN DER APOPTOSE	6
1.4 SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DER APOPTOSE	7
1.4.1 EXTRINSISCHER SIGNALWEG DER APOPTOSE	8
1.4.1.1 TRAIL-Rezeptor System	8
1.4.2 INTRINSISCHER SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	9
1.5 REGULATOREN DER APOPTOSE	11
1.5.1 DIE ROLLE DER IAPs (INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEINS)	11
1.5.1.1 XIAP- X-chromosomal Inhibitor of Apoptosis Protein	12
1.5.2 SMAC - EIN ANTAGONIST DER IAPs	13
1.6 EINSATZ VON SMAC- MIMETIKA ALS NEUER THERAPIEANSATZ	14
1.6.1 EIN BEREITS ETABLIERTES SMAC-MIMETIKUM AT-406	17
1.7 ZIELSETZUNG	18

2	MATERIAL UND METHODEN	19
<hr/>		
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	LABORGERÄTE	19
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	20
2.1.3	CHEMIKALIEN UND KITS	21
2.1.4	PROTEIN-STANDARD & ANTIKÖRPER	22
2.1.5	PUFFER UND LÖSUNGEN	23
2.1.6	MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR UND ZUSÄTZE	24
2.1.7	MIMETIKA	25
2.1.8	ZYTOSTATIKA	25
2.1.9	SOFTWARE UND WEBTOOLS	25
2.2	METHODEN	27
2.2.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	27
2.2.1.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	27
2.2.1.2	Zellzahlbestimmungen mittels der Neubauer-Kammer	27
2.2.1.3	Zellzählung und Proliferationsassay mittels der Scepter Cell-Counter Pipette	28
2.2.1.4	Mikroskopische Dokumentation	29
2.2.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN	29
2.2.2.1	Apoptosenachweis nach Nicoletti	29
2.2.2.2	Caspase-3 und -9 Aktivitäts-Assay mittels Durchflusszytometrie	31
2.2.3	FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANALYSEN	32
2.2.4	BIOCHEMISCHE METHODEN	33
2.2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Jurkat-Zellen	33
2.2.4.2	Proteinbestimmungen nach Bradford	33
2.2.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34
2.2.4.4	Proteintransfer (Western Blot)	35
2.2.4.5	Immundetektion von Proteinen	36
3	ERGEBNISSE	38
<hr/>		
3.1	ETABLIERUNG DES TESTSYSTEMS MIT DEM SMAC-MIMETIKUM AT-406 ALS REFERENZUNTERSUCHUNG ZUR DOSIS-WIRKUNG IM ZEITLICHEN VERLAUF	38
3.2	UNTERSUCHUNG DER MIMETIKA LBPS01, -02, -03, -05 UND -06 AUF APOPTOSEINDUKTION UND FESTLEGUNG DER OPTIMALEN WIRKKONZENTRATION	41

3.2.1	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN WIRKUNGSDAUER BEI VORSELEKTIERTEN MIMETIKA	43
3.3	HINWEISE AUF ZUGRUNDELIEGENDE MECHANISMEN DES ZELLTODES	44
3.3.1	ZELLZYKLUSANALYSE NACH NICOLETTI	44
3.3.2	NACHWEIS APOPTOTISCHER ZELLEN MITTELS AKTIVIERUNG DER CASPASE-9- UND CASPASE-3	47
3.3.3	EXPRESSION VON XIAP UND CIAP1 IN JURKAT-ZELLEN UND DEREN DEGRADATION NACH BEHANDLUNG MIT SMAC-MIMETIKA	51
3.4	APPLIKATION VON TRAIL UND AT-406	55
4	DISKUSSION	59
4.1	AT-406, EIN SMAC-MIMETIKUM ALS POSITIVKONTROLLE INDUZIERT DEN ZELLTOD IN DEN JURKAT-ZELLEN	60
4.2	DIE SMAC-MIMETIKA LBPS01, -03 UND -05, NICHT ABER LBPS02 UND LBPS06 ZEIGEN EINE SIGNIFIKANTE WIRKUNG AUF DIE ZELLPROLIFERATION IN JURKAT-ZELLE	61
4.3	DIE SMAC-MIMETIKA LBPS01, LBPS03 UND LBPS05 LÖSEN DEN ZELLTOD IN DEN JURKAT-ZELLEN AUS	63
4.4	DIE SMAC-MIMETIKA AT406 UND LBPS03 DEGRADIEREN EHER CIAP1 ALS XIAP	66
4.5	BEDEUTUNG DER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT TRAIL UND AT-406	68
	AUSBLICK	70
	LITERATURVERZEICHNIS	71
	DANKSAGUNG	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Leukopoese, Erythropoese und Thrombopoese.....	2
Abbildung 2: „The Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg (2011).	6
Abbildung 3: Apoptose-Signalwege auf zellulärer Ebene (Schematisch).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der 8 Vertreter der IAP-Familie im humanen Organismus ...	13
Abbildung 5: Chemische Struktur des AVPI-Motivs von Smac.....	14
Abbildung 6: Chemische Strukturen der Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS02, LBPS03, LBPS05 und 06 (Carosati et al., 2015).....	16
Abbildung 7: Strukturformel von AT-406.....	17
Abbildung 8: Histogramm eines normalen Zellzyklusprofils nach PI-Färbung.....	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots.....	36
Abbildung 10: Die Wirkung von AT-406 auf die Lebendzellzahl der Jurkat-Zellen am 3. und 4. Tag nach Behandlung	39
Abbildung 11: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit AT-406.....	40
Abbildung 12: Die Wirkung von LBPS01, -02, -03, -05 und -06 auf die Lebendzellzahl der Jurkat-Zellen am 3. Tag nach Behandlung	42
Abbildung 13: Die Wirkung der vorselektierten Smac-Mimetika auf die Zellproliferation in Jurkat-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	43
Abbildung 14: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit den Smac-Mimetika nach 72 Stunden.	44
Abbildung 15: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit den Smac-Mimetika nach 48 Stunden.	45
Abbildung 16: Darstellung von fragmentierten Zellkernen in Jurkat-Zellen mittels DAPI-Färbung	46
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Evaluation der Wirkung von Smac-Mimetika auf die Jurkat-Zellen	47
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspase-9 Aktivierung in AT-406, LBPS01-, LBPS03- und LBPS05-behandelten Jurkat-Zellen	49
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspase-3 Aktivierung in AT-406, LBPS01-, LBPS03- und LBPS05-behandelten Jurkat-Zellen	50
Abbildung 20: IAP- Proteinexpression und deren Degradation nach Behandlung mit Smac-Mimetika in Jurkat-Zellen.....	53
Abbildung 21: IAP- Proteinexpression und deren Degradation nach Behandlung mit Smac-Mimetika in Jurkat-Zellen.....	55

Abbildung 22: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit TRAIL im zeitlichen Verlauf.	56
Abbildung 23: Die Wirkung von 5µM AT-406 in Kombination mit 25ng/ml TRAIL auf die Anzahl apoptotischer Jurkat-Zellen	57
Abbildung 24: Die Wirkung von 25µM AT-406 in Kombination mit 25ng/ml TRAIL auf die Anzahl apoptotischer Jurkat-Zellen	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die morphologischen Veränderungen während der Apoptose und Nekrose (<i>verändert nach Blatt & Glick, 2001</i>)	5
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper	22
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 4: Übersicht der Zellkulturmedien und ihrer Zusätze.....	24
Tabelle 5: Smac-Mimetika und ihre molekulare Masse.....	25
Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Page	34

1 Einleitung

1.1 Leukämie

Das Wort Leukämie stammt aus dem altgriechischen und bedeutet „weißes Blut“. Dieser Begriff bezieht sich auf die verbreitete Leukozytenmanchette (buffy coat) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation des Blutes bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen (*Herold, 2011*). Heute versteht man unter dem Begriff Leukämie, Krebserkrankungen des blutbildenden Systems. Leukämie, auch Blutkrebs genannt, geht von den Knochenmarkszellen aus und ist in der Regel durch eine stark erhöhte Zahl weißer Blutkörperchen im Blut gekennzeichnet. Die unkontrollierte Proliferation und Expansion der entarteten Zellen führt zur generalisierten Ausbreitung und Verdrängung der regulären Blutbildung im Knochenmark und eventuell zu einer Infiltration extramedulärer Organe und Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut (*Herold, 2011*). Die Folgen der Leukämie sind weitreichend. Durch die Verdrängung der normalen Blutbildung sind praktisch alle Blutzellen betroffen. So kann es zur Anämie, Granulo-, Thrombo- und Lymphozytopenie kommen. Die Folgen sind Schwäche und Müdigkeit, hohe Infektanfälligkeit und Blutungsneigungen. Die Todesursache ist nicht der Blutkrebs selbst sondern der Zusammenfall der körpereigenen Abwehr. Durch den drastischen Abfall der Leukozytenzahlen, können sich bakterielle und virale Infektionen sowie Mykosen ausbreiten, die bei einem gesunden Menschen ungefährlich wären und bis hin zur Sepsis führen. Auch Blutungen zum Beispiel im Gehirn können zum Tod führen, wenn die Thrombozytenzahlen nicht mehr ausreichen.

Aus einer der pluripotenten Knochenmarksstammzellen entstehen unter physiologischen Bedingungen entweder myeloische oder lymphatische Zellen. Die myeloischen Zellen produzieren Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Mastzellen, wobei die lymphatischen Zellen zu B-, T-, NK- und Plasma-Zellen ausreifen. Zellen, die eine Leukämie verursachen, stammen von einer der beiden Stammzelllinien ab. Der Blutkrebs ist eine komplexe und vielschichtige Erkrankung, die viele unterschiedliche Facetten besitzt und mehrere Organsysteme involviert. Daher ist es nicht einfach, eine passende Einteilung zu finden, die Faktoren wie zum Beispiel klinischen Spontanverlauf, Reifegrad, die entartete Zellreihe und die Leukozytenzahl im Blut berücksichtigt.

2001 publizierte die World Health Organization (WHO) einen weltweiten Konsensus über die Klassifikation hämatologischer Neoplasien. Dieser wurde zuletzt 2016 aktualisiert und wird nicht nur von Klinikern, sondern auch von Pathologen und Wissenschaftlern verwendet. Diese Klassifikation berücksichtigt morphologische, immunphenotypische, genetische und molekulare Anomalien sowie klinische Merkmale. Zusätzlich wird die Zelllinie und der Reifegrad der Zelle berücksichtigt. In dem Update von 2016 fanden Krankheitsentitäten, die aufgrund neuer Erkenntnisse in der Klassifikation modifiziert, entfernt oder hinzugefügt werden mussten, Berücksichtigung. Insbesondere wurden neue genetische Marker in die Klassifikation aufgenommen, welche von diagnostischer und/oder prognostischer Relevanz sind (Swerdlo et al., 2016; Arber et al., 2016).

Die Ätiologie der Leukämie ist nicht eindeutig geklärt. Erwerben Zellen die Fähigkeit zur unkontrollierten Proliferation, können Leukämien bzw. Tumore entstehen. Dies kann durch Veränderungen des Erbguts hervorgerufen werden. Verschiedene Faktoren die das Erkrankungsrisiko erhöhen, können Chemikalien (z.B. Benzol), Zytostatika und ionisierende Strahlung sein. Genetische Faktoren, wie beispielsweise eine Chromosomenaberration, stellen ein erhöhtes Risiko dar, an einer Leukämie zu erkranken (Sitzmann, 2006).

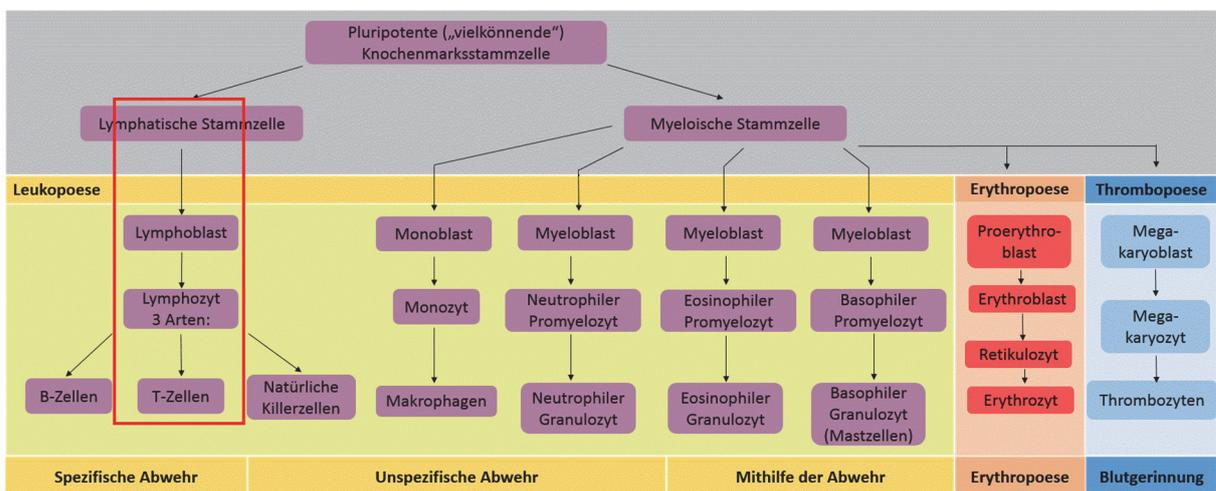


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Leukopoese, Erythropoese und Thrombopoese

Für diese Arbeit wurde eine leukämische Suspensionszelllinie, die aus dem Blut eines an akuter T-Zell Leukämie erkrankten Jungen gewonnen wurde (Schneider et al., 1977), verwendet. Das rot markierte Feld, zeigt die normale Entwicklung der T-Lymphozyten.

1.1.1 Therapieformen und ihre Limitation

Bei Kindern und Jugendlichen (1- bis unter 15-jährigen) stellen Krebserkrankungen die häufigste natürliche Todesursache dar (*Deutsches Ärzteblatt, 2012*). Über 30 % aller malignen Erkrankungen im Kindesalter sind Leukämien. Davon sind 80% akute lymphoblastische Leukämien (ALL) (*Sitzmann, 2006*). Unbehandelt führt eine akute Leukämie zum Tod. Neben den konventionellen Behandlungsmöglichkeiten, wie Chemo-, Strahlentherapie und Knochenmarktransplantationen, sind neue Ansatzmöglichkeiten zur Behandlung von malignen Erkrankungen in der Entwicklung. Vor allem Tumorerkrankungen, die gar nicht oder nur schlecht auf bisherige Therapieversuche reagieren und eine insgesamt schlechte Prognose haben, könnten mit diesen neuen Ansatzpunkten besser behandelbar werden.

1.2 Bedeutung der Apoptose für die Tumorentstehung

Während der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus spielt nicht nur die kontrollierte Proliferation, sondern auch die Beseitigung überflüssiger oder sogar potentiell gefährlicher Zellen eine wichtige Rolle. Der Begriff Apoptose wurde erstmals von Kerr und Currie im Jahre 1972 verwendet. In ihren Beobachtungen stellten sie fest, dass apoptotische Zellen ähnliche morphologische Merkmale teilen, die sich zu den Merkmalen in nekrotischen Zellen unterscheiden. Sie suggerierten, dass der programmierte Zelltod ein aktiver kontrollierter Prozess ist, der zur Aufrechterhaltung der Homöostase beiträgt (*Kerr et al., 1972*). Die Apoptose ist ein Mechanismus den prinzipiell jede Zelle ausführen kann. In defekten oder geschädigten Zellen, die nicht mehr zu reparieren sind, wird die apoptotische Maschinerie aktiviert. Dies schützt den Organismus und verhindert das Anhäufen von mutierten oder infizierten Zellen (*Thompson, 1995*). Heute weiß man, dass die Apoptose auch in verschiedenen physiologischen Prozessen essentiell ist. So wird durch den programmierten Zelltod bestimmter Zellen die Körpergestalt während der Embryonalentwicklung geformt. In Embryonen befindet sich interdigitales Gewebe, das apoptotischen Vorgängen unterliegt. Weitere Beispiele in der Differenzierung des Organismus sind die Entwicklung des Nervensystems und der Immuntoleranz (*Rassow/ Hauser/ Netzker/ Deutzmann, 2006*).

Eine gestörte Apoptose kann zu verschiedenen pathologischen Veränderungen führen. Zum Beispiel sind neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer das Resultat von gehäufter Apoptose. Autoimmunerkrankungen können entstehen, wenn das Selbstmordprogramm bei autoreaktiven Zellen ausbleibt. Auch die Entstehung von malignen Zellen geht mit einer gestörten Apoptose einher (*Thompson, 1995*). Die Kanzerogenese ist ein vielschichtiger Prozess und wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. So reicht eine Mutation nicht aus, um eine normale Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren. Es benötigt eine Reihe von Mutationen unterschiedlicher Gene, die über mehrere Jahre akkumulieren. Daher spielen somatische Mutationen, die vor allem Gene betreffen, die zuständig sind für die Regulation von Zellwachstum, Proliferation und DNA-Reparatur, eine entscheidende Rolle (*Rassow/ Hauser/ Netzker/ Deutzmann, 2006*).

1.2.1 Apoptose

Bis heute konnten verschiedene Formen des Zelltodes aufgeklärt werden; die zwei bekanntesten Zelltodsignalwege sind die Apoptose und Nekrose. Die Apoptose ist ein aktiv regulierter physiologischer Prozess, der durch verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen der Zelle charakterisiert ist. Die Zelle erhält durch äußere oder innere Auslöser Apoptose-Signale, woraufhin die aktivierten Stoffwechselprozesse mittels Nukleasen und Proteasen ausgeführt werden (*Thompson, 1995*). Mikroskopisch betrachtet schrumpft die Zelle, verformt sich und verliert den Kontakt zum Zellverband. Die Zellmembran bildet Bläschen, sogenanntes „blebbing“ und das Chromatin kondensiert (pyknosis). Im weiteren Verlauf wird die DNA durch Endonukleasen in kleine Stücke zerlegt und es kommt zur Ausbildung von membranumschlossenen Körperchen „apoptotic bodies“, die Kern- und zytoplasmatisches Material beinhalten. An der Zelloberfläche werden Phosphatidylserine externalisiert, sodass Makrophagen die apoptotischen Zellen erkennen und phagozytieren können (*Wyllie et al., 1980, Homburg et al., 1995, Martin et al., 1995*). An der Apoptose sind eine Vielzahl von unterschiedlichen pro- und antiapoptotischen Faktoren beteiligt. So spielen Caspasen, Proteine der Bcl-2-Familie und inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) eine entscheidende Rolle. Ob eine Zelle den programmierten Zelltod ausführt, hängt von der Balance dieser Faktoren ab (*Hengartner, 2000*).

Im Gegensatz dazu tritt der nekrotische Zelltod bei Schädigung durch Noxen oder traumatischen Ereignissen auf. Durch die von außen verursachte irreversible Schädigung kommt es zum Anschwellen der Zelle. Die Plasmamembran wird undicht oder platzt und der Zellinhalt tritt in das umliegende Gewebe aus. Anders als bei der Apoptose, führt die Nekrose zu einer Entzündungsreaktion (*Thompson, 1995; Wagener, 1999*).

Degterev und Kollegen entdeckten eine weitere Form des programmierten Zelltods. Die Nekroptose läuft reguliert und Caspase-unabhängig ab und wird als programmierte Form der Nekrose bezeichnet (*Vanden et al., 2014*).

Tabelle 1: Die morphologischen Veränderungen während der Apoptose und Nekrose (verändert nach Blatt & Glick, 2001)

Apoptose	Nekrose
<ul style="list-style-type: none"> - Zelle schrumpft (Volumenverlust) - Vakuolisierung des Cytoplasmas sowie Kondensation des Chromatins - Zerfall des Zellkerns in basophile Körper, die von der Zellmembran umgeben werden 	<ul style="list-style-type: none"> - Zellen verlieren Kontrolle über Ionenflüsse – Wassereinstrom, die Zelle schwillt an - Zunächst Mitochondrienstruktur zerstört, Organellen geschädigt - Platzen von Zellmembranen - Freisetzung des Zellinhalts und Entzündungsreaktion

1.2.2 Die "Hallmarks of Cancer"

Hanahan und Weinberg beschrieben, dass sechs „hallmarks“ in Tumoren ein organisiertes, logisches Konzept bilden, das helfen soll die Komplexität von Neoplasien zu verstehen (*Hanahan und Weinberg, 2000*). Diese Merkmale setzen sich zusammen aus der Stimulation proliferativer Signale und dem Ausweichen wachstumshemmender Faktoren sowie Apoptoresistenz, Immortalität, Angiogenese, Invasion und Metastasierung. In den letzten Jahren wurden zwei weitere Merkmale, das Reprogrammieren des energetischen Metabolismus und die Immun-Escape-Mechanismen diskutiert. Neuerdings fällt die Aufmerksamkeit in Bezug auf die Entstehung und Förderung von Neoplasien auch auf die Mikroumgebung von Tumoren (*Hanahan und Weinberg, 2011*).

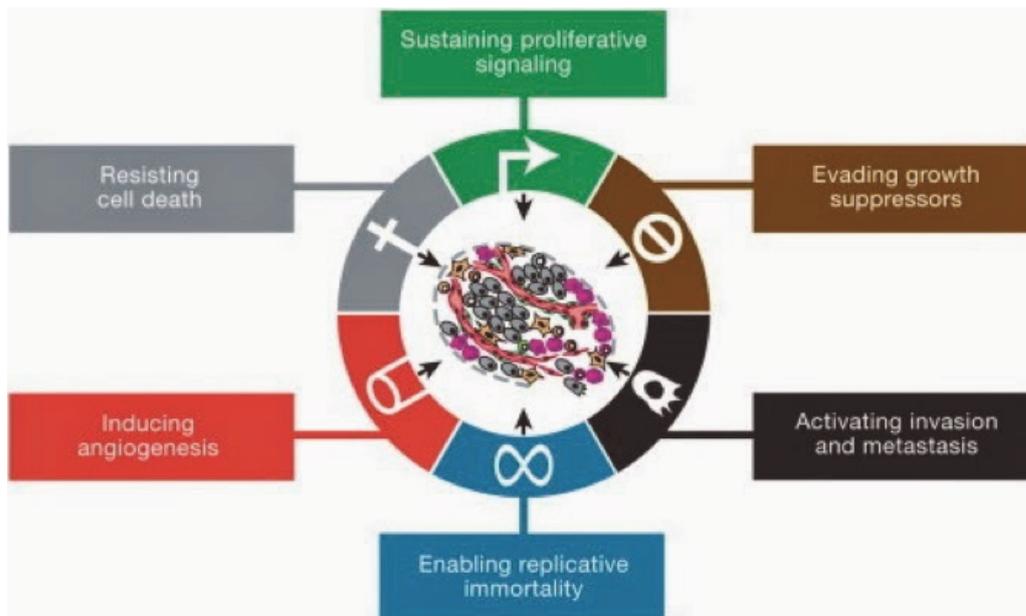


Abbildung 2: „The Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg (2011).

1.3 Caspasen – wichtige Proteasen der Apoptose

Im Verlauf des programmierten Zelltods nehmen die Caspasen eine wichtige Rolle ein. Caspasen gehören zu einer Gruppe von Cysteinproteasen, die für viele verschiedene morphologische Veränderungen in apoptotischen Zellen verantwortlich sind (Kerr *et al.*, 1972; Hengartner, 2000). Sie sind hochkonservierte Proteine, die nicht nur im Menschen, sondern auch in Nematoden und Hydras vorhanden sind (Budihardjo *et al.*, 1999).

Bisher sind 13 Mitglieder der Caspase-Familie in Säugetieren beschrieben. Die bisher bekannten Caspasen besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum (cysteiny-l-aspartate specific protease). Diese Todesproteine sind in der Zelle als inaktive Enzyme (Zymogene) vorhanden und werden sobald die Apoptose eingeleitet wird durch proteolytische Spaltung C-terminal hinter Aspartatresten aktiviert (Thornberry *et al.*, 1999).

Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert und besitzen 3 Domänen. Eine N-terminale Prodomäne sowie eine große (p20) und kleine Untereinheit (p10). Es konnte belegt werden, dass alle untersuchten reifen Caspasen Heterotetramere sind, die zwei p20/p10 heterodimere und 2 katalytische Zentren besitzen (Earnshaw *et al.*, 1999). Verschiedene Mechanismen können zu einer Aktivierung der Caspasen führen.

Die meisten Caspasen werden durch eine Abspaltung der Prodomäne und einer intramolekularen Spaltung zwischen p20 und p10 prozessiert (*Thornberry et al., 1999*). Alle Spaltungen werden an Aspartatresten durchgeführt (*Hengartner, 2000*). Caspasen -3, -6 and -7 können durch zuvor aktivierte Caspasen prozessiert werden. Sie werden auch Downstream-Effektor-Caspasen genannt und unterscheiden sich strukturell von den Initiator-Caspasen durch eine kürzere Prodomäne (ca. 20-30 Aminosäuren) (*Earnshaw et al., 1999*). Die Initiator-Caspasen zu denen Caspase-2, -8, -9 und -10 zählen, besitzen eine längere Prodomäne über die sie Regulatorproteine, die an der Apoptose beteiligt sind, rekrutieren können.

Im Falle der Caspase-8 kommt es durch Bindung von Liganden an Todesrezeptoren, wie CD95, auf der zytosolischen Seite zur Bildung eines hochmolekularen Aktivierungskomplexes zur Initiierung der Caspasen-Kaskade. Hierdurch werden nicht nur Regulatorproteine rekrutiert, sondern auch Procaspase-8 Moleküle. Die hohe lokale Konzentration an Procaspase-8 führt zu einer Autokatalyse und dadurch zur Initiierung der Apoptose (*Hengartner, 2000*).

Des Weiteren wird eine sehr komplexe Form der Aktivierung von Caspase-9 diskutiert. Hier dient Apaf-1 als Schlüsselmolekül zum Prozessieren der Procaspase-9 (*Hengartner, 2000*).

Zusammenfassend können Caspasen erstens durch zuvor aktivierte Caspasen prozessiert werden, zweitens durch Autokatalyse oder drittens mittels spezifischer regulatorischer Proteine. Einmal aktiviert führen die Caspasen durch proteolytische Spaltung von zellulären Proteinen zu der in der Apoptose morphologisch sichtbaren Veränderung, wie zum Beispiel dem Verlust der Zellstruktur sowie zur Schrumpfung des Zellkerns durch Spaltung der zytoskeletalen Proteine Fodrin und Gelsolin (*Kothakota et al., 1997*).

1.4 Signaltransduktionswege der Apoptose

Der programmierte Zelltod kann durch zwei Hauptmechanismen aktiviert werden. Der intrinsische- auch mitochondrien-abhängige Signalweg genannt, wird überwiegend durch Mitglieder der Bcl-Familie vermittelt. Es werden proapoptische Moleküle wie Cytochrom c und Smac aus den Mitochondrien ausgeschüttet. Als Folge bildet sich das Apoptosom, bestehend aus dem aktiven Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9. Bei dem extrinsischen (Rezeptor-abhän-

gigen) Signalweg binden Liganden an sogenannte „Todesrezeptoren“ und dies führt zur Aktivierung der Caspase-8. Beide Wege haben als gemeinsame Endstrecke die Effektor-Caspasen (Danial et al., 2004).

1.4.1 Extrinsischer Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Liganden an die membranständigen Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche eingeleitet. Zu diesen Rezeptoren, der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Superfamilie zählen unter anderem Fas/Apo-1 (CD95), TNFR (TNFR1 und TNFR2) und TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) Rezeptoren, die alle Typ-I-Transmembranproteine sind und eine ähnliche extrazelluläre (Amino-terminale) Cystein-reiche Domäne (CRD) besitzen (Smith et al., 1994; Nagata, 1997). Die meisten korrespondierenden Liganden gehören der TNF-Familie an und werden als Typ-II-Membran Proteine synthetisiert. Das N-terminale Ende liegt auf der zytosolischen Seite und unterscheidet sich innerhalb der TNF-Familie in der Länge und Sequenz signifikant voneinander. Im Gegensatz dazu ist das 150 Aminosäure lange C-terminale Ende, welches extrazellulär liegt, eine hochkonservierte (20-25%) Region innerhalb der TNF-Familie (Nagata, 1997). Der weitere rezeptorvermittelte Signalweg soll anhand des TRAIL-Rezeptor Systems dargestellt werden.

1.4.1.1 TRAIL-Rezeptor System

Im Jahre 1995 wurde TRAIL zum ersten Mal identifiziert und kloniert (Wiley et al., 1995). TRAIL oder auch Apo2L gehört zu der TNF-Familie und kann in unterschiedlichen Zellen Apoptose induzieren. Es konnten verschiedene TRAIL Rezeptoren identifiziert werden, darunter lösliche Formen (sTRAIL), welche durch Proteasen entstehen und vier membranständige Rezeptoren (memTRAIL), wovon zwei aktiv am programmierten Zelltod beteiligt sind (Fox et al., 2010; Neumann et al., 2012).

Die extrazelluläre Ligandenbindung von TRAIL an seinen „Todesrezeptor“ bedingt die Trimerisierung von TRAIL-DR4 oder DR5 und stimuliert die Aktivierung der intrazellulären Todes-Domäne (DD). Die Initialisierung des apoptotischen Signals führt zu Rekrutierung von Adaptermolekülen wie zum Beispiel FADD (fas associated death domain protein), welche wiederum

Pro-Caspase-8 und/oder -10 binden (*Neumann et al., 2012*). Dieser Proteinkomplex wird auch DISC (death-inducing signaling complex) genannt. Pro-Caspase-8 besitzt geringfügige proteolytische Aktivität. Durch Bindung an DISC und Oligomerisierung der Pro-Caspase-8 ist die lokale Konzentration so hoch, dass es zu einer autokatalytischen Spaltung kommt. Dadurch kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Diese zerstören dann lebenswichtige zelluläre Proteine, wie zum Beispiel die des Zytoskelettes, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder auch Endonukleasen-Inhibitoren, was dann zur Fragmentierung der DNA führt (*Rassow/ Hauser/ Netzker/ Deutzmann, 2006*).

Die Verbindung zum intrinsischen Signalweg besteht über eine weitere Möglichkeit Apoptose einzuleiten, die nicht die Aktivierung der Effektor-Caspasen voraussetzt. Aktive Caspase-8 kann Bid (BH3-interacting domain death agonist), welches der proapoptotischen Bcl-2-Protein Familie angehört, spalten. Das Spaltprodukt tBid wird zum Mitochondrium verlagert, wo es mit anderen proapoptotischen Proteinen eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bewirkt und damit den intrinsischen Signalweg einleitet (*Ashkenazi, 2008; Fulda/ Vucic, 2012,*).

1.4.2 Intrinsischer Signaltransduktionsweg

Verschiedene Faktoren können zu der Aktivierung des intrinsischen oder auch Mitochondrien-abhängigen Apoptosewegs führen. Intrazelluläre Signale, wie zum Beispiel Ischämie, oxydativer Stress oder die Inhibition von Wachstumssignalen, können unabhängig von Membranrezeptoren die Apoptose auslösen (*Jin Z et al., 2005; Ocker/ Höpfner, 2012*). Durch den eingetretenen Zellschaden wird p53, ein Tumorsuppressorgen aktiviert, welches zur Transkription von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie wie PUMA und NOXA führt (*Ashkenazi, 2008*). Diese Proteine sind alle BH3-only Proteine und führen zur Aktivierung anderer Mitglieder dieser Familie wie BAX und BAK. Diese dimerisieren und werden zur äußeren Mitochondrienmembran verlagert. Dort induzieren sie die Abgabe von pro- und antiapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c, Ca²⁺, oder Smac/DIABLO (*LiuX et al., 1996; Goldstein et al., 2000; Zamzami et al., 2001; Green et al., 2004; Ocker/Höpfner, 2012*).

Cytochrom c lagert sich mit dem zytosolischen Protein Apaf-1 (apoptotic protease-aktivating factor1) zusammen, die gemeinsam ProCaspase-9 aktivieren. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet (Zou et al., 1997; Adrain et al., 1999). Anschließend kann die aktive Caspase-9 Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 prozessieren, welche die Apoptose induzieren (Ashkenazi, 2008).

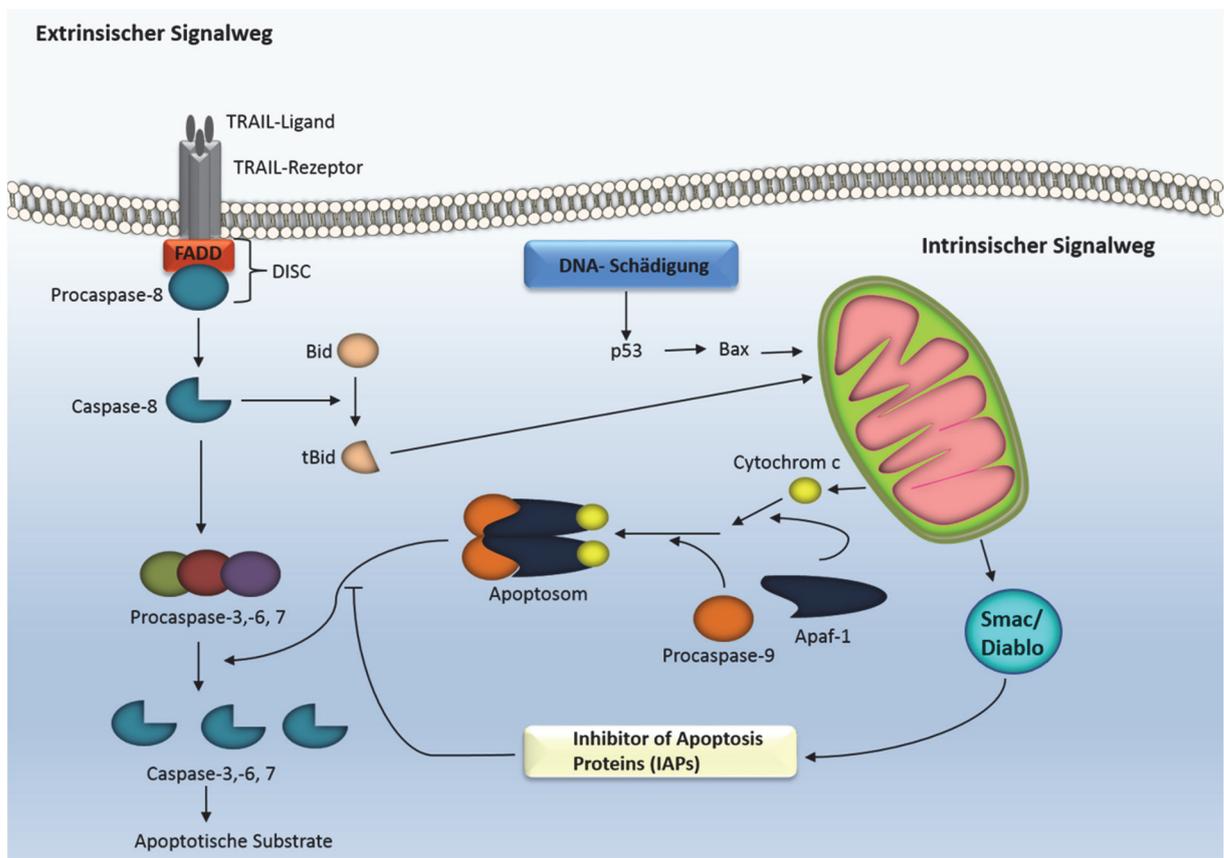


Abbildung 3: Apoptose-Signalwege auf zellulärer Ebene (Schematisch)

Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren (wie Tumornekrosefaktor, TRAIL oder CD95) vermittelt. Nachdem ein TRAIL-Ligand an den entsprechenden Rezeptor bindet, führt dies zu dessen Trimerisierung und Ausbildung eines death-inducing signaling complex (DISC). Mittels fas-associated death domain protein (FADD), ein Adaptermolekül, wird Procaspase-8 rekrutiert und aktiviert. Der intrinsische Signalweg kann durch externe Einflüsse oder internen zellulären Stress aktiviert werden. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und Smac. Cytochrom c bildet mit Caspase-9 und Apaf-1 das Apoptosom. Beide Signalwege aktivieren die Effektorcaspase-3, welche gemeinsam mit den anderen Effektorcaspasen die Spaltung proapoptischer Substrate vermittelt. Smac/Diablo wirkt proapoptisch, indem es die IAPs inhibiert. Eine Verbindung beider Wege erfolgt über das Bid- Protein, das von Caspase-8 gespalten wird und auf die Mitochondrien wirkt (verändert nach Hengartner, 2000).

1.5 Regulatoren der Apoptose

Die Apoptose stellt einen komplexen und vielschichtigen Prozess dar. Ein Hauptakteur in der Induktion des Zelltodes, ist die Caspase-vermittelte Substratspaltung mit „tödlichen“ Konsequenzen für die Zellen. Daher ist es nicht erstaunlich, dass die Zellen Mechanismen und Funktionen zur Feinregulation des Apoptoseprozesses besitzen, die im Folgenden näher erläutert werden.

1.5.1 Die Rolle der IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins)

Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) wurden erstmals im Genom von Baculoviren entdeckt. Es wurde festgestellt, dass IAPs an der Unterdrückung des Zelltodes von baculovirus-infizierten Wirtszellen beteiligt sind (*Crook et al., 1993; Birnbaum et al., 1994*). Sie gehören einer antiapoptotischen Proteinfamilie an, die durch verschiedene Mechanismen das Überleben der Zelle sicherstellen. Unter anderem sind IAPs an der Regulation und Transkription von Nuklearfaktor κ -B (NF- κ B) und an der direkten Caspase-Bindung und -Inhibition beteiligt (*Mannhold et al., 2010*). Bis heute konnten acht humane IAPs beschrieben werden. Neuronal apoptosis inhibitor protein (NAIP/BIRC1) war das erste, nicht virale IAP, welches im Menschen entdeckt wurde (*Roy et al., 1995*). Darauf folgten sieben weitere IAPs: cellular IAP1 und IAP2 (cIAP1/BIRC2 und cIAP2/BIRC3) (*Rothe et al., 1995; Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Uren et al., 1996*), X-chromosome-linked IAP (XIAP/BIRC4), survivin (BIRC5) (*Ambrosini et al., 1997*), BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme (BRUCE/BIRC6) (*Hauser et al., 1998; Chen et al., 1999*), melanoma IAP (BIRC7) (*Vucic et al., 2000; Kasof/ Gomes, 2001*) und testis-specific IAP (Ts-IAP) (*Lagace et al., 2001; Richter et al., 2001*).

Per Definition besitzen IAPs mindestens eine BIR-Domäne (baculoviral IAP repeat domain) (*Salvesen, et al., 2002*). Diese ist N-terminal lokalisiert und besteht aus einer hochkonservierten 70-80 Aminosäurenlangen cystein- und histidinreichen zinkbindenden Region (*Deveraux et al., 1999; Mannhold et al., 2010*). Neben der BIR-Domäne, enthalten einige IAPs eine carboxy-terminale RING-(really interesting new gene) Domäne, die es ihnen ermöglicht als E3 ubiquitin-Ligase zu wirken, eine CARD- (caspase recruiting domain) und eine UBA-Domäne

(ubiquitin-associated domain), die für die Protein-Protein Interaktion eine Rolle spielen (*Deveraux, et al., 1999; Joazeiro et al., 2000; Salvesen et al., 2002; Fulda/ Vucic, 2012*). Die weiteren Funktionen von IAPs sollen anhand von XIAP erläutert werden.

1.5.1.1 XIAP- X-chromosomal Inhibitor of Apoptosis Protein

XIAP kann Apoptose unterdrücken, indem es direkt an Caspasen bindet und diese hemmt. Damit gehört XIAP zu einer der vielversprechendsten Mitglieder der IAP-Familie als Zielmolekül in der Krebstherapie. Es besteht aus drei BIR-, einer RING- und CARD-Domäne. XIAP kann sowohl Initiator- als auch Effektor-Caspasen hemmen. Frühe Ergebnisse über den Mechanismus zeigten, dass XIAP direkt Caspase-3 und -7 inhibiert (*Deveraux et al., 1997, 1998*). In vitro Assays belegten diese Aussagen und zeigten das nicht nur XIAP sondern auch cIAP1 und cIAP2 durch die Inhibierung von Caspase-9, die weitere proteolytische Prozessierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 hemmen können (*Deveraux et al., 1998*).

Zusammenfassend, hemmt XIAP mittels BIR2 und BIR3-Domänen die Aktivität von Caspase-3, -7 und -9. XIAP-BIR2-Domäne ist beteiligt an der Inhibierung von Effektor Caspasen. Im Gegensatz dazu regulieren die XIAP-BIR3-Domäne die Initiator-Caspasen (*Riedl et al., 2004; Scott et al., 2005*). Mittels der RING-Domäne, die E3-ligase, kann XIAP die Degradation proapoptotischer Proteine fördern. Darüber hinaus ist die BIR1-Domäne an der Aktivierung des TAK1 Signalweges beteiligt, welches zur Induktion von NF- κ B führt (*Lu M. et al., 2007*).

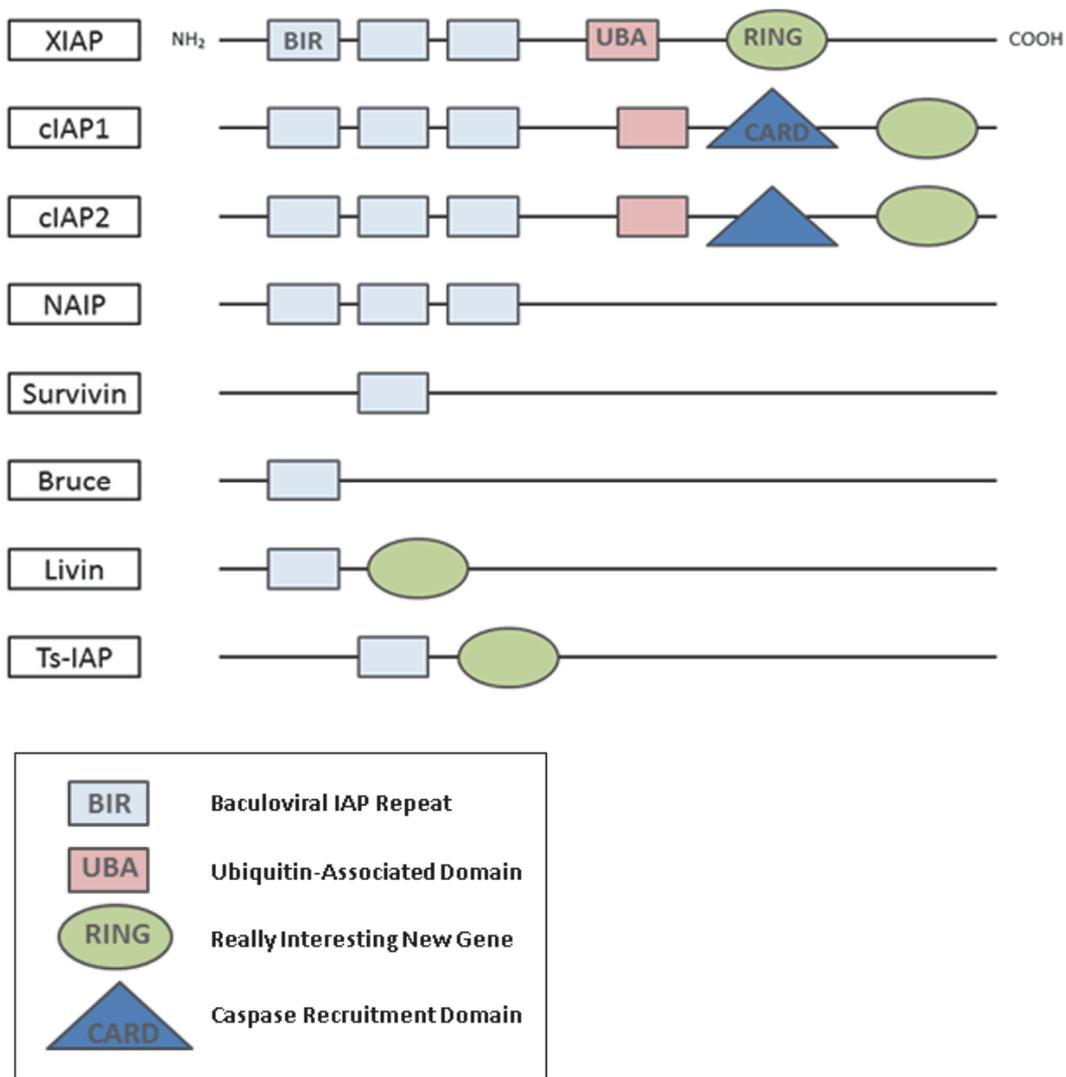


Abbildung 4: Schematische Darstellung der 8 Vertreter der IAP-Familie im humanen Organismus

Strukturelle Motive der IAPs. Die Baculovirus-IAP Repeat (BIR)-Domäne mit ca. 70-80 Aminosäuren, ist eine cystein- und histidinreiche Domäne, die Zinkionen komplexieren. Die Anwesenheit von mindestens einer BIR-Domäne ist das wichtigste Merkmal der IAP-Familie. Die Anzahl der BIR-Domänen variiert zwischen ein bis drei. Weitere Motive in IAPs sind: RING-Domäne, eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) und das Caspase-Rekrutierungs-(CARD) Motiv, welches eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt (Verändert nach Garcia et al., 2012).

1.5.2 Smac - ein Antagonist der IAPs

Nach Apoptose-Stimuli, wird unter anderem SMAC/DIABLO (second mitochondrial derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma entlassen. Der Name dieses Moleküls verweist auf seine Funktion und somit ist SMAC ein

potenter Inhibitor der IAPs. Darauffolgend ist die Hemmung der Caspasen aufgehoben und die Zelle kann die begonnene Apoptose zu Ende führen (Du et al., 2000).

Das Vorläufermolekül von SMAC besteht aus 239 Aminosäuren, wobei die ersten 55 Aminosäuren für den Import in das Mitochondrium benötigt werden (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Im Intermembranraum der Mitochondrien spaltet ein Peptidase-Komplex die ersten 55 Aminosäuren ab, sodass eine reifes SMAC56 Molekül entsteht (Burri et al., 2005).

Struktur-Analyse Studien konnten zeigen, das SMAC als Homodimer aktiv ist und somit zwei IAP-Proteine binden kann. Dies wird über ein sogenanntes IAP-binding motif (IBM), eine am N-terminalen Ende lokalisierte vier Aminosäuren lange Sequenz realisiert. Das Tetrapeptid besteht aus den Aminosäuren Ala1-Val2-Pro3-Ile4 (AVPI), das die BIR-Domäne von IAPs erkennt und bindet (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Im Beispiel von XIAP, ist nach kompetitiver Bindung mit SMAC/DIABLO die XIAP-vermittelte Caspase-9 Inhibition aufgehoben. Des Weiteren kann SMAC/DIABLO die Ubiquitin-Ligase der IAP-Proteine antagonisieren, was eine Autoubiquitination und Degradation zur Folge hat (Creagh et al., 2004; Yang Q.H. et al., 2004).

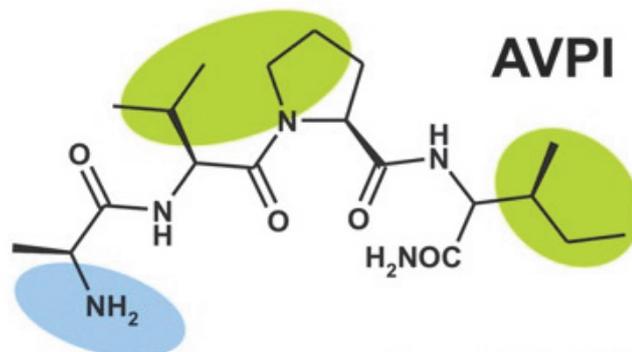


Abbildung 5: Chemische Struktur des AVPI-Motivs von Smac

Zwei hydrophobe (grün-gefärbte) Regionen und eine hydrophile (blau-gefärbte) Region konnten identifiziert werden und sind wichtig für eine günstige Protein-Liganden-Wechselwirkung (Mannhold et al., 2010).

1.6 Einsatz von Smac- Mimetika als neuer Therapieansatz

In den letzten Jahren sind IAPs immer mehr in den Fokus der Tumorforschung gerückt. Grund dafür ist die Überexpression dieser IAPs in verschiedenen Tumorzellen und die damit verbundene Resistenz gegenüber Chemotherapie (Hui et al., 2010). Vor allem cIAP1/2 und XIAP

scheinen an diesen Prozessen eine wichtige Rolle zu spielen. Somit stellen diese Proteine einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar (*Sun H. et al., 2008; Flygare et al., 2010; Straub, 2011*).

Die Entdeckung der natürlich vorkommenden Antagonisten Smac/Diablo und die strukturellen Untersuchungen von IAPs und Smac/Diablo definierten die genauen Regionen, welche an der Bindung von BIR-Domänen der IAPs beteiligt sind. Die Tatsache, dass das IAP-bindende Motiv (IBM) nur aus vier Aminosäuren besteht und die Erkenntnisse über topographische Verhältnisse der Bindung zwischen Smac und der BIR-Domäne von IAPs, führte zu wachsendem Interesse in der Forschung und bietet eine potenzielle Behandlung mit sogenannten Smac-Mimetika (*Liu et al., 2000; Wu et al., 2000*). Es werden monovalente und bivalente Smac-Mimetika unterschieden. Hierbei bestehen bivalente Mimetika aus zwei monovalenten Einheiten, die über eine chemische Linkerstruktur verbunden sind (*Ndubaku et al., 2009*). Der Vorteil dieser Strukturen gegenüber monovalenten Mimetika besteht in ihrer höheren Bindungsaffinität zu IAPs. Ein entscheidender Nachteil dieser bivalenten Strukturen besteht in dem hohen Molekulargewicht, welches eine orale Applikation nicht möglich macht. Somit müssten diese Mimetika intravenös gegeben werden, was bei regelmäßiger Einnahme umständlich sein kann (*Sun H. et al., 2008; Fulda/ Vucic, 2012*).

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Smac vor allem eine starke Affinität für die XIAP BIR3 Domäne besitzt. Daher wurde für die Herstellung von synthetischen IAP-Antagonisten in vielen Fällen die Struktur von AVPI mit der XIAP-BIR3 Domäne zu Grunde gelegt (*Sun H. et al., 2008; Flygare et al., 2010; Straub, 2011; Liu et al., 2000; Wu et al., 2000*). Weiter konnte beobachtet werden, dass es zu einer Autoubiquitinierung von c-IAP 1 und -2 kommt, wodurch der Abbau dieser Proteine initiiert wird (*Sun H. et al., 2008*). Ein ganz neu entwickelter IAP-Antagonist, das Octahydropyrrolol[1,2-a]pyrazine Scaffold zeigt eine cIAP1 und XIAP-Hemmung und zusätzlich inhibiert es Tumorwachstum. Entgegen früheren Vermutungen besitzt dieser IAP-Antagonist eine höhere Affinität gegenüber cIAP1 als XIAP (*Hashimoto et al., 2013*).

Carosati und Kollegen (*2015*) suchten in einem Liganden-basierten virtuellen Screening nach einem potentiellen nicht-peptidischen Molekül, welches das AVPI-Motiv von Smac imitiert und mit der BIR3-Domäne von XIAP interagieren kann. Aus einer Datenbank von über 800.000 (*ChemDiversity*) Substanzen konnten mittels eines bestimmten Algorithmus 31 mögliche IAP-

Antagonisten identifiziert werden. Als Ausgangssubstanz diente die PS-1-Struktur, die pan-selektiv an die BIR-3-Domäne von XIAP und anderen zellulären IAPs binden und den Zelltod induzieren kann (Carosati et al., 2015; Ndubaku et al., 2009). Die Substanzen aus der Datenbank wurden mit der Referenzsubstanz (PS-1-Struktur) verglichen. Ligand-based-pan-selective, abgekürzt LBPS steht zum einen für die angewandte Methode zur Identifikation der neuen Substanzen und zum anderen beschreibt es die Eigenschaften der IAP-Antagonisten. Unserer Arbeitsgruppe wurden die Substanzen zur Verfügung gestellt und somit konnten die vielversprechenden Verbindungen an unterschiedlichen Zelllinien getestet werden. In der vorliegenden Arbeit werden fünf der neu entwickelten monovalenten Smac-Mimetika (LBPS01, -02, -03, -05 und -06) an Jurkat-Zellen getestet.

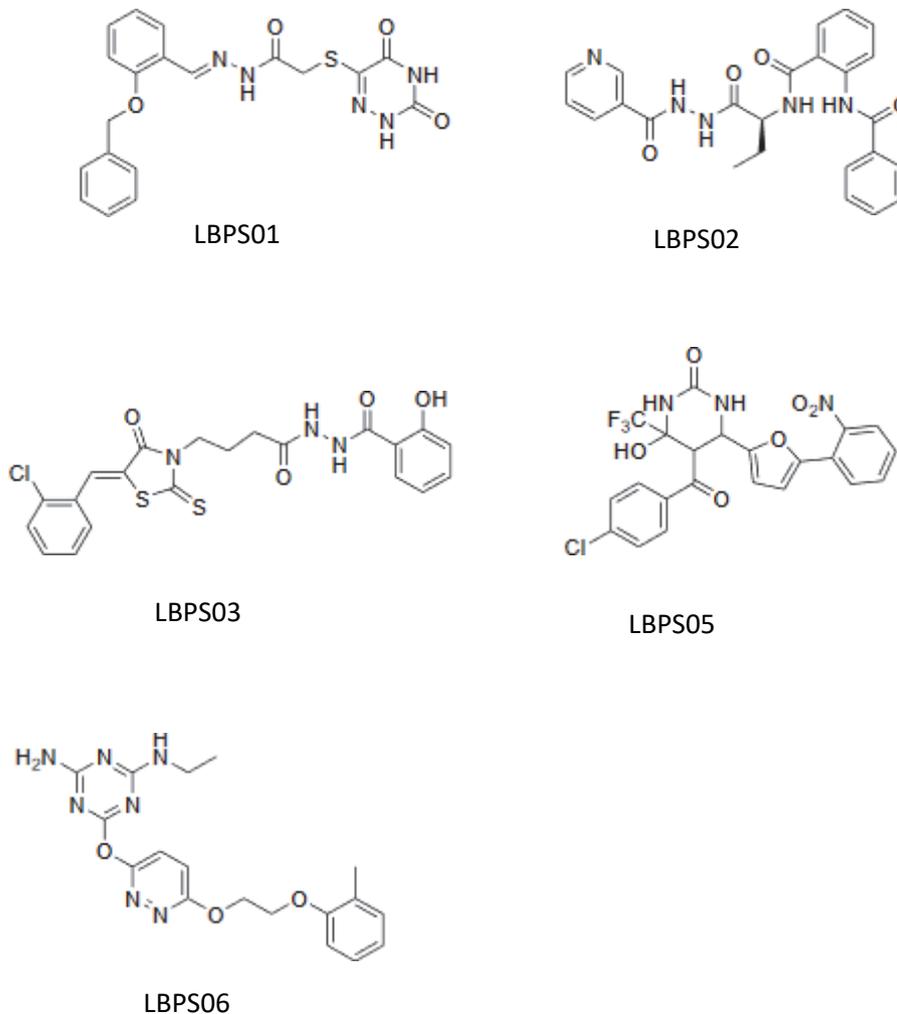


Abbildung 6: Chemische Strukturen der Zelltod-Aktivatoren LBPS01, LBPS02, LBPS03, LBPS05 und 06 (Carosati et al., 2015)

1.7 Zielsetzung

Die Fehlregulation des programmierten Zelltods gilt als Hauptursache für die Ausbildung von malignen Erkrankungen. Daher ist die weitere Erforschung über die molekularen Mechanismen der Apoptose, welche zur Entstehung von Neoplasien führt, essentiell und bildet eine Basis für neue Therapieansätze. Es ist bereits bekannt, dass die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Stimuli in malignen Prozessen in vielen Fällen gestört ist. Die Überexpression von antiapoptotischen Proteinen – wie beispielsweise den IAPs – führt zu einer implementierten Apoptoseresistenz und dadurch zum Fortbestehen einer entarteten Zelle.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung der Smac-Mimetika LBPS01, LBPS02, LBPS03, LBPS05 und LBPS06 auf die Zellproliferation der Jurkat-Zellen untersucht werden. Hierfür soll das Smac-Mimetikum AT-406, als Positivkontrolle etabliert werden. Weiterhin gilt es, adäquate Assays zu etablieren, mit dem nicht nur die Effekte auf die Zellproliferation, sondern auch erste Hinweise für die zugrundeliegenden Mechanismen des Zelltodes aufgezeigt werden können. In der Literatur wird bereits von einer möglichen Wirkungsverstärkung bei einer Kombinationsbehandlung von TRAIL und Smac-Mimetika (*Fulda et al., 2002*) gesprochen. Dies soll im Anschluss mittels der positiv-Kontrolle AT-406 und TRAIL getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Geräte

Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systemec (Wettenberg)
Durchflusszytometer CyFlow space	Partec (Münster)
Elektrophoresekammer	Roth (Karlsruhe)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubationsschüttler 3033	GFL (Burgwedel)
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH (Staufen)
Inkubator	Forma scientific (USA)
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M1	Carl Zeiss (Oberkochen)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach)
Microskop-Kamera DFC 320	Leica
Microplate Reader Model 680	Biorad (München)
Mikroskop Labovert FS	Leitz (Bensheim)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)
pH-Meter	HANNA instruments (Padova, Italien)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Bioscience (Fernwald)
Scepter Cell Counter	Merck Millipore (Darmstadt)
Sterilbank Typ DLF/BSS6	J. H. Schrader (Göttingen)
Tischautoklav Typ 26	Melag (Berlin)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Fisher & Rintelen GmbH (Essen)
Western Blot Anlage	Hoefler (San Francisco)

Mini-PROTEAN® Tetra System

Biorad (München)

Zentrifugen

Megafuge 1,0R

Heraeus Sepatech (Osterode)

Universal 16R

Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

Biofuge 13R

Heraeus Instruments (Hanau)

Mikro 20

Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Materialien

Deckgläser

Engelbrecht (Edermünde)

FACS-Röhrchen

Sarstedt (Nümbrecht)

Falcon Tubes (15ml und 50 ml)

Greiner (Frickenhausen)

Glaspipetten

Karl Roth (Karlsruhe)

Halbmikroküvetten UVette

Eppendorf (Hamburg)

Halbmikroküvetten

Sarstedt (Nümbrecht)

Latexhandschuhe

Sempercare (Wien)

Mikrotiterplatten (96 well)

Techno Plastik Products (Schweiz)

Nitrilhandschuhe

Ansell (München)

Nitrozellulosemembran

Whatman GmbH (Dassel)

Objektträger

Metzel Gläser (Braunschweig)

Parafilm

American National Can TM (Chicago, IL USA)

Pipettenspitzen

StarLab (Ahrensburg)

Plastikküvetten

Eppendorff (Hamburg)

Sarstedt (Nümbrecht)

Plastikpipetten

Corning (Arizona, USA)

Reaktionsgefäße (0,5-2ml)

Eppendorff (Hamburg)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sterilfilter

Sartorius / vivascience AG (Hannover)

Whatman Papier

Whatman GmbH (Dassel)

Zellkulturflaschen

Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen)

Zellkulturschalen	Techno Plastik Products
Zellkulturplatten (6 well und 12 well)	Techno Plastik Products (Trasadingen, Schweiz)

2.1.3 Chemikalien und Kits

Chemikalien

Agarose	BioBudget (Krefeld)
Ammoniumpersulfat	Sigma (München)
BioRad Protein Assay Reagenz	BioRad Laboratories (München)
Blotting Grade Blocker (non-fat dry milk)	BioRad Laboratories (München)
Bovine Serum Albumin	Paa Laboratories
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Sigma (München)
DNA Leiter 50 bp	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethanol 70%	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Carl Roth (Karlsruhe)
Fetal Calf Serum	Sigma (München)
HEPES	Gibco (Darmstadt)
L-Glutamin	Gibco (Darmstadt)
Methanol pro analysis	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich (München)
Ponceau S	Sigma (München)
Propidiumiodid	Sigma Aldrich (München)
Proteingrößenstandard, Odyssey®	LI-COR (Lincoln, NE, USA)
RNase A	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS ultra pure >99%	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	BioRad Laboratories (München)

Trizma base 99%	Sigma (München)
Trypanblau 0,2%	Sigma (München)
Trypsin 10x Solution	Gibco® Invitrogen (Paisley, GB)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

Kits

DAPI	PromoKine (Heidelberg)
Caspase-3 Staining Kit	PromoKine (Heidelberg)
Caspase-9 Staining Kit	PromoKine (Heidelberg)

2.1.4 Protein-Standard & Antikörper

Protein-Standard

Page Ruler™ Prestained Plus Protein Ladder von ThermoScientific

Antikörper

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Quelle	Zielspezies	Verdünnung	Firma
XIAP (3B6)	Kaninchen	Mensch	1:1.000	Cell signaling
clAP-1 (D5G9)	Kaninchen	Mensch	1:1.000	Cell signaling
clAP-2 (58C7)	Kaninchen	Mensch	1:1.000	Cell signaling
GAPDH Clone 71.1	Maus	Mensch	1:4.000	Sigma-Aldrich

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Blocking-Puffer	5% (w/v) Milchpulver in 1xTBS
Elektrophorese-Puffer	0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin pH 8,3
PBS	80 mM NaHPO ₄ 20 mM NaH ₂ PO ₄ 0,1 M NaCl
Ponceau-S-Lösung	0,5g Ponceau 1ml Eisessig ad. 100ml Aqua dest.
Primäre-Antikörper-Pufferlösung	5% w/v BSA 0,1 % Tween-20 in TBS
SDS 6x Ladepuffer	60 % (v/v) Glycerol 300 mM Tris-HCl; pH 6,8 12 mM EDTA 12 % (w/v) SDS 850 mM Mercaptoethanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Transferpuffer	25 mM Tris-HCL; pH 8,5 0,2 M Glycin 20% (v/v) Methanol
Waschpuffer TBS	0,1M Tris-HCl; pH 7,5 0,15 M NaCl
Waschpuffer TBS-T	0,1M Tris-HCl; pH 7,5 0,15 M NaCl 0,2% Tween 20
Zelllysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton 0,1% (w/v) SDS pro 10ml Lyspuffer wurde nach Herstellerangaben je eine Mini-Protease-Inhibitor Tablette (Roche) zugegeben.

2.1.6 Medien für die Zellkultur und Zusätze

Tabelle 4: Übersicht der Zellkulturmedien und ihrer Zusätze

Medium	Zusammensetzung
RPMI-1640 Medium zur Kultivierung der Jurkat Zellen	RPMI-1640 mit 4,5g/l Glucose (Gibco) 1% L-Glutamin 10% FCS Penicillin (100 Units/ml) / Streptomycin (100µg/ml) (Gibco)

2% FCS RPMI-1640 Medium zur Behandlung der Jurkat-Zellen mit den Mimetika

RPMI-1640 mit 4,5g/l Glucose (Gibco)
1% L-Glutamin
2% FCS
Penicillin (100 Units/ml) / Streptomycin (100µg/ml) (Gibco)

2.1.7 Mimetika

Tabelle 5: Smac-Mimetika und ihre molekulare Masse

Substanz	Molekulare Masse (g/mol)	Nr.
LBPS01	411,1	1
LBPS02	445,471	
LBPS03	475,96	2
LBPS05	509,06	3
LBPS06	383,404	
AT-406	561.71	

In der nachfolgenden Tabelle werden die Smac-Mimetika mit ihren entsprechenden Molekulargewichten und der entsprechenden Nummerierung aus der Veröffentlichung aufgelistet (Carosati et al., 2015).

2.1.8 Zytostatika

SuperKillerTRAIL™

ENZO Life Sciences

2.1.9 Software und Webtools

Microsoft Word, Excel und PowerPoint Vers. 2007/16

Adobe Photoshop CS 4

Paint Vers. 20H2

FlowJo X

FCS Express

AxioVision Microscope Software

LI-COR Image Studio 3.1

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

ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Grundlage für die Versuche in dieser Arbeit war eine leukämische Suspensionszelllinie, die aus dem Blut eines an akuter T-Zell Leukämie erkrankten Jungen gewonnen wurde (*Schneider et al., 1977*). Diese sogenannten Jurkat-Zellen, wurden abhängig von ihrer Zelldichte alle 4-5 Tage passagiert, wobei die Zellen kontinuierlich in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten wurden, um eine Selektion und Synchronisation der Zellen zu vermeiden. Jurkat-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Grundfläche bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (V/V) CO₂ in folgender Nährlösung kultiviert:

RPMI-1640 Medium supplementiert mit	10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin 1% HEPES
-------------------------------------	--

Für die Passagierung erfolgte zunächst die Zentrifugation der Zellsuspension bei 700 g für 5 Min und 4°C (Heraeus Megafuge1.0 R). Danach wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 5ml PBS gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Nach erneuter Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Für Versuche wurden die Zellen in einer definierten Anzahl auf Zellkulturplatten ausgesät. Da es sich um eine Suspensionszelllinie handelt, konnten die geplanten Behandlungen direkt erfolgen.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmungen mittels der Neubauer-Kammer

Für die Ermittlung der Zellzahl, wurde durch lichtmikroskopische Auszählung eines Aliquots die Neubauerzählkammer verwendet. Die Zählkammer wird auf einer Glasplatte gebildet, auf

der in der Mitte kleine Quadrate definierter Größe eingätzt sind. Ein Deckglas wird angehaucht und über der Grundplatte angebracht bis Newton Ringe erscheinen. Diese sind ein Merkmal dafür, dass das Deckglas und die Zählkammer dicht aufeinander liegen. Werden Zellen in den von Grundplatte und Deckglasunterseite entstandenen Raum pipettiert, kann durch Auszählen der Zellen in diesen Quadraten die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden. Hierzu wurde die erstellte Zellsuspension mit Trypanblau 0,2% verdünnt. Der Farbstoff ist membran-durchlässig und färbt daher nur tote Zellen blau an, wobei die lebenden Zellen nicht angefärbt werden und hell leuchten. Durch das Auszählen aller lebenden Zellen in allen 8 Eckquadraten der Neubauerkammer kann die Zellkonzentration der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl}_{\text{susp.}} [\text{Zellen/ml}] = n/8 * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das „n“ steht für die Anzahl der gezählten Zellen, 10^4 ist der Kammerfaktor und der Verdünnungsfaktor ist abhängig von der Zugabe des entsprechenden Volumens an Trypanblau.

2.2.1.3 Zellzählung und Proliferationsassay mittels der Scepter Cell-Counter Pipette

Die Scepter Cell-Counter Pipette stellt eine automatische Zellzählpipette dar. Sie erfasst jede einzelne Zelle die über die Sensor-Pipettenspitze aufgenommen wird. Hierfür wird die Spitze der Pipette in eine Zellsuspension eingetaucht, die ein definiertes Volumen von 50 μl aufnehmen kann. Das Gerät berechnet die Erhöhung des elektrischen Widerstandes, jeder einzelnen vorbeifließenden Zelle. Nach dem Ohm'schen Gesetz, resultiert aus dieser Erhöhung eine Erhöhung der elektrischen Spannung.

$$U = I * R$$

U = Spannung
I = elektrische Strom
R = Widerstand

Aus dieser Spannungsänderung werden die Zellzahl/ml bestimmt und ein Histogramm erstellt, welches Informationen über die Zellgröße und -durchmesser erfasst. Anhand dessen lassen

sich verschiedene Informationen einer Zellpopulation ableiten und durch das Setzen von „Gates“ kann das Histogramm weiterbearbeitet werden.

Diese Technik wurde in den verschiedenen Versuchen angewandt, um festzustellen ob sich nach Behandlungen mit verschiedenen Substanzen die Population der Jurkat-Zellen verändert. Anhand der ermittelten Werte der Proliferationsassays konnten Wachstumskinetiken erstellt werden. Diese dienen dazu, die Anzahl der für die Behandlung auszusäenden Zellen zu bestimmen.

2.2.1.4 Mikroskopische Dokumentation

Jurkat-Zellen wurden mit den neuartigen Smac-Mimetika und der Lösungskontrolle behandelt. Die Reduktion der Zellzahlabnahme wurde mithilfe eines Lichtmikroskops beobachtet und mit einer Mikroskop-Kamera (Leica DFC 320) dokumentiert.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen

2.2.2.1 Apoptosenachweis nach Nicoletti

Die von Nicoletti etablierte Methode der Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid wurde erstmals 1991 im Journal of Immunological Methods veröffentlicht. Mittels dieser Methode kann Apoptose in Zellen gemessen werden. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Propidiumiodid als Nukleinsäureinterkalator wirkt. Dabei ist die Fluoreszenzintensität des PI in etwa proportional zur Anzahl der Basen, weshalb es zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen genutzt werden kann. In apoptotischen Zellen, wird DNA durch Endonukleasen fragmentiert und freigesetzt. Dies hat zur Folge, dass der DNA-Gehalt in apoptotischen sub-G1 Zellen geringer ist als in gesunden G0/G1 Zellen. Somit ist es möglich die relative Menge an apoptotischen Zellen im Fluoreszenzhistogramm zu beurteilen.

Für die Behandlung und darauffolgende durchflusszytometrische Messung der Jurkat-Zellen wurde eine 2% FCS Zellsuspension hergestellt und in 12-Well-Platten ausgesät. Die Anzahl der Zellen/ml richtet sich nach der Behandlungsdauer. Bei weniger als 48 Stunden wurden $2 \cdot 10^5$

Zellen pro Milliliter ausgesät. Für 48 Stunden wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter und für Behandlungen, die über 3 bis 5 Tage gingen, wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml eingesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 .

Das PI Assay der Jurkat-Zellen wurde für die Etablierung der Positivkontrolle AT-406, die Behandlungen mit den neuartigen Smac-Mimetika, die TRAIL Versuche und die Kombinationsbehandlung von TRAIL und AT-406 verwendet.

Nach der Behandlung der Zellen und erfolgter Inkubation werden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 4 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und wie bereits beschrieben zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand wieder verworfen und es erfolgt die Fixation der Zellen mit 1 ml eisgekühltem 70%igem Ethanol. Dies macht die Zellen für das PI permeabel. Nun gibt es die Möglichkeit die Zellen bei 4°C für ca. 2 Wochen zu lagern und zu einem späteren Zeitpunkt mit dem Assay weiterzumachen oder die Zellen werden für 2 Stunden im Eisbad gelagert bis zur Durchführung der nächsten Arbeitsschritte. Danach werden die Proben für 4 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird wieder der Überstand verworfen, mit 1 ml PBS gewaschen und für 4 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt und anschließend erfolgte die Resuspension mit Propidiumiodid. Das PI wurde jeweils wie folgt angesetzt:

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid

gelöst in PBS

Danach wurden die Zellen in einem abgedunkelten Wasserbad von 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine abgedunkelte Lagerung der Proben im Eisbad und die Messung am Durchflusszytometer.

Die PI Färbung und anschließende Messung am Durchflusszytometer erlaubt eine Aussage über die Anzahl der apoptotischen Zellen. Hierbei wird die DNA der zu untersuchenden Zellen angefärbt und deren Fluoreszenzeigenschaften gemessen. Daraus ergibt sich bei unbehandelten Zellen ein typisches Zellzyklusprofil. Dieses kann durch die Behandlung von Zellen mit bestimmten Substanzen verändert sein. Mit dem Setzen von Gates, ist es möglich die Zellen einer

Zellzyklusphase zuzuteilen und daraus folgend apoptotische von vitalen Zellen zu unterscheiden. Der prozentuale Anteil jeder Zellzyklusphase kann so bestimmt werden.

Die Proben der Jurkat-Zelllinie wurden im Frontscatter versus Sidescatter aufgetragen und im FL2-Kanal bei einer Wellenlänge von 590nm gemessen und ausgewertet.

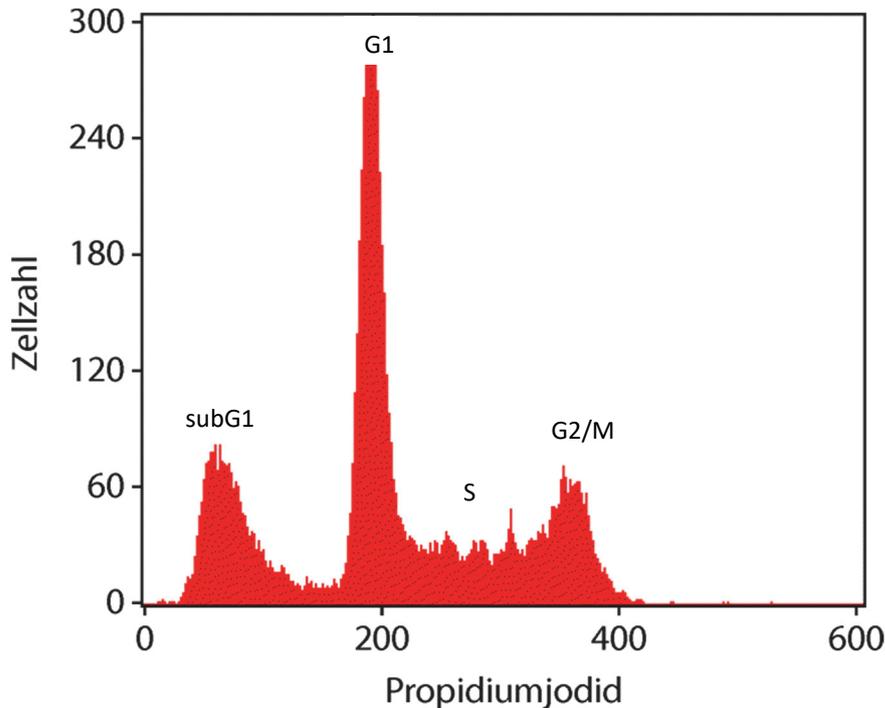


Abbildung 8: Histogramm eines normalen Zellzyklusprofils nach PI-Färbung

Das Histogramm besteht aus drei Populationen: zwei Gaußschen Verteilungskurven (G1 und G2/M) und aus der Population in der S-Phase. Apoptotische Zellen zeigen sich im subG1-Peak (*verändert nach Schmitz und Desel, 2018*).

2.2.2.2 Caspase-3 und -9 Aktivitäts-Assay mittels Durchflusszytometrie

Leitet eine Zelle die Apoptose ein, werden unterschiedliche proapoptotische Proteine aktiviert. Eine zentrale Rolle in diesem Prozess nehmen die Caspasen ein. Das Caspase Staining Kit von Promokine verwendet nichttoxische Caspasesubstrate, welche zellpermeabel sind und an aktivierte Caspasen in apoptotischen Zellen binden können. Die Caspaseinhibitoren, DEVD-FMK oder LEHD-FMK sind an einen Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt. Durch die Aktivität

der Caspase-3 oder -9 erfolgt die Spaltung der markierten Caspasesubstrate, sodass ein Fluoreszenzfarbstoff frei wird und mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Die Analyse erfolgte bei einer Wellenlänge von 530nm (Kanal FL-1).

Zunächst wurden die Jurkat-Zellen mit dem AT-406 und den Mimetika LBPS01, -03 und -05 über 48 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente eine mit 0,56% DMSO behandelte Probe. Hierfür wurde eine 2% FCS Zellsuspension hergestellt und in 12-Well-Platten ausgesät. Die Anzahl der Zellen entspricht den Angaben in Punkt 2.2.2.1 Nach Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ wurden diese in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 4 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Zunächst wird ein Master-Mix hergestellt, in dem pro 300 µl 2 % FCS Medium 1 µl von dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-DEVD-FMK oder FITC-LEHD-FMK gelöst sind. Nach Beendigung der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß 300 µl Master-Mix pipettiert. Hinterher erfolgt eine Inkubation für eine halbe Stunde bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend werden die Zellen bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 0,5 ml Wasch-Puffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Der letzte Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Die Zellen werden für die Durchflusszytometrie in 0,5 ml Wasch-Puffer resuspendiert und abgedunkelt im Eisbad gelagert.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Das Fluoreszenzmikroskop kann morphologische Veränderungen visualisieren. Die Zellen wurden wie in Punkt 2.2.2.1 vorbereitet. Nach der Behandlung der Zellen mit AT-406, LBPS01, -03 und -05 und erfolgter Inkubation über 48 Stunden werden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 4 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und wie bereits beschrieben zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand erneut verworfen und es erfolgt eine Inkubation mit der DAPI-Lösung für 15 Minuten bei 37°C. Nach erneuter Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung mit PBS, wird ein Tropfen der Lösung auf einen Objektträger gegeben. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und der Mikroskop-Software AxioVision konnten die Bilder erstellt werden.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Jurkat-Zellen

Für die Proteinextraktion aus den Jurkat-Zellen, wurde die verwendete Zellsuspension zunächst in 15 ml Falcon Röhrchen geerntet und das Medium für 5 Minuten bei 700 g und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das Pellet abhängig von der Zellmenge ebenfalls in 50-500 µl Lysepuffer H resuspendiert und für 20 Minuten im Eisbad inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Suspension mit dem Vortex durchmischt. Anschließend wurde durch Zentrifugation bei 18000g für 20 Minuten noch vorhandene Zelltrümmer pelletiert und der Überstand, das Proteinlysate, in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Proteinbestimmungen nach Bradford

Die photometrische Messung nach Bradford (1976) erlaubt eine quantitative Messung von Proteinkonzentrationen. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 kann in Lösung Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen bilden. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470nm (der protonierten braunroten kationischen Form) zu 595nm (der unprotonierten blauen anionischen Form). Da Coomassie-Blau vor allem mit basischen Aminosäuren reagiert, sollte zur Eichung ein Protein verwendet werden, das in etwa einen gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren besitzt wie das zu testende Protein. Hierfür wurde BSA (Rinderserumalbumin) verwendet.

Die Bestimmung der Konzentration beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = -\lg(I_1/I_0) = \epsilon \times c \times d$$

Wobei: E = Extinktion

I_1 = Intensität des transmittierten Lichtes

I_0 = Intensität des einstrahlenden Lichtes

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Zur Erstellung der Eichkurve wurden zunächst je 1000µl Bradford-Reagenz in sieben 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde eine 1 µg/µl BSA-Lösung angefertigt und aufsteigende Volumina der BSA-Lösung zu der Bradford-Reagenz pipettiert: 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µl. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595nm gegen eine Referenz ohne Protein gemessen. Anschließend wurde 1µl der unbekanntes Konzentration des Proteinlysats in 1000µl Bradford-Lösung pipettiert und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden ermittelt.

Für die Vorbereitung der Proben wurde für jedes Proteinlysate ein Volumen pipettiert, welches 70µg Protein entsprach. Die Proben wurden mit einem SDS-Ladepuffer versetzt, der als 4x-Lösung vorlag. Hinzu kamen 20x Reducing Agent und Wasser. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C inkubiert und auf Eis gelagert.

2.2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, die der Auftrennung von Molekülen, wie z.B. Proteinen dient. In der vorliegenden Arbeit wurde die denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewandt. Hierfür wurde ein 15%-iges Polyacrylamid Gel vorbereitet, bestehend aus Trenn- und Sammelgel. Die Mischung für beide Gele wird separat angefertigt.

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten dargestellt:

Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Page

Substanzen	Sammelgel	8% SDS-Page Trenngel	15% SDS-Page Trenngel
Pro Gel			
H ₂ O.	1,4	4,6	2,3
30% Acryamid-Mix	0,33	2,7	5
Tris	1,0 M Tris pH 6,8	1,5 M Tris pH	1,5 M Tris pH
	0,25	8,8	8,8
	0,02	2,5	2,5
10% SDS	0,02	0,1	0,1
10% APS	0,002	0,1	0,1
TEMED		0,006	0,004

Angaben in ml

Nachdem zu der Trenngel-Mischung Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie Tetramethylethyldiamin (TEMED) gegeben wurde, wird diese zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Nach dem Erhärten des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm die Taschen für die Proteinauftragung angefertigt. Das fertige Gel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) eingespannt und die vorbereiteten Proteinlysate in die Taschen aufgetragen. Als Proteinstandard wurde die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 20mA/pro Gel für 90 Minuten.

2.2.4.4 Proteintransfer (Western Blot)

Unter der Methode „Western Blot“ versteht man den Elektrotransfer von Proteinen auf eine Trägermembran (z.B. Nitrocellulosemembranen) und anschließender Detektion mittels Radioaktivität oder Chemolumineszenz. Nach abgeschlossener Proteinauftrennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dies erfolgte in einer gekühlten Transfer-Kammer von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) zwischen zwei mal zwei Lagen Filterpapier bei einer konstanten Spannung von 100V für 90 Minuten. Die Spannung wird so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran wandern. Zuvor wurden die Nitrocellulosemembran, das Filterpapier und das Gel in Transfer-Puffer getränkt.

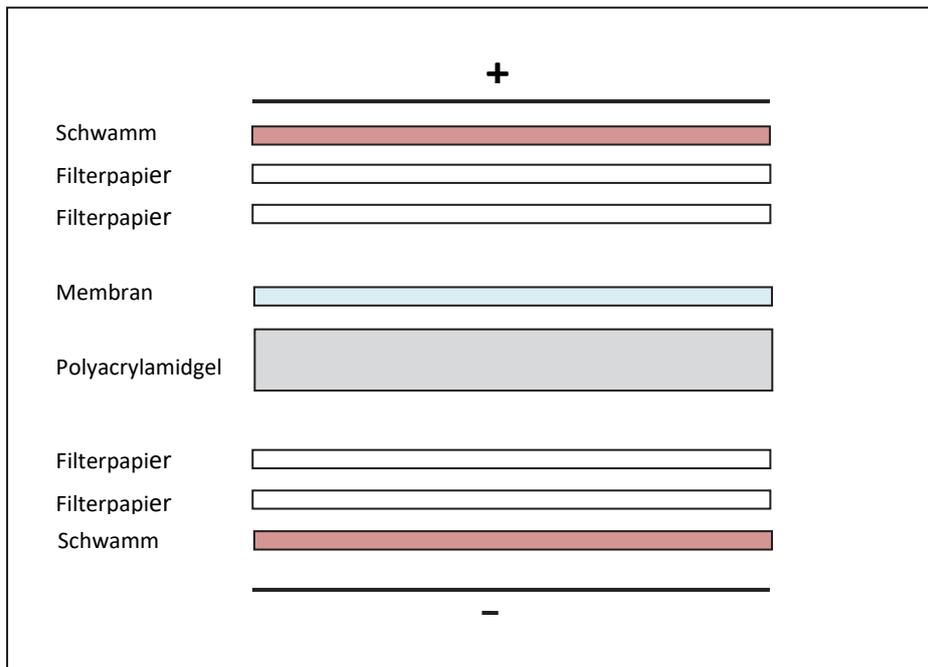


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots

Im Anschluss wurde mittels der Ponceau S-Färbung die Effektivität des Transfers nachgewiesen. Die Ponceau S-Färbung bindet reversibel an die Proteinbanden und färbt diese rot. Zum entfärben wurde Aqua dest. oder TBS verwendet.

2.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Für die Immundetektion wurde die Membran in ein Falcon-Röhrchen überführt und die freien, unspezifischen Bindestellen mit Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte für je 10 Minuten mit TBS. Die Membran wurde in einer primären Antikörper-Pufferlösung mit dem ersten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung über 3 Tage bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einem abgedunkelten Falcon-Röhrchen für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Hierfür wurde der Antikörper in einer 1:10000- Verdünnung in Blockierungspuffer angesetzt. Anschließend erfolgten die drei Waschschrte und durch die Fluoreszenzmarkierung eine Visualisierung des Proteins mit dem LI-COR Odyssey Imaging System bei 800nm.

Die Detektion des „Housekeeping-Gen“ GAPDH demonstriert, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden. Des Weiteren kann der relative Anteil des Proteins im Vergleich zu GAPDH nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran in Blockierungspuffer mit dem

GAPDH-Antikörper in einer 1:5000-Verdünnung für 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschrinen mit TBS wurde eine 1:10000-Verdünnung von LI-COR Odyssey Antikörper gegen Kaninchen für eine Visualisierung bei 700nm auf die Membran pipettiert. Es wurde erneut dreimal mit TBS gewaschen. Abschließend folgte die Visualisierung der Proteinbanden mit dem LiCor-Odyssey-Reader.

In entarteten Zellen sind IAPs entscheidend an der Resistenzvermittlung gegenüber Apoptose beteiligt, da sie häufig erhöhte Expressionslevel aufweisen. Dies macht sie zu wichtigen Zielmolekülen in der Krebstherapie. Neuartige Smac-Mimetika könnten eine Möglichkeit sein, IAPs zu binden und damit deren Proteinlevel zu neutralisieren, sodass entartete Zellen wieder die Apoptose einleiten können. Während der schriftlichen Fertigstellung dieser Arbeit, wurden erste Ergebnisse aus anschließenden Untersuchungen in Bezug auf die Zellproliferation und zugrunde liegenden Mechanismen in Jurkat-Zellen veröffentlicht (*van den Höfel et al., 2014; 2015 Carosati et al., 2015*). In dieser Arbeit wurde zunächst eine Positivkontrolle etabliert, um anschließend die neuartigen Smac-Mimetika auf die Tumorzelllinie testen zu können. Erste Hinweise bezüglich der zugrunde liegenden Zelltodmechanismen sollten bei den Substanzen mit vielversprechendem Einfluss auf die Zellproliferation beleuchtet werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob XIAP und cIAP1 Zielmoleküle der Mimetika darstellen und diese degradiert werden. Um die Wirkung von schwach wirksamen Smac-Mimetika zu erhöhen und um geringere Konzentrationen verwenden zu können, wurde geprüft, ob eine Kombinationsbehandlung von AT-406 und rekombiniertem TRAIL die Apoptosehäufigkeit in einer synergistischen Weise verstärkt.

3.1 Etablierung des Testsystems mit dem Smac-Mimetikum AT-406 als Referenzuntersuchung zur Dosis-Wirkung im zeitlichen Verlauf

In den folgenden Untersuchungen soll AT-406 als Positivkontrolle in den Jurkat-Zellen etabliert werden. Hierfür soll die optimale Konzentration und Einwirkzeit festgestellt werden. Die Experimente wurden auf der Grundlage durchgeführt, dass AT-406 in verschiedenen Zelllinien, wie Brust- und Ovarientumorzellen eine Inkubationszeit von 4 Tagen benötigt um eine Wirkung zu erzielen (*Cai et al., 2011*).

Es wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml der Jurkat-Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät und mit 10-, 50- und 100 μ M AT-406 behandelt. Das Lösungsmittel DMSO (0,56%) diene als Kontrolle. Hier wurde die gleiche DMSO Konzentration eingesetzt wie bei den Proben. So konnten mög-

liche Lösungsmittelleffekte mit einbezogen werden. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten von einem bis fünf Tagen, wurde die Lebendzellzahl erfasst. Anschließend wurde die Auswirkungen des AT-406 auf die Zellproliferation durchflusszytometrisch gemessen. Analysiert wurden die Änderungen der Zellzyklusprofile im zeitlichen Verlauf bei 590nm im Kanal FL2.

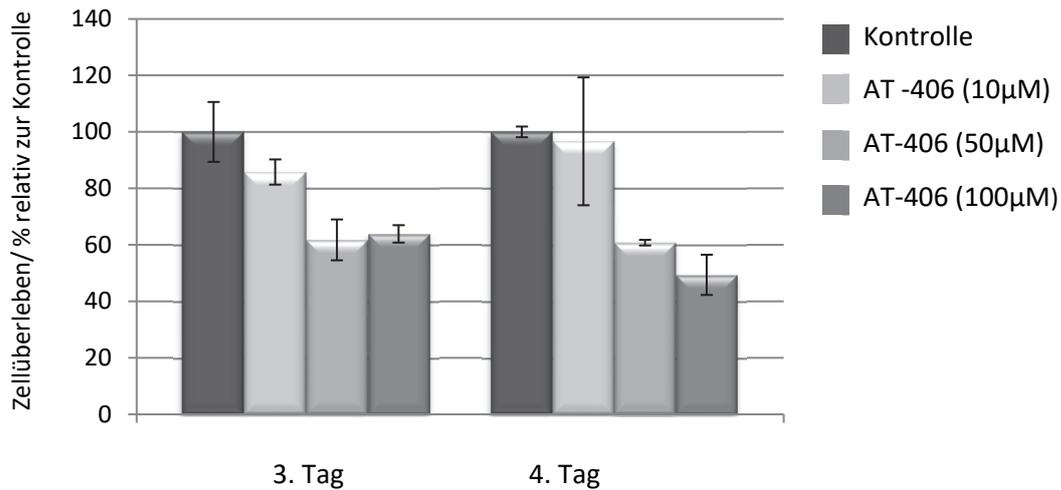


Abbildung 10: Die Wirkung von AT-406 auf die Lebendzellzahl der Jurkat-Zellen am 3. und 4. Tag nach Behandlung

Jurkat-Zellen wurden mit dem Smac-Mimetikum AT-406 in einer Konzentration von 10-, 50- und 100µM über 3 und 4 Tage behandelt. Das Zellüberleben bezieht sich auf die kontrollbehandelten Zellen (0,56% DMSO). Die Lebendzellzahl wurde durch eine direkte Zellzählung mittels Scepter Zellzählpipette erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

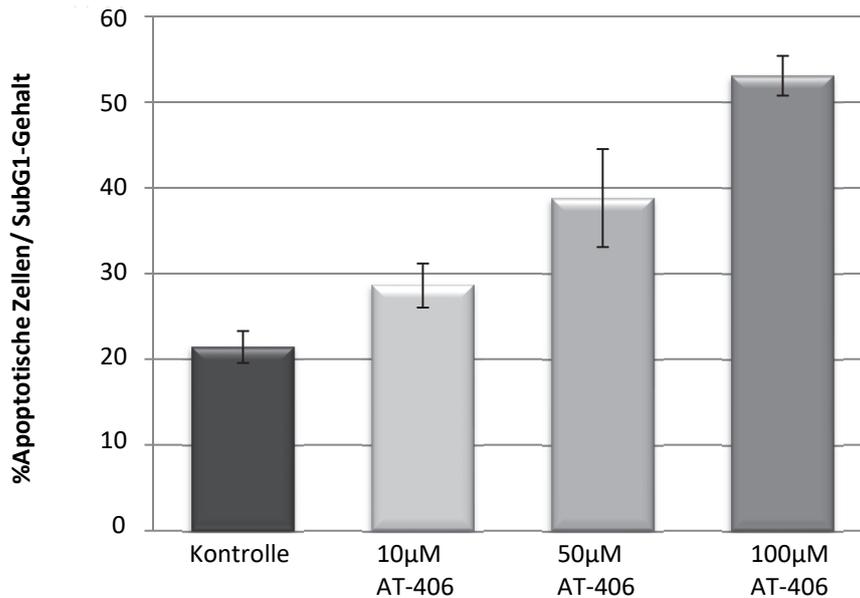


Abbildung 11: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit AT-406.

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden mit AT-406 in Konzentrationen von 10-, 50- und 100µM behandelt. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (*nach Nicoletti*). Als Kontrolle wurden Jurkat-Zellen mit 0,56% DMSO behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Bereits am 3. Tag ergab die Zellzählung eine Reduktion der Zellzahl. Eine konzentrationsabhängige Wirkung war am 3. Tag erkennbar und ließ sich am 4. Tag bestätigen. In dieser Untersuchung hatten die mit 10µM AT-406 behandelten Zellen vom 3. auf den 4. Tag wieder zugenommen. Die durchflusszytometrischen Analysen ergänzen die bereits in der Zellzählung gewonnenen Ergebnisse. Anhand des Diagrammes wird deutlich, dass es auch bei der Kontrolle zur Veränderung des Zellzyklusprofils kommt. 21±2% der Zellen weisen einen SubG1-Peak auf. Bei den mit AT-406 behandelten Zellen kommt es mit zunehmender Konzentration auch zu einer Zunahme des SubG1-Peaks. Bei 100µM sind die meisten der Zellen gestorben. Von den noch lebenden Zellen weisen mehr als 53±2% einen hypodiploiden DNA-Gehalt auf.

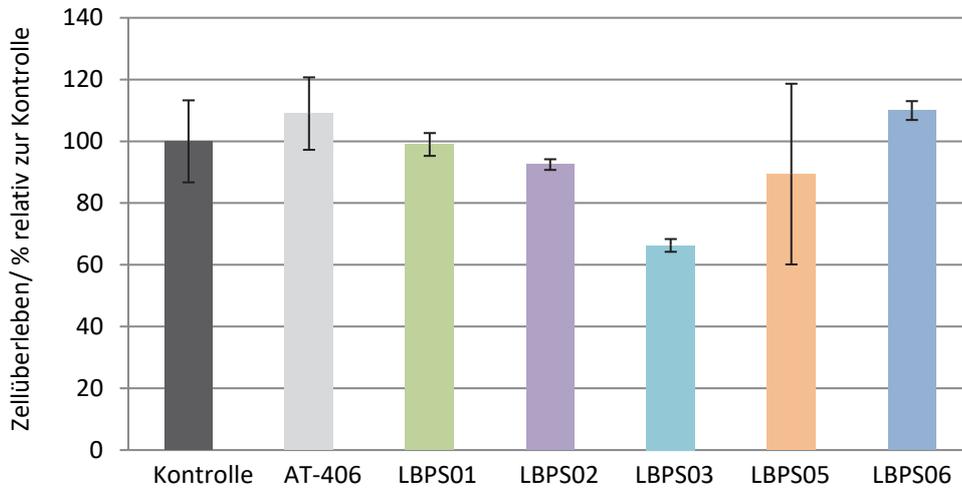
3.2 Untersuchung der Mimetika LBPS01, -02, -03, -05 und -06 auf Apoptoseinduktion und Festlegung der optimalen Wirkkonzentration

Carosati und Kollegen (2015) identifizierten mittels Liganden-basiertem virtuellen Screening neue potentielle nicht-peptidische Substanzen, die das AVPI-Motiv von Smac nachahmen und mit BIR-Domänen von IAPs interagieren sollten. Zu dem Zeitpunkt meiner Arbeit wurden 31 mögliche IAP-Antagonisten identifiziert. Im Rahmen einer Kooperation wurden uns diese Substanzen zur Verfügung gestellt. In dieser Dissertation wurden Methoden etabliert, die es erlauben die Wirkung von fünf dieser monovalenten Smac-Mimetika auf die Zellproliferation von Jurkat-Zellen zu testen.

Um feststellen zu können, ob die ausgewählten Smac-Mimetika überhaupt eine Wirkung auf die Proliferation der Jurkat-Zellen haben, wurde die Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten erfasst. Um aktive von inaktiven Mimetika zu unterscheiden wurden die Jurkat Zellen mit Konzentrationen von $1\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ behandelt. In Anlehnung an die durchgeführten Versuche mit dem AT406 wurde die Konzentration und das Wirkfenster gewählt.

Hierfür wurden gleiche Zellzahlen von Jurkat-Zellen mit LBPS01, -02, -03, -05 und -06 behandelt. Nach 24, 48, 72 sowie 96 h Inkubation wurden die absoluten Zellzahlen durch Zellzählung mittels der Zellzählpipette erfasst. Es konnte eine signifikante Auswirkung auf die Lebendzellzahl bei den Substanzen LBPS01, -03 und -05 in Bezug zur unbehandelten Kontrolle nach 72h gemessen werden. Bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zeigt sich bereits eine Tendenz der möglichen wirksamen Mimetika, die sich bei einer höheren Konzentration von $10\mu\text{M}$ bestätigt. LBPS01 zeigt eine Abnahme der Zellzahlen auf ca. $33\pm 8,4\%$ bei $10\mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu werden bei $1\mu\text{M}$ keine Veränderungen beobachtet. Die Lebendzellzahl bei den mit LBPS03 behandelten Zellen verringert sich bereits bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ um ein Drittel. Bei $10\mu\text{M}$ haben sich die Zellzahlen auf einen Wert von $30\pm 6\%$ weiter reduziert. Weiter ist zu beobachten, dass sich die Lebendzellzahlen unter der Behandlung von LBPS05 bei $10\mu\text{M}$ auf einen Wert von $43,8\pm 3\%$ reduziert hat. Im Vergleich dazu ist die Lebendzellzahl bei $1\mu\text{M}$ noch doppelt so hoch. LBPS02 zeigt sowohl bei $1\mu\text{M}$ als auch bei $10\mu\text{M}$ eine minimale Abnahme der Zellzahlen. Weitere Versuche wurden mit LBPS01, -03 und -05 durchgeführt, da diese neuartigen Substanzen gute antiproliferative Effekte erzielen konnten. LBPS02 und -06 zeigt keine signifikante Wirkung, sodass diese Substanzen für weitere Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Smac-Mimetika 1 μ M



Smac-Mimetika 10 μ M

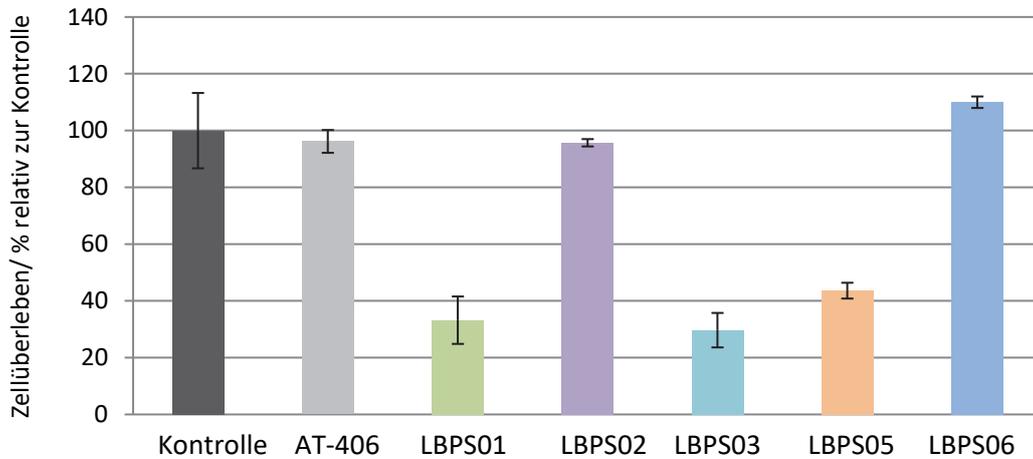


Abbildung 12: Die Wirkung von LBPS01, -02, -03, -05 und -06 auf die Lebendzellzahl der Jurkat-Zellen am 3. Tag nach Behandlung

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit neuartigen Smac-Mimetika in einer Konzentration von 1- und 10 μ M behandelt. Das Zellüberleben bezieht sich auf die kontrollbehandelten Zellen (0,56% DMSO). Die Lebendzellzahl wurde durch eine direkte Zellzählung mittels Scepter Zellzählpipette erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

3.2.1 Bestimmung der optimalen Wirkungsdauer bei vorselektierten Mimetika

Für die Untersuchung der optimalen Wirkungsdauer wurden die Jurkat-Zellen erneut mit den aus Punkt 3.2. vorselektionierten Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 für fünf Tage inkubiert. Hierfür wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml der Jurkat-Zelllinie in 12-well-Platten ausgesät und mit den Mimetika behandelt. Wie nach der unter Punkt 2.2.1.3 beschriebenen Methode, wurden alle 24 h die Auswirkung der Smac-Mimetika auf die Lebendzellzahl bestimmt, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

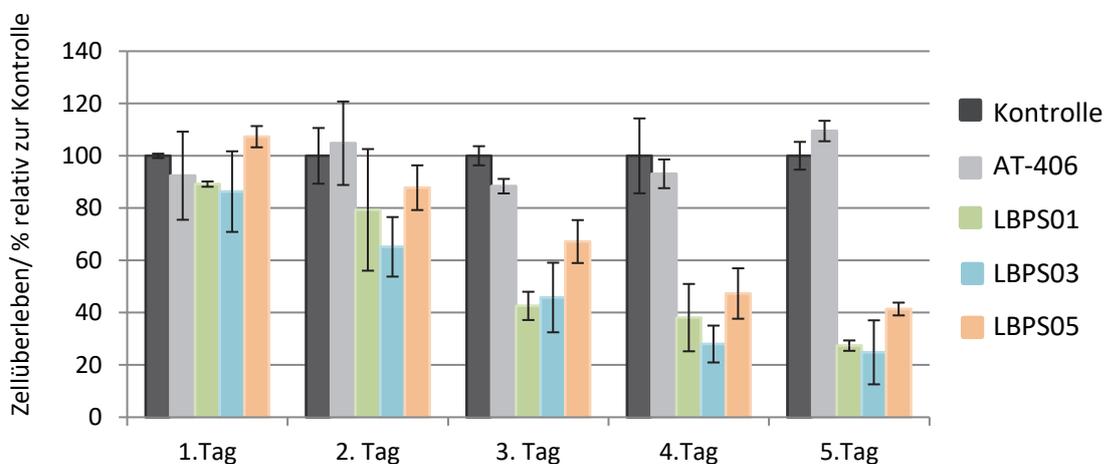


Abbildung 13: Die Wirkung der vorselektierten Smac-Mimetika auf die Zellproliferation in Jurkat-Zellen im zeitlichen Verlauf

Jurkat-Zellen wurden mit den Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ behandelt. Nach 24-, 48-, 72-, 96- und 120 h wurde die Lebendzellzahl durch eine direkte Zellzählung mittels der Scepter Zellzählpipette erfasst. Als Kontrolle wurden Zellen mit 0,56% DMSO behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen ($n=3$).

Es zeigt sich, dass die Jurkat-Zellen sensitiv auf die drei getesteten Mimetika reagieren und die Lebendzellzahlen der mit LBPS01, -03 und -05 behandelten Jurkat-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Probe und der Positivkontrolle im zeitlichen Verlauf kontinuierlich abnehmen. Um die Wirksamkeit der Substanzen in Bezug auf die verwendeten Konzentrationen vergleichen zu können, wurden auch die Zellen der Positivkontrolle mit $10 \mu\text{M}$ behandelt.

3.3 Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen des Zelltodes

3.3.1 Zellzyklusanalyse nach Nicoletti

In vorherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 bei einer Konzentration von 10µM einen signifikanten Einfluss auf die Lebendzellzahlen der Jurkat-Zellen haben. Im Weiteren soll geklärt werden, welche Mechanismen dem Zelltod zu Grunde liegen. Hierfür wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Da DMSO als Lösungsvermittler der Mimetika eingesetzt wurde, dienten jeweils gleiche DMSO Konzentrationen als Kontrolle. Für die Behandlung wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in 12-well-Platten ausgesät. Die Mimetika wurden jeweils in einer Konzentration von 10µM zu den Zellen gegeben. Inkubiert wurden die Zellen über einen Zeitraum von 2 bis 3 Tagen, anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometer.

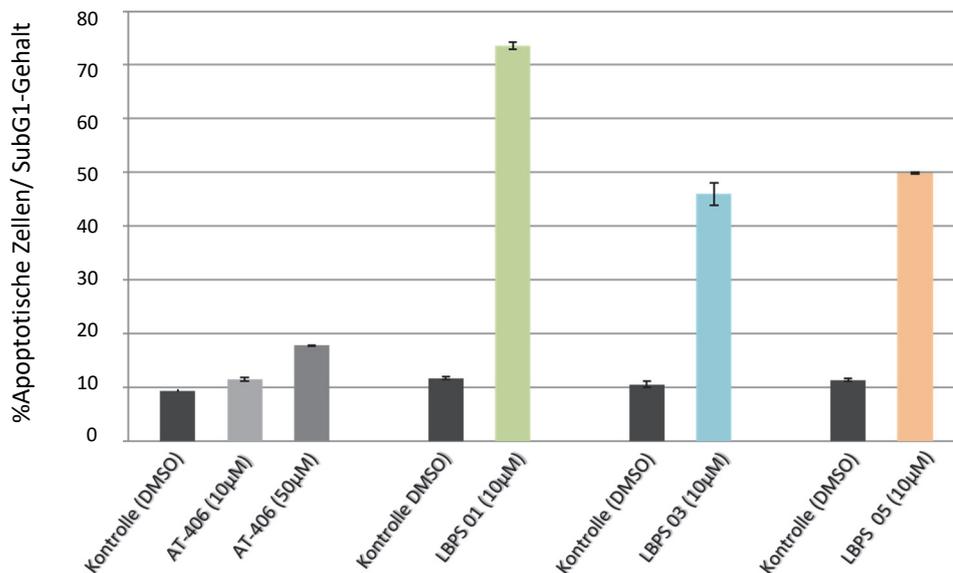


Abbildung 14: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit den Smac-Mimetika nach 72 Stunden.

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit den Mimetika LBPS01, -03 und -05 in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Zusätzlich dienten 10 und 50µM mit AT-406 behandelten Zellen als Positivkontrolle. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (*nach Nicoletti*). Als Kontrolle diente die jeweils gleiche DMSO Konzentration wie in den behandelten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Nach einer 72-stündiger Inkubationsdauer stieg die Anzahl der Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt, die unter Einfluss der Mimetika LBPS01, -03 und -05 standen. Die Kontrollen weisen einen SubG1-Peak von ca. 10 % auf. Im Vergleich dazu, kommt es bei den mit 10µM AT-406 behandelten Zellen konzentrationsabhängig zu einer minimalen Erhöhung des SubG1-Peaks. In der Auftragung als Dot-Plot wird deutlich, dass die Population der mit den Mimetika behandelten Zellen drastisch abgenommen hat. Von den noch lebenden Zellen befindet sich ein großer Anteil im SubG1-Areal. So ist bei LBPS01 ein hypodiploider DNA-Gehalt von über 74±1,0%, bei LBPS03 46±4,6% und bei LBPS05 50±0,3% zu vermerken. Es waren nicht ausreichend Zellen vorhanden für weitere Untersuchungen, sodass die Behandlung wiederholt und die Zellen bereits nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden geerntet wurden.

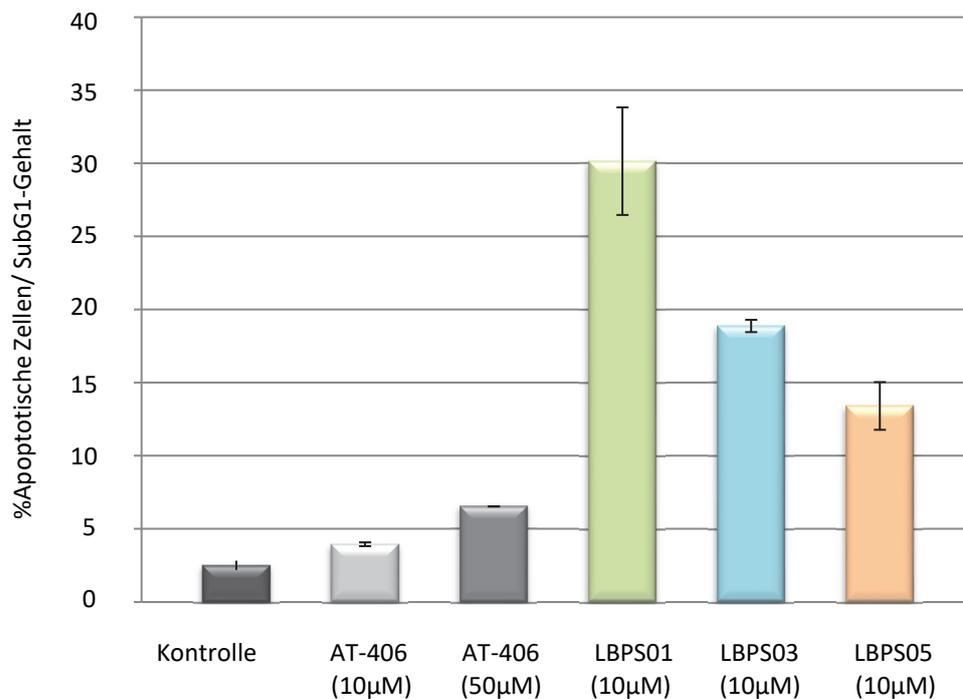


Abbildung 15: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit den Smac-Mimetika nach 48 Stunden.

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit den Mimetika LBPS01, -03 und -05 in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Zusätzlich dienten 10 und 50µM mit AT-406 behandelten Zellen als Positivkontrolle. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (nach Nicoletti). Als Kontrolle wurden Jurkat-Zellen mit 0,56% DMSO behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Die Versuche bestätigen die schon nach 72 Stunden gemessene Apoptosehäufigkeit. Über $30\pm 3,7\%$ der mit LBPS01 behandelten Zellen befinden sich im SubG1-Peak. Unter dem Einfluss von LBPS03 und LBPS05 stieg die Zahl der Zellen mit hypodiploden DNA-Gehalt auf $19\pm 1\%$ bzw. $13,4\pm 1,6\%$.

Um die Apoptose nicht nur quantitativ zu messen, sondern auch eine optische Darstellung zu erlangen, wurde mittels DAPI-Färbung und anschließender Aufnahme an einem Fluoreszenzmikroskop die morphologischen Veränderungen des Chromatins des Zellkerns visualisiert. Charakteristisch für apoptotische Prozesse ist die Segmentierung des Zellkerns, die intra-periphere Chromatinkondensation und die Bildung apoptotischer Körperchen. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen nach Mimetika-Behandlung typische Apoptose Erscheinungen, wie Schrumpfung und Fragmentierung der Zellkerne in Membranvesikel (Apoptosekörper) (*Blatt und Glick, 2001*). Mittels Lichtmikroskop konnte die Reduktion der Zellzahl der Jurkat-Zellen dokumentiert werden. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird eine abnehmende Zelldichte nach Mimetika Behandlung erkennbar. Im Vergleich zur Kontrolle, zeigen alle drei Smac-Mimetika bereits nach 48 Stunden eine Reduktion der Zelldichte, wobei dieser Effekt bei LBPS03 und -05 am stärksten zu verzeichnen ist. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass Tumorzellen durch die Wirkung der Substanzen sterben.

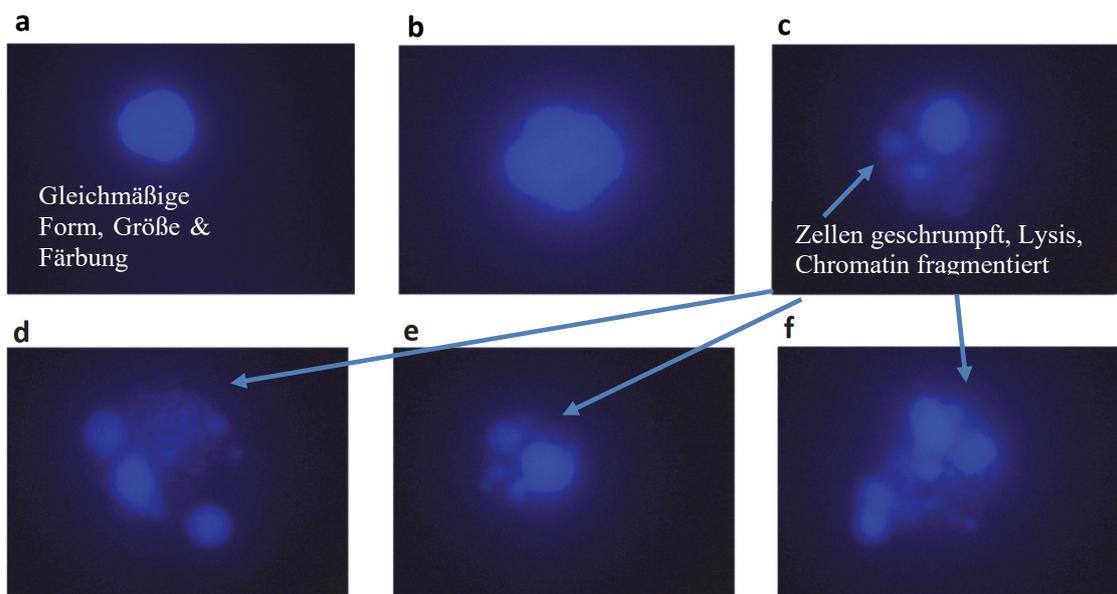


Abbildung 16: Darstellung von fragmentierten Zellkernen in Jurkat-Zellen mittels DAPI-Färbung

Die ausgewählten Aufnahmen zeigen repräsentative Areale. **a:** Negativkontrolle, nach 48-stündiger Inkubation mit 2%FCS Medium; **b:** Negativkontrolle, nach 48-stündiger Inkubation mit Lösungsmittel (DMSO). **c:** nach 48-stündiger Inkubation mit $50\mu\text{M}$ AT-406; **d:** nach 48-stündiger Inkubation mit $10\mu\text{M}$ LBPS01; **e:** nach 48-stündiger Inkubation mit $10\mu\text{M}$ LBPS03; **f:** nach 48-stündiger Inkubation mit $10\mu\text{M}$ LBPS05;

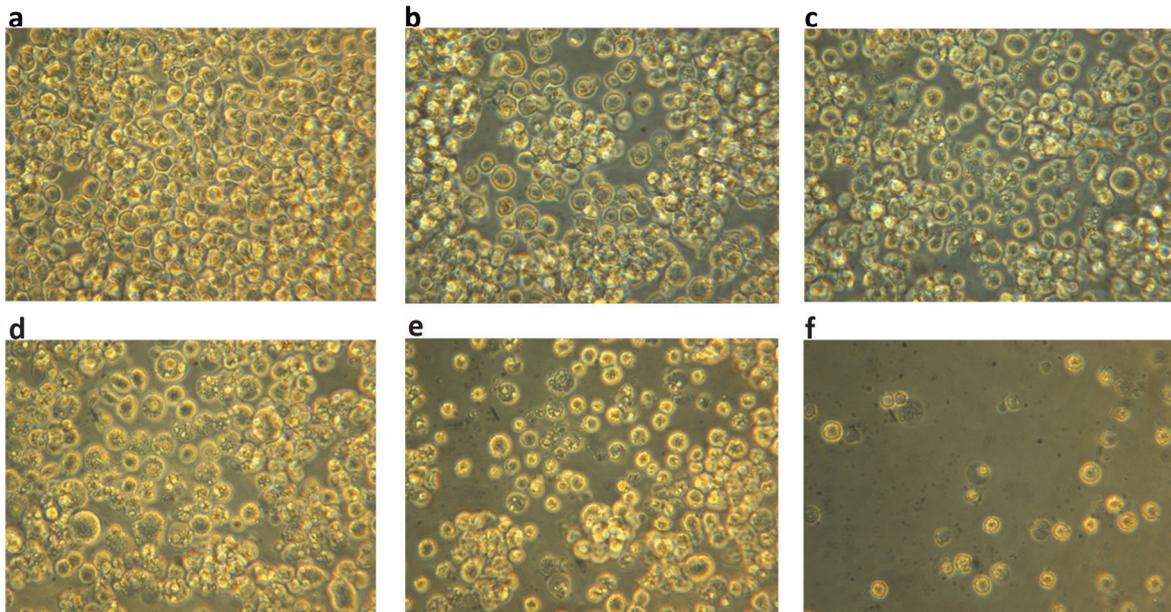


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Evaluation der Wirkung von Smac-Mimetika auf die Jurkat-Zellen

Die Zellen wurden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert und nach 2 Tagen erfolgte die Aufnahme der Veränderungen der Zellen und der Zelldichte. Die ausgewählten Aufnahmen wurden in einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen und zeigen repräsentative Areale; **a**: Negativkontrolle, Aufnahme der mit 2% FCS Medium inkubierten Zellen; **b**: Negativkontrolle, Aufnahme der mit DMSO inkubierten Zellen. **c**: Aufnahme der mit 50µM AT-406 behandelten Zellen. **d**: Aufnahme der mit 10µM LBPS01 behandelten Zellen. **e**: Aufnahme der mit 10µM LBPS03 behandelten Zellen. **f**: Aufnahme der mit 10µM LBPS05 behandelten Zellen.

3.3.2 *Nachweis Apoptotischer Zellen mittels Aktivierung der Caspase-9- und Caspase-3*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass LBPS01, -03 und -05 in Jurkat-Zellen zu einer Veränderung des Zellzyklusprofils führen. Der subG1-Peak nimmt zu, was ein direkter Beweis für eine Apoptose in der Zellpopulation darstellt. Da Caspasen eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose spielen und deren Aktivierung einen weiteren direkten Beweis für einen programmierten Zelltod darstellen, wurden Caspase Assays durchgeführt. Im Weiteren wurde getestet, ob es nach Behandlung mit den Smac-Mimetika zu einer Reaktivierung von Caspase-3 und -9 kommt.

Hierfür wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in 12-well-Platten ausgesät und mit den Smac-Mimetika behandelt. Da DMSO als Lösungsvermittler der Mimetika eingesetzt wurde, dienten mit 0,56%

DMSO behandelte Zellen als Kontrolle. LBPS01, -03 und -05 wurden jeweils in einer Konzentration von 10µM zu den Zellen gegeben, wobei 50µM AT-406 eingesetzt wurde. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen mit den jeweiligen Caspasesubstraten versetzt. Es erfolgt eine enzymatische Spaltung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Caspasesubstraten zum Nachweis einer Caspase-9 und -3 Aktivität. Mittels durchflusszytometrischen Analysen bei einer Wellenlänge von 530nm (Kanal FL1) kann eine Caspase-Aktivierung in apoptotischen Zellen gemessen werden.

Betrachtet wurden sowohl unbehandelte Zellen zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz als auch die behandelten Zellen. Durch Setzen eines Polygons (R1) ist es möglich, die detektierte Zellpopulation in einem Histogramm isoliert zu betrachten. Das Histogramm kann durch das Einzeichnen von Gates (Analysefenstern) weiter untersucht werden. Zellen, die keine Caspase-Aktivität aufweisen, liegen in der ersten Zehnerpotenz, wobei Caspase-aktive Zellen in der zweiten und dritten Zehnerpotenz liegen.

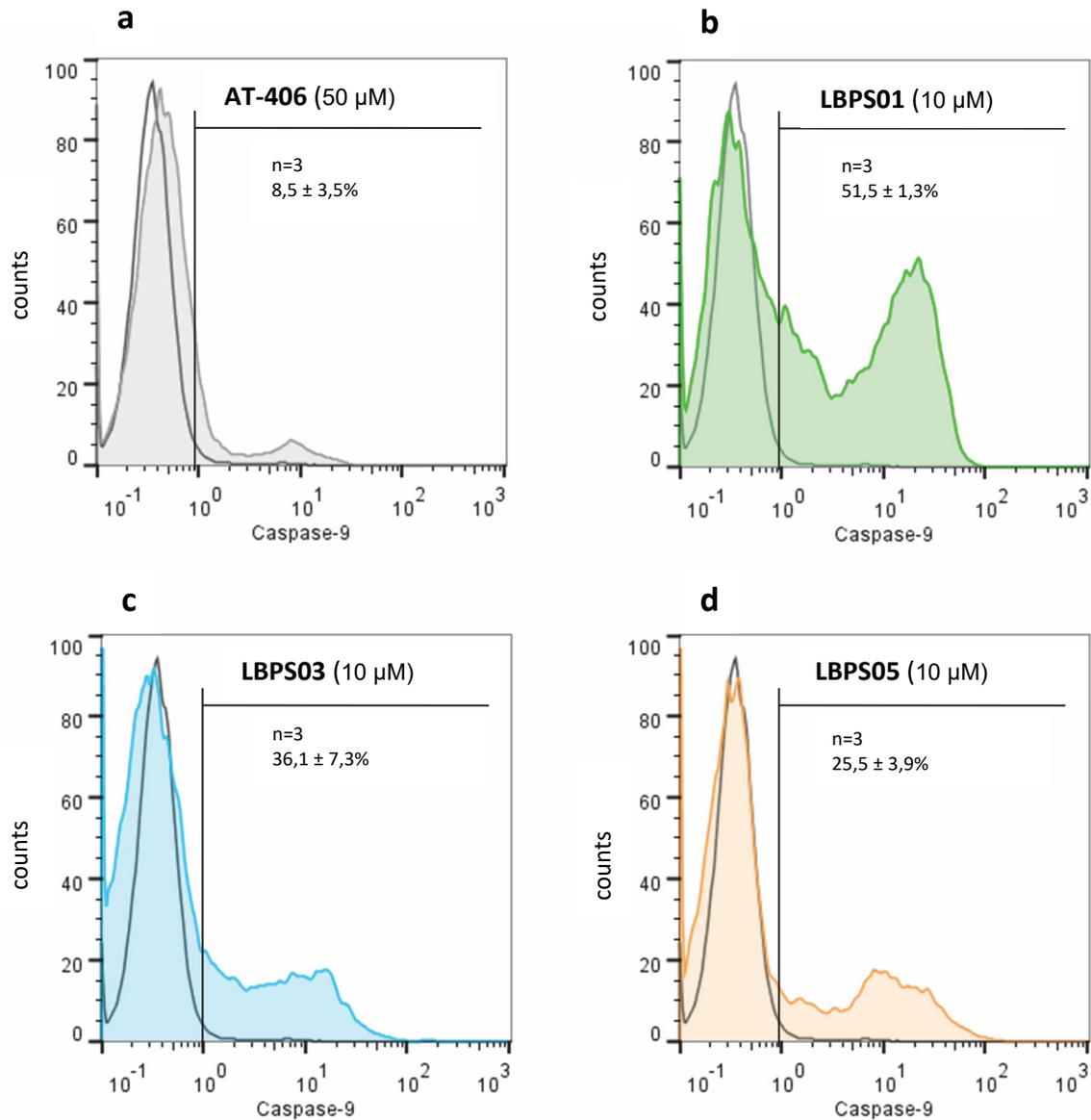


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspase-9 Aktivierung in AT-406, LBPS01-, LBPS03- und LBPS05-behandelten Jurkat-Zellen

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen (y-Achse) versus intrazellulärer Caspase-9 Aktivität (x-Achse) gemessen im Kanal FL1 bei 530nm. Die Negativkontrolle ist in a), b) c) und d) jeweils als dunkelgraues Histogramm zu erkennen. Jurkat-Zellen wurden über einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden mit entsprechenden Substanzen behandelt und die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen mit Hilfe des Caspase-Staining-Kits von Promokine am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

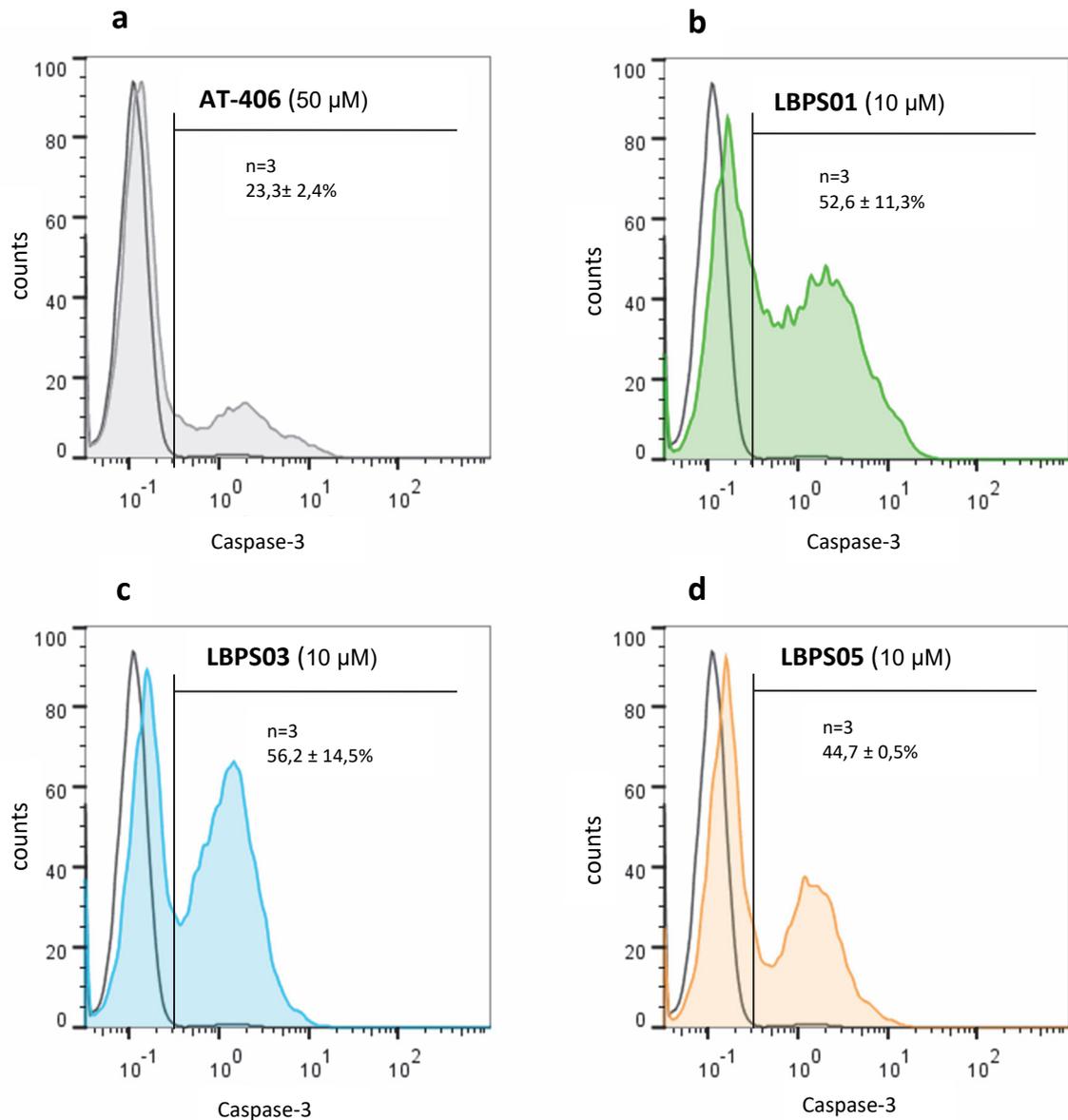


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur intrazellulären Caspase-3 Aktivierung in AT-406, LBPS01-, LBPS03- und LBPS05-behandelten Jurkat-Zellen

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen (y-Achse) versus intrazellulärer Caspase-9 Aktivität (x-Achse) gemessen im Kanal FL1 bei 530nm. Die Negativkontrolle ist in a), b) c) und d) jeweils als graues Histogramm zu erkennen. Jurkat-Zellen wurden über einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden mit entsprechenden Substanzen behandelt und die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen mit Hilfe des Caspase-Staining-Kits von Promokine am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Anhand der Histogramme wird deutlich, dass bei allen getesteten Mimetika sowohl eine Reaktivierung der Caspase-3 wie auch der Caspase-9 stattfinden. Dabei zeigt Caspase-9 eine geringere Aktivität als Caspase-3.

Abbildung 18) zeigt die Caspase-9 Aktivität der Jurkat-Zellen durch Mimetikaeinfluss nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen. Die unbehandelten Zellen wiesen eine minimale Caspase-9 Aktivität auf. Bei dem AT-406 bewirkten 50 μ M eine Caspase-9 Aktivierung von $8,5 \pm 3,5\%$. Das Smac-Mimetikum LBPS01 kann bei $51,5 \pm 1,3\%$ Caspase-9 Aktivität hervorrufen. LBPS03 zeigte eine Caspase-9 Aktivität von $36 \pm 7,3\%$. Bei LBPS05 wurde am geringsten Caspase-9 Aktivität nachgewiesen.

In Abbildung 19) wird die Aktivierung der Effektorcaspase-3 in Jurkat-Zellen durch Einfluss von drei zellzahlreduzierenden Smac-Mimetika in einer Konzentration von 10 μ M getestet. Ebenso wird auch die im Proliferationsassay etablierte Positivkontrolle AT-406 in der Konzentrationen mit 50 μ M auf ihre Fähigkeit Caspase-3 zu aktivieren untersucht. AT-406 bewirkte eine Caspase-3 Aktivität von $23,3 \pm 2,4\%$. Durch den Einfluss der Mimetika konnte in allen Zellen Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden. LBPS01 und 03 zeigten den stärksten Effekt. Bei LBPS01 wiesen $52,6 \pm 11,3\%$ der Zellen eine Caspase-3 Aktivität auf. Bei LBPS03 waren es $56 \pm 14,5\%$ und bei LBPS05 $44,7 \pm 0,5\%$ der Zellen, wo Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden konnte.

3.3.3 Expression von XIAP und cIAP1 in Jurkat-Zellen und deren Degradation nach Behandlung mit Smac-Mimetika

Das Ziel der neu entwickelten Smac-Mimetika ist die Hemmung der wichtigsten Vertreter der IAPs; XIAP, cIAP1 und cIAP2. Insbesondere XIAP spielt hierfür eine entscheidende Rolle, da es zu einer fehlerhaften Überaktivierung und damit zur Hemmung der Caspasen kommt. Die Smac-Mimetika wurden so synthetisiert, dass sie das AVPI-Motiv von Smac nachahmen, an die BIR-Domäne der IAPs binden und damit inaktivieren, sodass die Zelle wieder in die Apoptose eintreten kann. Dieser Prozess sollte daher zu einer Ubiquitinierung mit anschließender Degradation der IAPs führen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AT-406 in MDA-MB-231 Zellen eine Degradation von cIAP1 bewirkt (Cai et al., 2011). Über ein Quantifizierungsverfahren können Proteinbanden des „protein of interest“ relativ zu Proteinbanden eines Housekeeping-Gens, betrachtet werden, so dass Aussagen über den Expressionslevel der IAPs in Folge von Mimetikaeinfluss getroffen werden können. Im Folgenden sollen die Jurkat-

Zellen auf eine Expression von XIAP und cIAP1 untersucht werden. Mittels Western-Blot-Analysen soll festgestellt werden, ob es unter der Behandlung der Smac-Mimetika zu einer Degradation der IAPs kommt. Das Zeitfenster wurde in Anlehnung an die vorher durchgeführten Versuche gewählt. Daher wurden im Folgenden Jurkat-Zellen für zwei Tage mit den neuartigen Smac-Mimetika inkubiert. Hierfür wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in 6-well-Platten ausgesät und mit den Substanzen behandelt. LBPS03 wurde jeweils in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ zu den Zellen gegeben, wobei $50 \mu\text{M}$ AT-406 eingesetzt wurde. Anschließend wurden Proteinproben hergestellt und im „Western Blot“ auf die Expression des XIAP und cIAP1 untersucht.

Für diese Versuche wurde zunächst das LBPS03 verwendet. Aufgrund der limitierten Mengen an Mimetika und Zeit, soll zunächst anhand des LBPS03 die zu vermutende Degradation der IAPs gezeigt werden. Das LBPS03 konnte tumorzelllinienübergreifend eine Zunahme der hypodiploiden Zellen sowie eine deutliche Reaktivierung der Caspasen-3 und -9 bewirken und stellt somit ein vielversprechendes Smac-Mimetikum dar.

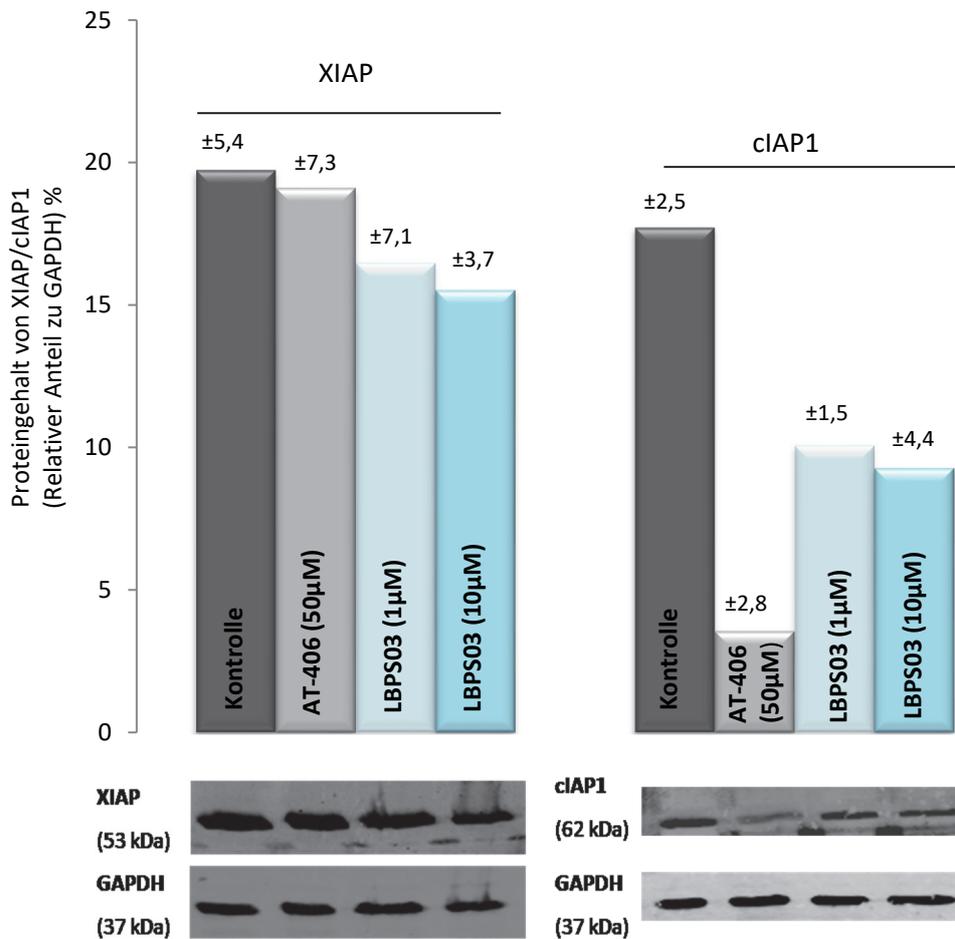


Abbildung 20: IAP- Proteinexpression und deren Degradation nach Behandlung mit Smac-Mimetika in Jurkat-Zellen

Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Expression von XIAP/cIAP1. Analysiert wurde der relative Anteil von XIAP und cIAP1 im Vergleich zu GAPDH nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit 50µM AT-406 und LBPS03 in einer Konzentration von 1µM und 10µM. 70 µg Gesamtprotein wurden in einer 15%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-XIAP- und Anti-cIAP1-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion von GAPDH wurde zur Veranschaulichung vergleichbarer Proteinladungsmengen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Wie Abbildung 20) zeigt, konnte die spezifische XIAP- und cIAP1-Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von jeweils 53 kDa und 62 kDa in den Jurkat-Zellen detektiert werden. Der Abgleich mit GAPDH demonstriert, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden. Es bestätigt sich die Angabe aus der Literatur, dass AT-406 auch bei den Jurkat-Zellen eine Degradation von cIAP1 hervorruft. Die Western Blot Daten nach 48 Stunden zeigen sowohl unter

der Behandlung vom AT-406 als auch unter der Behandlung von LBPS03 eine verminderte Expression von XIAP und cIAP1. Mit LBPS03 behandelte Jurkat-Zellen weisen eine konzentrationsabhängige Degradation der IAPs auf, wobei cIAP1 insgesamt stärker degradiert wird als XIAP. Bei einer Inkubation mit LBPS03 in einer Konzentration von 1µM ist die XIAP Expression um 4% und die cIAP1 Expression um 7% vermindert. Bei 10µM ist die Expression jeweils um ein weiteres Prozent vermindert. Es bestätigt sich auch hier, dass AT-406 bei den Jurkat-Zellen eine signifikante Degradation von cIAP1 hervorruft. Vergleicht man die Expression von cIAP1 in den mit AT-406 behandelten Zellen mit der Kontrolle, so ist diese um ca. 14% vermindert. Um weitere Tendenzen und Ergebnisse zu erlangen, wurde der Versuch auch mit LBPS05 durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen erste Hinweise zur Expression von XIAP/cIAP1 nach einer Behandlung mit dem Mimetikum LBPS05. Ähnlich wie unter der Behandlung mit LBPS03 kommt es auch hier zu einer verminderten Expression von XIAP und cIAP1. Die cIAP1-Bande nach AT-406 Behandlung ist schwach erkennbar, wobei die Proteinbanden unter der Behandlung von LBPS05 nicht nur eine, sondern zwei schwache cIAP1-Banden aufweisen.

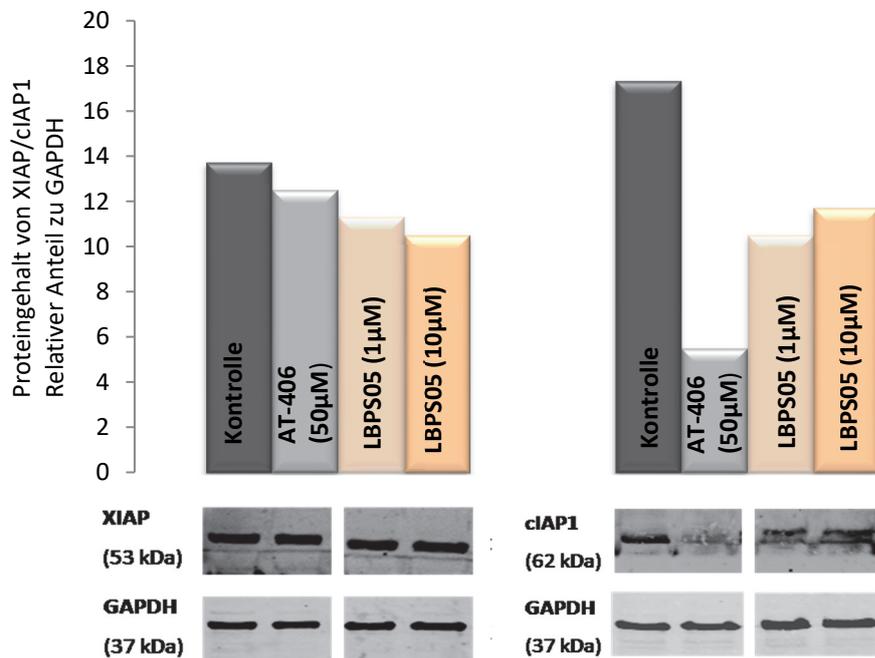


Abbildung 21: IAP- Proteinexpression und deren Degradation nach Behandlung mit Smac-Mimetika in Jurkat-Zellen

Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Expression von XIAP/cIAP1. Analysiert wurde der relative Anteil von XIAP und cIAP1 im Vergleich zu GAPDH nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit 50 µM/ml AT-406 und LBPS03 in einer Konzentration von 1 µM/ml und 10 µM/ml. 70 µg Gesamtprotein wurden in einer 15%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-XIAP- und Anti-cIAP1-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion von GAPDH wurde zur Veranschaulichung vergleichbarer Proteinladungsmengen eingesetzt. Aufgrund geringer Verfügbarkeit und langer Lieferzeiten der Substanzen konnte dieser Versuch nicht reproduziert werden.

3.4 Applikation von TRAIL und AT-406

In der aktuellen Forschung finden Kombinationsbehandlungen von Smac-Mimetika und Induktoren viel Aufmerksamkeit und Anwendung. Um einen möglichst hohen synergistischen Apoptose-Effekt durch die kombinierte Behandlung der Jurkat-Zellen mit einem Mimetikum und TRAIL zu erzielen, wurde ermittelt nach welcher Behandlungsdauer der Induktor den größten Effekt auf die Zellen hat und ab wann diese Wirkung wieder nachlässt. Auch hierfür wurden PI-Assays durchgeführt. Hierzu wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf 12-well-Platten ausgesät.

Behandelt wurden die Zellen jeweils mit 25ng/ml TRAIL. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 2% FCS Medium inkubiert.

Mit zunehmender Inkubationsdauer kommt es zu einer signifikanten Verschiebung des Zellzyklusprofils bei den mit TRAIL behandelten Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle sind nach einer 6-stündigen Inkubationszeit bereits doppelt so viele Zellen im subG1-Areal. Die Anzahl der mit TRAIL behandelten apoptotischen Zellen nimmt mit längerer Inkubationsdauer zu. Die Verschiebung des Zellzyklusprofils in Richtung des subG1-Peaks erreicht nach 24 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen ihr Wirkungsmaximum. Dies konnte mittels der direkten Zellzählung bestätigt werden.

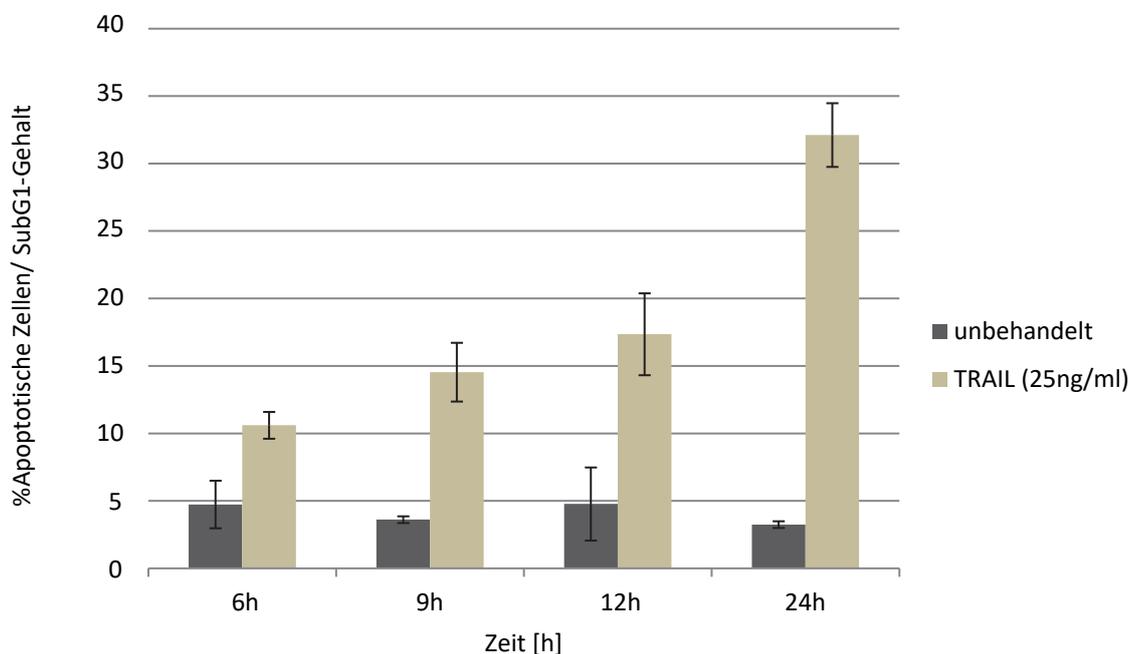


Abbildung 22: Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in Jurkat-Zellen ausgelöst durch die Behandlung mit TRAIL im zeitlichen Verlauf.

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden mit TRAIL in einer Konzentration von 25ng/ml μ M behandelt. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (nach Nicoletti). Als Kontrolle dienten unbehandelte Jurkat-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=3).

Nachdem anhand von durchflusszytometrischen Messungen nach Nicoletti die optimale Inkubationsdauer von AT-406 und TRAIL ermittelt werden konnte, wurde eine Kombinationsbe-

handlung der Jurkat-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die zuvor anhand der PI-Assays ermittelten Zeitpunkte zu Grunde gelegt. Jurkat-Zellen wurden auf 12-Well-Platten in einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml ausgesät und über 4 Tage mit AT-406 behandelt. Am dritten Tag wurden die Zellen für die weiteren 24 Stunden zusätzlich mit TRAIL behandelt. Des Weiteren folgten Behandlungen mit den Kontrollsubstanzen, um deren Effekt auf die Zellen zu untersuchen. Es wurden AT-406 Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$ eingesetzt und nicht wie in den anderen Versuchen $50 \mu\text{M}$. Die niedrigeren AT-406 Konzentrationen wurden gewählt, um die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Substanzen besser sichtbar machen zu können. Die dargestellten Ergebnisse können als richtungsweisend für eventuelle Kombinationsbehandlungen mit TRAIL und Smac-Mimetika angesehen werden.

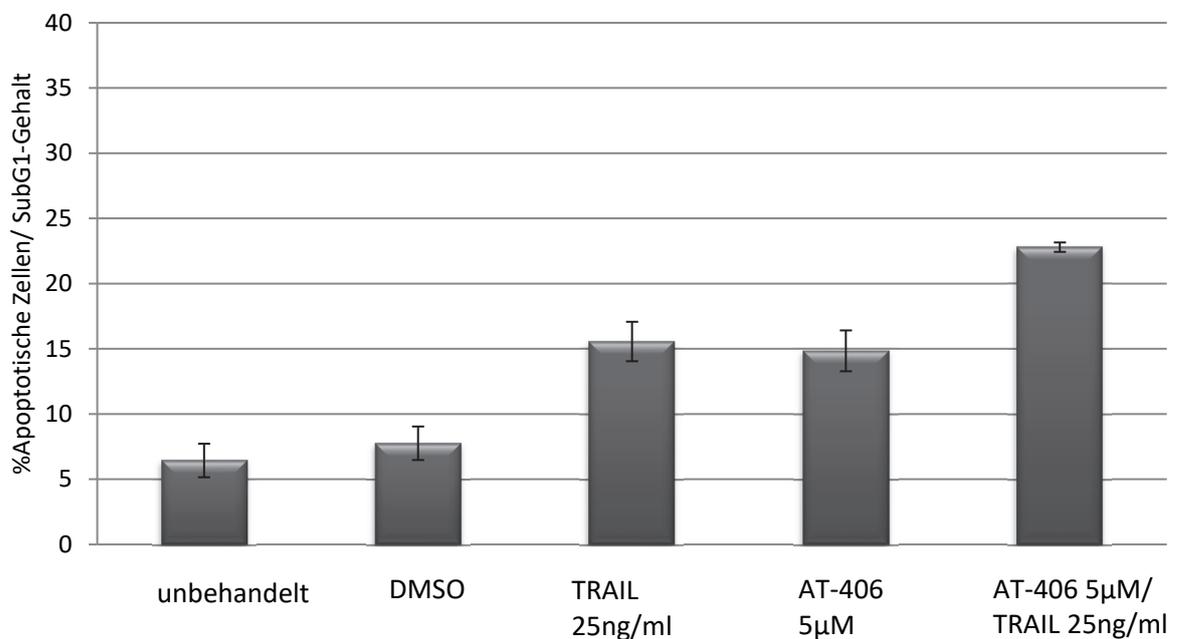


Abbildung 23: Die Wirkung von $5 \mu\text{M}$ AT-406 in Kombination mit 25ng/ml TRAIL auf die Anzahl apoptotischer Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ AT-406 inkubiert, nach 72 Stunden erfolgte die Zugabe von 25ng/ml TRAIL. Zusätzlich wurden Jurkat-Zellen isoliert mit den genannten Substanzen inkubiert. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (*nach Nicoletti*). Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO und PBS inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

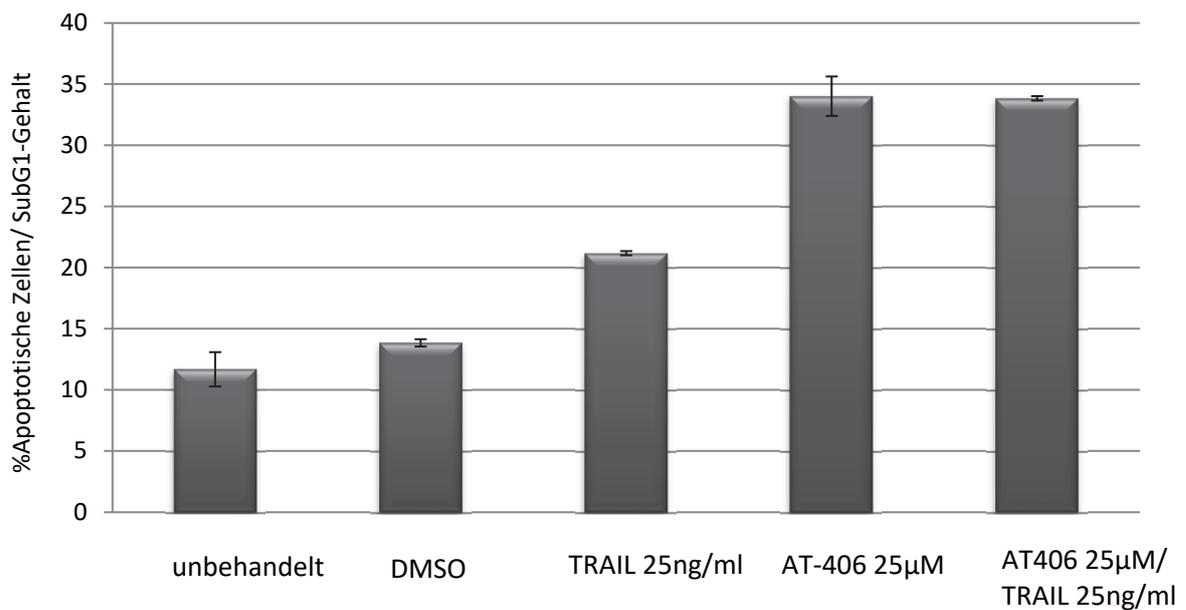


Abbildung 24: Die Wirkung von 25µM AT-406 in Kombination mit 25ng/ml TRAIL auf die Anzahl apoptotischer Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden mit Konzentrationen von 25µM TRAIL, 25µM AT-406 und als Kombinationsbehandlung mit beiden genannten Substanzen inkubiert. Der subG1-Peak wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt bestimmt (*nach Nicoletti*). Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO und PBS inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Durch die Behandlung der Jurkat-Zellen mit TRAIL, sowie durch die Behandlung dieser Zellen mit TRAIL in Kombination mit dem Mimetikum AT-406 und der AT-406-Kontrolle kommt es zu einer Verschiebung des Zellzyklus in Richtung subG1-Phase. Bei einer Konzentration von 25µM AT-406 weist die Kombinationsbehandlung keinen signifikanten Unterschied zur Monotherapie mit AT-406-Kontrolle auf. Erst bei Verwendung einer niedrigeren AT-406 Konzentration wird eine Zunahme des subG1-Peak im Vergleich zu einer AT-406-Monotherapie sichtbar. Aufgrund von Problemen bezüglich Verfügbarkeit und Lieferzeit konnten diese Versuche nicht mit den Mimetika weitergeführt werden.

4 Diskussion

In mehrzelligen Organismen werden mutierte oder Zellen, die fehlerhafte Information beinhalten und wenn der Schaden irreparabel ist, durch Apoptose beseitigt. Dieser Prozess gewährt einen gesunden und überlebensfähigen Organismus. Die Resistenz von Zellen gegenüber Apoptose beschrieben *Hanahan und Weinberg* in „Hallmark of Cancer“ (2011) als signifikantes Kennzeichen in der Tumorentstehung. Apoptose ist einer der meist erforschten programmierten Zelltode und gliedert sich in zwei Hauptsignalwege, der todesrezeptorvermittelte (extrinsische) und der mitochondriale (intrinsische) Signalweg. Wichtigste Mediatoren sind die Caspasen. IAPs können an Caspasen binden und deren Aktivität inhibieren. Das antiapoptotische Protein XIAP kann über seine BIR2- beziehungsweise BIR3-Domäne mit den Caspasen-3/-7 sowie der Caspase-9 interagieren und unterdrückt die proapoptotische Funktion der Caspasen (*Deveraux et al., 1997*). Andere zelluläre IAPs (c-IAP1/2) inhibieren dagegen indirekt die Caspaseaktivität, indem sie die Kinase RIP1 durch K63-Ubiquitinketten kennzeichnen und den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktivieren. Eine dauerhafte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt wiederum zu malignem Zellwachstum bei Menschen und fördert Tumorentstehung, Tumorentwicklung und Metastasierung (*Bertrand et al., 2008; Varfolomeev et al., 2008*). Akute lymphatische Leukämie ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Die Überlebensrate erreicht in etwa 75–80%. Dennoch erleiden circa 20% der betroffenen Kinder einen Rückfall mit einer schlechten Prognose aufgrund von Resistenzen gegenüber herkömmlichen Medikamenten (*Vrooman et al., 2009*). In vielen Tumorzellen ist die Überexpression von IAPs in Verbindung mit Therapieresistenz gegenüber etablierten Verfahren ein entscheidender Faktor. Es gilt neue Therapieformen zu finden, welche Tumorzellen dazu befähigt Apoptose einzuleiten ohne toxische Effekte auf gesunde Zellen. Somit hat in den letzten Jahren die zielgerichtete Therapie, „Targeted Therapie“ immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das mitochondriale Smac-Protein wird bei Apoptosestimuli in das Zytoplasma freigesetzt und bewirkt eine Antagonisierung der IAP. In vielen Tumorzellen sind IAPs überexprimiert, sodass diese einen guten Angriffspunkt in der Krebstherapie darstellen, während normale Zellen, die die IAPs nicht überexprimieren unbeschädigt bleiben (*Hui et al., 2010*). Daher bieten Smac-Mimetika und ihre abgeleiteten Strukturen neue therapeutische Möglichkeiten IAP-vermittelt Resistenzen zu überkommen und Apoptose in Leukämiezellen gezielt und effektiv einzuleiten.

Carosati und Kollegen (2015) identifizierten mittels liganden-basiertem virtuellen Screening neue potentielle nicht-peptidische Substanzen, die das AVPI-Motiv von Smac nachahmen und mit BIR-Domänen von IAPs interagieren können. Zu dem Zeitpunkt meiner Arbeit wurden 31 mögliche IAP-Antagonisten identifiziert. Im Rahmen einer Kooperation wurden uns diese Substanzen zur Verfügung gestellt. In dieser Dissertation wurden Methoden etabliert, die es erlauben die Wirkung von fünf dieser monovalenten Smac-Mimetika auf die Zellproliferation von Jurkat-Zellen zu testen. Als Referenzsubstanz diente das AT-406, welches auch zur Untersuchung von synergistischen Effekten von Kombinationsbehandlungen mit einem Induktor genutzt wurde. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit bestand darin, erste Hinweise über die Zelltodmechanismen der im Proliferationsassay effektiv eingestuftten Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 zu erlangen.

4.1 AT-406, ein Smac-Mimetikum als Positivkontrolle induziert den Zelltod in den Jurkat-Zellen

Zunächst war es notwendig eine geeignete Positivkontrolle als Referenzsubstanz für die neuen Smac-Mimetika zu etablieren. Das AT-406, ein monovalentes Smac-Mimetikum, imitiert das AVPI-Motiv von Smac und interagiert mit der BIR3-Domäne von XIAP, cIAP1 und cIAP2. In verschiedenen Tumorzelllinien inhibiert AT-406 weiteres Wachstum. Aufgrund von Experimenten mit AT-406 konnte gezeigt werden, dass dieses Mimetikum das Absterben von MDA-MB-231 Zellen mittels Apoptose zeit- und konzentrationsabhängig fördert (Cai et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des AT-406 auf eine Leukämie-Zelllinie (Jurkat-Zellen) untersucht. Das AT-406 konnte erfolgreich als Positivkontrolle etabliert werden. Die in der Literatur aufgezeigte Inhibition der Proliferation konnte für diese Zelllinien bestätigt werden. Das AT-406 zeigt eine konzentrationsabhängige Wirkung. Die größte und auch konzentrationsabhängige Wirkung auf die Proliferation des AT-406 ist nach 96 Stunden nachweisbar. Übereinstimmend mit den antiproliferativen Effekten ist die konzentrationsabhängige Zunahme des hypodiploiden DNA-Gehalts der mit AT-406 inkubierten Zellen. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass AT-406 die relative Überlebensrate der Jurkat-Zellzahl nach einer Wirkungs-dauer von 4 Tagen bei Konzentrationen von 50 μ M und 100 μ M jeweils auf 60 \pm 5,0% und

50±14,4% reduziert. Auch nach 72 h ist bereits der Einfluss des Mimetikums auf die Zellproliferation sichtbar. Jedoch anders als bei MDA-MB-231 Zellen, wo bereits 1 µM einen signifikanten Effekt zeigte, führten 10 µM bei Jurkat-Zellen nur zu einer minimalen Reduktion der Zellzahlen. In Nierenkarzinomzellen konnten ähnliche antiproliferative Effekte bei Inkubationsdauern von 4 Tagen und höheren Konzentrationen von 50 µM und 100 µM beobachtet werden (Stevens, 2013). Des Weiteren führte in Jurkat-Zellen eine Substanzkonzentration von 10 µM zu einem Anstieg der Lebendzellzahl vom 3. auf den 4. Tag. In Nierenkarzinomzellen wurde in dieser Substanzkonzentration auch ein Anstieg der Zelldichte erfasst (Stevens, 2013). Ähnliche proliferationssteigernde Effekte bei einer geringen Konzentration wurden auch in anderen Krebszelllinien mit Smac-Mimetika beobachtet. Beispielsweise führte SM-164 in HepG2 und SMMC-7721-Zellen zunächst zum Anstieg der Überlebensrate und reduzierte sich dann mit zunehmender Konzentration wieder (Zhang et al., 2012). Wodurch diese Effekte hervorgerufen werden, ist nicht bekannt. Bei der Zulassung der Smac-Mimetika könnte dies ein wichtiger Faktor sein, denn zum einen müssen die gewählten Konzentrationen hoch genug sein um antiproliferative Effekte zu induzieren und gleichzeitig sollten sie keinen toxischen Einfluss auf gesunde Zellen haben. Umso entscheidender ist die Bestimmung einer Substanzkonzentration, welche diese Aspekte berücksichtigt. Nicht alle Substanzen können in niedrigen, verträglichen Konzentrationen per se antiproliferative Effekte induzieren. Eine Kombinationsbehandlung mit einem Induktor könnte dazu führen, dass zum einen der Prozess des Zelltodes beschleunigt wird und zum anderen geringere Konzentrationen der Substanzen notwendig wären um Apoptose in Tumorzellen einleiten zu können. Das AT406 wird aktuell in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten klinischen Studie der Phase 3 in Kombination mit Chemo- und Radiotherapie eingesetzt (<https://clinicaltrials.gov>).

4.2 Die Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05, nicht aber LBPS02 und LBPS06 zeigen eine signifikante Wirkung auf die Zellproliferation in Jurkat-Zelle

Ein wesentlicher Teil der folgenden Arbeit war es, den Einfluss der bisher nicht charakterisierten Smac-Mimetika LBPS01, -02, -03, -05 und -06 auf die Zellproliferation zu untersuchen. Darüber hinaus sollte bei einem eintretenden Effekt der Wirkmechanismus analysiert werden.

Zusätzlich konnte in weiterführenden Arbeiten nachgewiesen werden, dass normale Zellen durch die Behandlung von Smac-Mimetika unbeschadet blieben (*Carosati et al., 2015*).

Im Rahmen meiner Dissertation erfolgte zunächst eine Vorauswahl der 31 zur Verfügung stehenden Substanzen. Es wurden zunächst LBPS01, -02, -03, -05 und -06 in einem Proliferationsassay getestet und die erfolgversprechendsten Verbindungen für weitere Versuche verwendet.

Im ersten Screening wurden fünf potentielle Smac-Mimetika getestet, von denen drei signifikant die Zellzahl in Jurkat Zellen reduzierten. Smac-Mimetikum LBPS01, -03 und -05 wurden als die Substanzen mit der stärksten Wirkung auf die Zellproliferation identifiziert (*van den Höfel et al., 2014; Carosati et al. 2015*). Bereits bei einer verwendeten Konzentration von 10 μM sank die Lebendzellzahl nach einer Wirkungsdauer von drei Tagen signifikant um ca. 60 bis 70%. Bei einer Konzentration von 1 μM zeigen nur Mimetika LBPS02, LBPS03 und LBPS05 eine Wirkung auf die Reduktion der Zellzahlen, jedoch weitaus geringer als bei 10 μM . Eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Proliferation von Jurkat-Zellen konnte bei LBPS01, LBPS03 und LBPS05 festgestellt werden. Mit steigender Substratkonzentration konnte die Lebendzellzahl signifikant gesenkt werden. LBPS01 zeigt bei 1 μM keine nennenswerten Effekte, jedoch verringert sich die Zellzahl bei einer Konzentration von 10 μM auf etwa $33 \pm 8,3\%$. Die Wirkungen der Substanzen LBPS03 und -05 verdoppelte sich bei einer Steigerung der Konzentration von 1 μM auf 10 μM . In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass LBPS03 in einer höheren Dosis zum Beispiel bei 50 μM in Nierenkarzinomzellen keine weiteren nennenswerten Effekte erzielt. Vermutlich ist bereits bei 10 μM eine Sättigung der Wirkung erreicht. Vielmehr führte eine höhere Konzentration bei LBPS03 zum Ausfallen im Medium (*Steven, 2013*). LBPS02 zeigt bei 1 μM eine leichte Reduktion der Lebendzellzahl, allerdings konnte dies bei 10 μM nicht weiter gesteigert werden. Aufgrund von geringen Substanzmengen, langen Lieferungszeiten und zum damaligen Zeitpunkt zelllinienübergreifenden geringen Effekten, wurde in dieser Arbeit keine weiteren Versuche mit dem LBPS02 durchgeführt. Passend zu den gewonnen Proliferationsdaten konnte der niedrigste IC_{50} - Wert für LBPS03 ermittelt werden. Hierfür wurden die Zellen, anders als in dieser Arbeit, über 96 Stunden mit den jeweiligen Smac-Mimetikum inkubiert. Des Weiteren wurden Konzentrationen bis 50 μM verwendet (*Carosati et al., 2015*).

Ähnlich wie bei dem AT406 in geringeren Konzentrationen wurde bei dem Mimetikum LBPS06 bei Konzentrationen von 1 μM und 10 μM ein Anstieg der Zellproliferation vermerkt. Ähnliche

Effekte wurden in einigen anderen Studien wie bei LBW242 verzeichnet (*Weisberg et al., 2007*). Eine Möglichkeit das antiproliferative Potential von LBPS06 oder anderen schwach wirksamen Smac-Mimetika, wie auch AT-406 erneut zu testen, wäre in Kombination mit einem Induktor. Beispielsweise werden bereits Smac-Mimetika BV6, LBW242, GDC-0152 und Birinapant in Kombination mit Chemotherapeutika, Todesrezeptor-Agonisten, Radiotherapie, Signaltransduktionsinhibitoren oder Immunstimuli bei einigen Tumorerkrankungen erfolgversprechend eingesetzt (*Fulda, 2015*). Auch könnte versucht werden eine noch längere Behandlungsdauer zu wählen. Bei Nierenkarzinomzellen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Wirkeffektivität und Behandlungsdauer festgestellt werden. In Nierenkarzinomzellen benötigen Smac-Mimetika eine Mindestinkubation von 24 Stunden um ihr antiproliferatives Potential zu entfalten. Dies könnte mit zellzyklusphasen-spezifischen Effekten oder mit der Penetration über die Plasmamembran zusammenhängen (*Stevens, 2017*). Auch bei Jurkat-Zellen konnte eine Zunahme der Wirkung mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt werden. Zu dem Zeitpunkt der hier durchgeführten Versuche, zeigten die drei Smac-Mimetika LBPS01, LBPS03 und LBPS05 eine Wirkung die zelltypunabhängig waren. Vermutlich gehören die Mimetika LBPS01, LBPS03 und LBPS05 zu einer Minderheit von Substanzen, die zelllinienübergreifend bereits per se im mikromolaren Bereich gute antiproliferative Effekte in Tumorzellen aufweisen (*Stevens et al., 2014; van den Höfel et al., 2014; Carosati et al., 2015*).

4.3 Die Smac-Mimetika LBPS01, LBPS03 und LBPS05 lösen den Zelltod in den Jurkat-Zellen aus

Die neu synthetisierten Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 zeigten bereits eine konzentrations- und zeitabhängige Inhibition der Zellproliferation. In den letzten Jahren wurden sehr viele Bemühungen in die Entstehung von sowohl potenten monovalenten als auch bivalenten Smac-Mimetika investiert. Bivalente Mimetika bestehen aus zwei monovalenten Einheiten, die über eine chemische Linkerstruktur verbunden sind (*Ndubaku et al., 2009*). Der Vorteil dieser Strukturen gegenüber monovalenten Mimetika besteht in ihrer höheren Bindungsaffinität zu IAPs. Ein entscheidender Nachteil dieser bivalenten Strukturen ist die erschwerte orale Applikation. Somit müssten diese Mimetika intravenös gegeben werden, was bei regelmäßiger Einnahme sehr hinderlich sein kann (*Sun H. et al., 2008; Fulda/Vucic, 2012*). Bis heute

wurden einige vielversprechende Verbindungen entwickelt (*Sun W. et al. 2009*). Insbesondere das AT-406, welches in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet wird, zeigte erste Erfolge (*Cai et al. 2011*). Auch die Arbeitsgruppen Hashimoto et al. (2013) und Flygare et al. (2012) berichten über vergleichbar wirkende neuere potentere Verbindungen.

Als weiterer Baustein dieser Arbeit galt es erste Erkenntnisse bezüglich des Zelltodsignalwegs zu erlangen. Als kennzeichnend für ein apoptose-ähnlichen Zelltodsignalweg wurden mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen die Anzahl hypodiploider Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige Zunahme der Apoptosehäufigkeit durch die verwendeten Smac-Mimetika. Die Applikation von LBPS01 rief in Jurkat-Zellen die stärkste Apoptoserate hervor. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in LBPS01-stimulierten Zellen lag nach 48 Stunden bei $42,2 \pm 1,6\%$ und nach 72 Stunden bei $45,4 \pm 1,1\%$. Eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde des Weiteren durch LBPS03 beobachtet. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg die Anzahl der Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt nach 48 Stunden auf $15,4 \pm 2,7\%$ und nach 72 Stunden auf $32 \pm 3,9\%$ an. Im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen stieg die Anzahl apoptotischer Zellen durch LBPS05 nach 48 Stunden um $2,7 \pm 0,5\%$ und nach 72 Stunden um $4,0 \pm 2,7\%$.

Der Zelltod Aktivator LBPS05 steigerte die Anzahl apoptotischer Zellen am geringsten (*Carosati et al., 2015*). In ClearCa-2-Zellen sprechen die Ergebnisse dafür, dass LBPS05 einen Nekroptose-ähnlichen Zelltod induziert. Die Zunahme des hypodiploiden DNA-Gehalts durch LBPS01 und LBPS03 steht in Übereinstimmung mit den Daten, die in Nierenzellkarzinomen beobachtet werden konnten (*Stevens, 2017*). Vergleichbare Wirkungen der Substanzen sowohl in adhärennten wie auch in suspensiven Tumorzellen könnten auf eine sehr ähnliche Wirkweise hindeuten. In einer weiteren Arbeit konnte die höchste Zunahme an hypodiploiden DNA-Gehalt in LBPS03-behandelten Jurkat-Zellen nachgewiesen werden (*Carosati et al., 2015*). Hierfür sprechen auch die IC_{50} -Werte (*van den Höfel et al., 2014; Carosati et al., 2015*). Die Substanz LBPS03 erzielte den geringsten IC_{50} -Wert mit einer Konzentration von $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$. LBPS05 induziert bei einer Konzentration von $5,9 \pm 2,2 \mu\text{M}$ eine halbmaximale Inhibierung des Tumorstwachstums und LBPS01 bei $7,4 \pm 2,3 \mu\text{M}$. Diese Werte wurden nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden und Konzentrationen bis zu $50 \mu\text{M}$ ermittelt (*Carosati et al., 2015*). Im Vergleich wurden auch kommerziell erhältliche Smac-Mimetika auf das Überleben von Jurkat-Zellen getestet. Der niedrigste IC_{50} -Wert erzielte GDC-0152 mit einer Konzentration von $33,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$. Für AT-406 und Birinapant verhielten sich die IC_{50} -Werte ähnlich mit $54,4 \pm 15,1 \mu\text{M}$ und

51,1±3,6 µM (Carosati et al., 2015). In ClearCa-2-Zellen konnten für die kommerziell erhältlichen Substanzen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. So wie in Jurkat-Zellen, wo LBPS03 den geringsten IC₅₀- Wert aufweist, zeigte LBPS03 in Nierenkarzinomzellen die höchste Wirkungsweise mit einem IC₅₀- Wert von 1,5±0,4 µM (Stevens, 2017). Dennoch konnten einige Mimetika mit höheren IC₅₀- Werten in einer Kombinationsbehandlung effektiv das Zellüberleben bei deutlich geringeren Konzentrationen reduzieren. So zeigte das LBW242 in Ovarialkarzinomzellen eine moderate proapoptotische Wirkung welche durch eine Kombinationsbehandlung mit TRAIL verstärkt werden konnte (Petrucci et al., 2012). Im Vergleich zu vielen anderen Mimetika, zeichnen sich LBPS01, -03, und -05 dadurch aus, dass sie bereits per se im mikromolaren Bereich proapoptotische Wirkungen aufweisen. Somit würde eine Kombinationstherapie vermutlich keinen weiteren Vorteil erbringen.

Zur weiteren Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen welche durch die Mimetika induziert werden, wurden die Aktivitäten der Caspasen-9 und -3 getestet. Alle drei getesteten Mimetika reaktivieren nach einer 48-stündigen Inkubationszeit mit den einzelnen Substanzen, Caspase-3 stärker als Caspase-9. LBPS01 zeigt nur eine minimal höhere Aktivierung der Caspase-3. LBPS03 kann Caspase-3 am stärksten reaktivieren. Wohingegen eine Caspase-9 Reaktivierung insbesondere bei LBPS01 behandelten Zellen auftritt (Carosati et al., 2015). In Jurkat-Zellen bewirken LBPS01 und LBPS03 einen zeitabhängigen Anstieg der intrazellulären Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -9 (Carosati et al., 2015). Womöglich sind sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg am Apoptoseprozess beteiligt.

Zellen die mit der Substanz LBPS05 inkubiert wurden, erzielten nur eine geringe Caspase-8/-9 Aktivierung (Carosati et al., 2015). In dieser Arbeit weist LBPS05 von allen Mimetika, die geringste Caspase-3 und-9 Aktivierung auf. Nierenkarzinomzellen, welche mit LBPS05 behandelt wurden, bewirkten keine Prozessierung der Caspase-8 in ihre aktive Form, noch wurden Caspase-spezifische Substrate proteolytisch gespalten. Zumindest beim Nierenzellkarzinom liegt die Vermutung nahe, dass LBPS05 einen Caspase-unabhängigen Zelltod induziert, welcher eher einem nekroptischen Zelltod nahekommt (Stevens, 2017). Für Jurkat-Zellen müssten hierzu noch weitere Untersuchungen erfolgen. Der IAP-Antagonist AT-406 aktiviert in geringerem Umfang in Jurkat-Zellen Caspase-3 und in minimal Caspase-9, jedoch zeigten die Mimetika LBPS01, -03 und -05 eine deutlich stärkere Aktivierung der Caspasen. Cai und Kollegen

konnten auch eine Caspase-3 Aktivität in MDA-MB-231 Zellen nach AT-406 Behandlung nachweisen (Cai et al., 2011). Auch der IAP-Antagonist GDC-0152 induziert die Aktivierung der Caspasen-3 und -9 (Hu et al., 2015). Möglicherweise spielt die Wirkungsdauer einiger Substanzen und die Eigenschaften der jeweiligen Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Bei AT-406 ist bereits bekannt, dass es mit zunehmender Inkubationszeit seine Wirkung verstärkt, somit könnte die kurze Wirkdauer ein limitierender Faktor gewesen sein.

Insgesamt ist eine ähnliche zelltypunabhängige Wirkung der Mimetika LBPS01, -03 und -05 zu verzeichnen. So wurde in Nierenkarzinomzellen ähnliche Effekte wie in den Jurkat-Zellen verzeichnet (Stevens et al., 2014; van den Höfel et al., 2014; Carosati et al., 2015, Stevens, 2017). Diese analogen Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass zumindest LBPS01 und LBPS03 ähnliche apoptotische Mechanismen in Tumorzellen hervorrufen. Vergleichbare Ergebnisse in Brustkrebszellen erzielten auch weitere Arbeitsgruppen mit neu entwickelten Verbindungen wie dem Octahydropyrrolol[1,2-a]pyrazine Scaffold und GDC-0152 (Hashimoto et al., 2013, Flygare et al. 2012).

4.4 Die Smac-Mimetika AT406 und LBPS03 degradieren eher cIAP1 als XIAP

Die Überexpression von XIAP leistete einen entscheidenden Beitrag zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose (Fulda/Vucic 2012). Somit war das Ziel vieler Arbeitsgruppen in erster Linie Smac-Mimetika zu entwickeln, die eine hohe Bindungsaffinität zu XIAP aufweisen. In Jurkat-Zellen konnte nach einer 48-stündigen Inkubation mit AT-406 eine deutliche Degradation des cIAP1 festgestellt werden. Der Effekt bei XIAP war nur sehr gering. Durch LBPS03 konnte eine konzentrationsabhängige Degradation von cIAP1 und XIAP gemessen werden. Schon bei einer Konzentration von 1µM des LBPS03 werden die beiden IAPs degradiert und abgebaut. Insgesamt bestätigt sich die Annahme, dass der Effekt sehr viel stärker beim cIAP1 zu verzeichnen ist. Erste Tendenzen in Hinblick auf eine Degradation nach Behandlung mit LBPS05 in Jurkat-Zellen konnten aufgezeigt werden. Im Vergleich zu den mit LBPS03 behandelten Jurkat-Zellen, konnte LBPS05 keine konzentrationsabhängige Degradation von cIAP1 aufweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese Ergebnisse nicht wiederholt wurden und somit für das LBPS05 nur als richtungsweisend für weitere Versuche anerkannt werden können.

Die verschiedenen Wirkungsweisen der Mimetika könnten sich durch ihre unterschiedlichen Strukturen und verschiedener Bindungsaffinitäten zu den IAPs erklären lassen. Einige Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass die entwickelten Verbindungen oftmals eine höhere Affinität zu cIAP1 als XIAP aufweisen (Cai et al., 2011; Hashimoto et al., 2013). In Jurkat-Zellen sind XIAP und cIAP1 Zielmoleküle des LBPP03, wohingegen Smac-Mimetika wie AT-406 oder das bivalente Birinapant c-IAP1 degradieren (Cai et al., 2011; Allensworth et al., 2013). In TRAIL-resistenten, entzündlichen Brustkrebszellen bewirkt Birinapant die Degradation von c-IAP1 sowie c-IAP2, nicht aber von XIAP. Birinapant ist eine Substanz mit einer hohen Affinität zu c-IAP1, c-IAP2 und XIAP (Allensworth et al., 2013). In MDA-MB-231 Tumorzellen induziert AT-406 die Degradation von cIAP1 schon bei Konzentrationen von 10nM. Diese Ergebnisse sind auch übereinstimmend mit der sehr hohen Bindungsaffinität zwischen AT-406 und cIAP1 (Cai et al. 2011). Auch die Arbeitsgruppe von Flygare et al. erzielten in A2058 Melanom-Zellen mit dem neuen Smac-Mimetikum GDC-0152 ähnliche Ergebnisse. Das bivalente Smac-Mimetikum BV6 fördert in Glioblastomzellen die Degradation von c-IAP1 und XIAP (Wagner et al., 2012).

Zender und Kollegen konnten nachweisen, dass ein primäres Ziel von IAP-Antagonisten c-IAP1 ist. In verschiedenen Tumoren konnten erhöhte Level an cIAP1 und Amplifikation des cIAP1 Gen-Lokus beobachtet werden. Diese und noch weitere Faktoren sind für Tumorentstehung und –wachstum notwendig. Durch die Antagonisierung von cIAP1 in Tumorzelllinien mit hohem cIAP1 Expressionslevel oder in genetisch veränderten Zellen mit entferntem cIAP1 wird die E3-Ligase aktiviert, was zur Autoubiquitinierung und daraus resultierend zur proteasomalen Degradation führt (Zender et al., 2006). Der nicht-kanonische NF- κ B- Signalweg wird aktiviert. Hierdurch wird TNF α produziert, das über auto- und parakrine Wege den TNF-R1 Signalweg und Caspase 8 aktiviert und folgend die Apoptose induziert (Zender et al., 2006; Varfolomeev et al., 2007; Sun H. et al., 2007; de Almagro/Vucic, 2011). Tumorzellen benötigen cIAP1 um die TNF vermittelte Apoptose zu unterdrücken. Dies könnte ein entscheidender Faktor bei der Suche nach neuen Substanzen sein. Durch die Entwicklung von Verbindungen, welche nicht nur XIAP sondern auch cIAP1 als „Target“ Molekül besitzen, könnten die TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose in Tumorzellen verstärkt werden. Somit stellen die cIAPs wichtige Regulatoren des extrinsischen Signalweges dar, XIAP ist ein wichtiges Molekül des intrinsischen Signalweges. Die Vermutung liegt nahe, dass AT406 durch die Degradierung von cIAP1 vor allem den extrinsischen Signalweg aktiviert, wohingegen LBPS03 auf verschiedenen Ebenen

den Zelltod in Jurkat-Zellen einleiten kann (Carosati et al., 2015). In Nierenzellenkarzinomen konnte LBPS03 bereits als vielseitiger Apoptose-Induktor identifiziert werden (Stevens, 2017).

4.5 Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit TRAIL und AT-406

Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten wurde das antiproliferative Potential sowie die zugrundeliegenden Mechanismen hinsichtlich des Zelltodes verschiedener Smac-Mimetika untersucht (Stevens et al., 2014; van den Höfel et al., 2014; Carosati et al., 2015, Stevens, 2017). In Jurkat-Zellen wurden IC50-Werte für verschiedene Mimetika bestimmt. Höhere IC50-Werte deuten auf eine eher schlechtere antiproliferative Wirkung hin und könnten in Kombination mit einem Induktor möglicherweise effektiver den Zelltod auch schon bei geringeren Konzentrationen einleiten. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden erste Ergebnisse in Bezug auf antiproliferatives Potential und Zelltodmechanismus für verschiedene Substanzen bekannt. Smac-Mimetika LBPS01, -03 und -05 zeigen bereits sehr gute antiproliferative Effekte und induzieren bereits per se bei mikromolaren Konzentrationen den Zelltod in Jurkat-Zellen. Andere Mimetika sowie das AT-406 benötigten vergleichsweise hohe Konzentrationen um bei Jurkat-Zellen antiproliferative Effekte zu erwirken (van den Höfel et al., 2014; 2015 Carosati et al., 2015). Kombinationstherapien könnten den Vorteil haben, insgesamt niedrigere Konzentrationen der Mimetika verwenden zu können und somit Nebenwirkungen zu reduzieren. Auch Tumorzellen, welche resistent gegenüber Smac-Mimetika als Monotherapie sind, könnten durch Kombinationsbehandlungen sensitiver gegenüber Apoptose werden. Bisher wurden einige Kombinationstherapien versucht. Hierunter Kombination von Smac-Mimetika mit Taxanen, Platinum Verbindungen, Daunorubicin, Cytarabine, Gemcitabine und Cyclophosphamide (zusammengefasst in Fulda 2015). So führte Debio1143 in der Kombination mit Cytarabin und Daunorubicin bei Patienten mit AML bei 13 von 29 Patienten zur kompletten Remission (DiPersio et al., 2014). Des Weiteren zeigte LBW242 in Kombination mit Cytarabine oder Doxorubicin den verstärkten Verlust von Zellviabilität bei Patienten mit AML (Weisberg et al., 2007). Weitere *in vitro* und auch präklinische Studien verzeichnen eine Zunahme der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Radiotherapie, wenn diese mit Smac-Mimetika kombiniert werden (Fulda, 2012 und 2015; Vellanki et al., 2009; Giagkousiklidis et al.; 2007, Berger et al., 2011;

Ziegler et al., 2011). Auch eine Kombination mit einem monoklonalen Antikörper wie Conatumab (humaner monoklonaler Antikörper gegen den TRAIL Rezeptor 2) in Verbindung mit Birinapant bei Patienten mit Ovarialkarzinom rezidiv wird evaluiert.

Die Verwendung von TRAIL in der Tumorthherapie ist eine sehr vielversprechende Methode die Apoptose einzuleiten, da sich dabei kein Effekt auf normale Zellen zeigt (Lawrence et al., 2001; Ashkenazi et al., 1999; Nagane et al., 2001). In Jurkat-Zellen konnte durch eine Kombinations-therapie aus TRAIL und den Smac-Mimetika AT-406 der Anteil der apoptotischen Zellen im Vergleich zu den nur mit TRAIL oder nur mit AT-406 behandelten Zellen leicht erhöht werden. Jedoch mussten hierfür verhältnismäßig geringe AT-406 Konzentrationen von nur 5µM verwendet werden. Bei höheren AT-406-Konzentrationen war der Einzeleffekt des Mimetikums zu stark und es konnte kein Unterschied der Apoptosehäufigkeit zu der Kombinationsbehandlung (TRAIL und AT-406) festgestellt werden.

Nicht alle Smac-Mimetika besitzen ihr Potenzial darin, per se Apoptose in Tumorzellen einzuleiten. Dabei scheint die Tumorzelllinie selbst eine entscheidende Rolle zu spielen. Beispielsweise konnte in der TRAIL-sensitiven Zelllinie SUM149 durch eine kombinatorische Anwendung aus TRAIL und dem bivalenten Smac-Mimetikum Birinapant die Apoptose synergistisch gesteigert werden, wohingegen eine Monotherapie mit Birinapant zu keinem nennenswerten Effekt führte. Anders bei der TRAIL-resistenten Brustkrebs-Zelllinie SUM190, welche gut auf eine Monotherapie mit Birinapant ansprach (Allensworth et al., 2013). Des Weiteren konnte Birinapant in nur einer von 17 getesteten humanen Melanom-Zelllinien den Zelltod per se einleiten. Eine Anwendung in Kombination mit TNF α führte in allen anderen Zelllinien bereits im nanomolaren Bereich zu einer synergistischen Steigerung der Apoptose (Krepler et al., 2013). Weitere synergistische Effekte konnten bei einer Neuroblastom-Zelllinie beobachtet werden. Die Kombinationstherapie LBW242 mit Doxorubicin und Vincristin verringerte das Zellüberleben in deutlich geringeren Konzentrationen als bei einer Monotherapie (Eschenburg et al., 2012).

Für Smac-Mimetika wie LBPS02 und -06, die in dieser Arbeit eine geringe bis gar keine Wirkung auf Jurkat-Zellen zeigten, könnte eine Kombinationsbehandlung mit einem Induktor ein weiterer Versuch sein, den Zelltod einzuleiten.

Ausblick

Das Liganden-basierte virtuelle Screening ermöglichte es drei hochinteressante und vielversprechende Substanzen mit antiproliferativen Effekten in Tumorzellen zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigen, dass die Substanzen LBPS01, -03 und -05 in Jurkat-Zellen in mikromolaren Bereich und bei sehr viel geringerer Konzentration als die Referenzsubstanz AT-406 antiproliferative Effekte aufweisen und per se Apoptose einleiten können. Des Weiteren wurden erste Analysen bezüglich der zugrunde liegenden molekularen Zelltodmechanismen durchgeführt. Die Mimetika besitzen das Potential auf verschiedenen Ebenen den Zelltod zu induzieren. Für LBPS01 und -03 konnte in weiterführenden Arbeiten gezeigt werden, dass die Substanzen überwiegend den Zelltod mittels Apoptose einleiten. LBPS03 könnte ähnlich wie in Nierenkarzinomzellen ein vielseitiger Apoptose-Induktor sein.

Weitere Untersuchungen mit den IAP-Antagonisten betreffend der molekularen Zelltodmechanismen und Struktur-Wirkung-Analysen tragen zur Identifikation von Targetmolekülen bei und sind das Fundament für eine zielgerichtete Therapie mit neuen noch wirksameren Substanzen. Die zielgerichtete Therapie steht momentan im Fokus für zukünftige Behandlungsstrategien in der Tumorthherapie. Sie ist ein Grundstein der precision medicine, wo molekulare profiling – Informationen über die Gene und Proteine einer Person genutzt werden, um Erkrankungen zu verhindern, zu diagnostizieren oder zu behandeln. In Bezug darauf könnten neue Ansätze in der Mimetika Therapie die Nutzung von SMDCs (small molecule drug conjugate), PROTACs (proteolysis targeting chimera), SNIPERs (specific non-genetic IAP-based protein erasers) oder die bereits vielfach eingesetzte Kombination aus Induktor und Mimetika sein. Das Ziel ist es, Nebenwirkungen zu reduzieren, wie beispielsweise gesunde Zellen unbeschädigt zu lassen und gleichzeitig die Behandlungen von Tumorerkrankungen noch effizienter und präziser mittels Zielmolekülen, „molekulare profiling“, optimalen Therapiefenstern und geeigneten Biomarkern durchführen zu können. Die hier identifizierten Zelltod-Aktivatoren sind neue erfolgsversprechende Substanzen die dazu beitragen können Tumorerkrankungen besser und gezielter zu therapieren.

Literaturverzeichnis

Adrain C., Slee E.A., Harte M.T., Martin S. J. (1999) Regulation of Apoptotic Protease Activating Factor-1 Oligomerization and Apoptosis by the WD-40 Repeat Region. *J. Biol. Chem.* **274**, 20855–20860.

Allensworth J. L., Sauer S. J., Lyerly H., Morese M. A., Devi G. R. (2013) Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat* **137**, 359-371.

Ambrosini G., Adida C., Altieri D. (1997) A noval anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917-921.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* **127**, 2391– 2405.

Arnt C.R., Chiorean M.V., Heldebrant M.P., Gores G.J., Kaufmann S.H. (2002) Synthetic Smac/DIABLO Peptides Enhance the Effect of Chemotherapeutic Agents by Binding XIAP and cIAP1 in Situ. *Jbc* **227**, 44236–44243.

Ashkenazi A., Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.

Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung S., Lawrence D.A., Marsters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokh Z., Schwall R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* **104**, 155-62.

Ashkenazi A, Herbst R.S. (2008) To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest.* **118**, 1979–1990.

Berger R., Jennewein C., Marschall V., Karl S., Cristofanon S., Wagner L., et al. (2011) NF- κ B is required for Smac mimetic-mediated sensitization of glioblastoma cells for γ -irradiation-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* **10**, 1867–75.

Bertrand M.J., Milutinovic S., Dickson K.M., Ho W.C., Boudreault A., Durkin J., Gillard J.W., Jaquith J.B., Morris S.J., Barker P.A. (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **30**, 689-700.

Birnbaum, M., Clem, R., & Miller, L. (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology* **4**, 2521-2528.

Blatt, N. B. and Glick, G. D. (2001) Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 9, no. 6, 1371–1384.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.

Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-90.

Burri L., Strahm Y., Hawkins C.J., Gentle I.E., Puryer M.A., Verhagen A., Callus B., Vaux D., Lithgow T. (2005) Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2926-33.

Cai, Q., Sun, H., Peng, Y., Lu, J., Nikolovska-Coleska, Z., McEchern, 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**, 2714-2726.

Carosati E., van den Höfel N., Reif M., Randazzo G. M., Stanitzki B., Stevens J., Gabbert H. E., Cruciani G., Mannhold R. and Mahotka C. (2015) Discovery of Novel, Potent, and Specific Cell-Death Inducers in the Jurkat Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *ChemMedChem*, vol. 10, no. 10, 1700–1706.

Chai J., Du C., Wu J., Kyin S., Wang X. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-862.

Chen Z., Naito M., Hori S., Mashiima T., Yamori T., Tsuruo T. (1999) A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 847–854.

Creagh E.M., Murphy B.M., Duriez P.J., Duckett C.S., Martin S.J. (2004) Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 26906–26914.

Crook N., Clem R., Miller L. (1993) An apoptotic-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology* **5**, 2168-2174.

Daniel N. N., Korsmeyer S. J. (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 205-219.

De Almagro M.C., Vucic D. (2012) The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp. oncol.* **34**, 200-11.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* **1**, 112–119.

Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.

Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Salvesen G.S., Reed J.C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* **17**, 2215-23.

Deveraux Q.L., Reed J.C. (1999) IAP family proteins - suppressor of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.

Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H., Welsh K., Salvesen G., Reed J. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* **18**, 5242-51.

DiPersio J., Erba H., Larson R., Luger S., Mangan K., Tallman M., et al. (2014) Phase I study of Debio1143 (AT406) in combination with daunorubicin (D) and cytarabine (C) in patients with poor-risk acute myeloid leukemia (AML). *J Clin Oncol* **32**, 7029.

DiPersio J. F., Erba H. P., Larson R. A., Luger S. M., Tallman M. S., Brill J. M., Vuagniaux G., Rouits E., Sorensen J. M., Zanna C. (2015) Oral Debio1143 (AT406), an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins, combined with daunorubicin and cytarabine in patients with poor-risk acute myeloid leukemia—results of a phase I dose-escalation study. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* **15**, 443–449.

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.

Duckett C., Nava V., Gedrich R., Clem R., Van Dongen J., Gilfillian M., Thompson C. (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitor. *EMBO J.* **15**, 2685-2689.

Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H. (1999) Mammalian caspase: structure, activation, substrates, and functions during Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.

Eschenburg G., Eggert A., Schramm A., Lode H. N., Hundsdoerfer P. (2012) Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF-alpha-independent apoptosis, *Cancer research* **72**, 2645– 2656.

Flygare J.A., Fairbrother W.J. (2010) Small-molecule pan-AIP antagonist: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* **20**, 251-67.

Flygare J.A., Beresini M., Budha N., Chan H., Chan I.T., Cheeti S., Cohen F., Deshayes K., Doerner K., Eckhardt S.G., Elliott L.O., Feng B., Franklin M.C., Reisner S.F., Gazzard L., Halladay J., Hymowitz S.G., La H., LoRusso P., Maurer B., Murray L., Plise E., Quan C., Stephan J.P., Young S.G., Tom J., Tsui V., Um J., Varfolomeev E., Vucic D., Wagner A.J., Wallweber H.J., Wang L., Ware J., Wen Z., Wong H., Wong J.M., Wong M., Wong S., Yu R., Zobel K., Fairbrother W.J. (2012) Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). *J. Med. Chem.* **55**, 4101-13.

Fox N.L., Humphreys R., Luster T.A., Klein J., Gallant G. (2010) Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) Receptor-1 and Receptor-2 agonists for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **10**, 1–18.

Fulda S., Wick W., Weller M., Debatin K.M. (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anti-cancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nature Medicine* **8**, 808-815.

Fulda S., Vucic D. (2012) Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews* **11**, 109-123.

- Fulda S. (2012) Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins as therapeutic targets for radiosensitization of human cancers. *Cancer Treat Rev* **38**, 760–6.
- Fulda S. (2015) Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* **21**, 5030-6.
- Garcia M. A., Ramirez A., Jimenes G., Lopez-Ruiz E., Perán M., Picón M., . . . Marchal J. A. (2012) Apoptosis as a Therapeutic Target in Cancer and Cancer Stem Cells: Novel Strategies and Futures Perspectives. *Apoptosis and Medicine* **125**, INTECH.
- Giagkousiklidis S., Vellanki S.H., Debatin K.M., Fulda S. (2007) Sensitization of pancreatic carcinoma cells for gamma-irradiation-induced apoptosis by XIAP inhibition. *Oncogene* **26**, 7006–16.
- Goldstein J. C., Waterhouse N. J., Juin P., Evan G. I., Green D. R. (2000) The coordinate release of cytochrom c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology* **2**,156-162.
- Green D.R., Kroemer G. (2004) The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* **305**, 626-629.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646-74.
- Hashimoto K., Saito B., Miyamoto N., Oguro Y., Tomita D., Shiokawa Z., Asano M., Kakei H., Taya N., Kawasaki M., Sumi H., Yabuki M., Iwai K., Yoshida S., Yoshimatsu M., Aoyama K., Kosugi Y., Kojima T., Morishita N., Dougan D.R., Snell G.P., Imamura S., Ishikawa T. (2013) Design and synthesis of potent inhibitor of apoptosis (IAP) proteins antagonists bearing an octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine scaffold as a novel proline mimetic. *J. Med. Chem.* **56**. 1228-46.
- Hauser H., Bardroff M., Pyrowolakis G., Jentsch S. (1998) A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J. Cell Biol.* **141**, 1415-1422.
- Hengartner M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Herold G. und Mitarbeiter (2011). Innere Medizin. Köln, Germany: By Gerd Herold.
- Hillienhof A. (2012) Todesursachen: Jeder Vierte stirbt an Krebs. *Deutsche Ärzteblatt* **109**.

- Homburg C., de Haas M., von dem Borne A. V., Reutelingsperger C., Ross D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* **2**, 523-40.
- 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, *Tumor Biology* **36**, 577–584.
- Hui S.K., Tse M.K., Yang Y., Wong B.Y., Sze K.H. (2010) Backbone and side-chain 1H, 13C and 15N assignments of the ubiquitin-associated domain of human X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biomol. NMR Assign* **4**, 13-15.
- Jin Z., El-Deiry W.S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 139–163.
- Joazeiro C. A. Weissman A. M. (2000) RING Finger Proteins: Mediator of Ubiquitin Ligase Activity. *Cell* **5**, 549-552.
- Kasof G.M., Gomes B.C. (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.* **276**, 3238–3246.
- Kerr J., Wyllie A., Currie A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-rangng implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Kohts K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T. (1997) Capase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8.
- 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. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1784–1794.
- Lagacé M., Xuan J.Y., Young S.S., McRoberts C., Maier J., Rajcan-Separovic E., Korneluk R.G. (2001) Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* **77**, 181-8.

Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. (2001) Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* **7**, 383-5.

Liston P., Roy N., Tamai K., Lefebvre C., Baird S., Cherton-Horvat G., Farahani R., McLean M., Ikeda J-E., MacKenzie A., Korneluk R.G. (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349–353.

Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57.

Liu Z., Sun C., Olejniczak E.T., Meadows R.P., Betz S.F., Oost T., Herrmann J., Wu J.C., Fesik S.W. (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004-1008.

Lu M., Lin S.C., Huang Y., Kang Y.J., Rich R., Lo Y.C., Myszka D., Han J., Wu H. (2007) XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol. Cell* **26**, 689–702.

Mannhold R., Fulda S., Carosati E. (2010) IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Elsevier* **15**, 210-219.

Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1545–1556.

Nagane M., Huang H.J., Cavenee W.K. (2001) The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* **6**, 191-7.

Nagata S. (1997) Apoptosis by Death Factor. *Cell* **3**, 355-365.

Ndubaku C., Varfolomeev E., Wang L., Zobel K., Lau K., Elliott L.O., Maurer B., Fedorova A.V., Dynek J.N., Koehler M., Hymowitz S.G., Tsui V., Deshayes K., Fairbrother W.J., Flygare J.A., Vucic D. (2009) Antagonism of c-IAP and XIAP Proteins Is Required for Efficient Induction of Cell Death by Small-molecule IAP Antagonists. *ACS Chemical Biology* **4**, 557-566.

Neumann S., Bidon T., Branschädel M., Krippner-Heidenreich A., Scheurich P., Doszczal M. (2012) The transmembrane domains of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors 1 and 2 co-regulate apoptotic signaling capacity. *PLoS ONE* **7**, e42526.

Nicoletti I., Migliorati G., Paliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **139**, 271-279.

Ocker M., Höpfner M. (2012) Apoptosis-Modulating Drugs for Improved Cancer Therapy. *Eur. Surg. Res.* **48**, 111-120.

Petrucci E., Pasquini L., Petronelli A., Saulle E., Mariani G., Riccioni R., et al. (2007) A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL-mediated cell death of ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* **105**, 481–92.

Petrucci E., Pasquini L., Bernabei M., Saulle E., Biffoni M., Accarpio F., Sibio S., Di Giorgio A., Di Donato V., Casorelli A., Benedetti-Panici P., Testa U. (2012) A small molecule SMAC mimic LBW242 potentiates TRAIL- and anticancer drug-mediated cell death of ovarian cancer cells. *PloS one* **7**, e35073.

Rassow J., Deutzmann R., Netzker R., Hauser K., (2006) Duale Reihe Biochemie. 1. Auflage, Thieme, Stuttgart.

Richter B.W., Mir S.S., Eiben L.J., Lewis J., Reffey S.B., Frattini A., Tian L., Frank S., Youle R.J., Nelson D.L., Notarangelo L.D., Vezzoni P., Fearnhead H.O., Duckett C.S. (2001) Molecular Cloning of ILP-2, a Novel Member of the Inhibitor of Apoptosis Protein Family. *Mol. Cell Biol.* **21**, 4292–4301.

Riedl S.J., Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 897-907.

Rothe M., Pan M.-G., Henzel W., Ayres T., Goeddel D. (1995) The TNFR3-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252.

Roy N., Mahadevan M.S., McLean M., Shutler G., Yaraghi Z., Farahani R., Baird S., Besner-Johnston A., Lefebvre C., Kang X., et al. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167–178.

Salvesen G.S., Duckett C. S. (2002) Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401-10.

Schmitz S. und Desel C. (2018) *Der Experimentator Zellbiologie*. 1. Auflage, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

Schneider U., Schwenk H., 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. Chancer* **19**, 621-626.

Scott F.L., Denault J.B., Riedl S.J., Shin H., Renatus M., Salvesen G.S. (2005) XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* **24**, 645-655.

Sitzmann F. C. (2006) *Duale Reihe Pädiatrie*. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart.

Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962.

Stevens J. (2013) Die Wirkung neuer Smac-Mimetika auf eine Leukämie-Zelllinie. Masterarbeit. Pathologische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Stevens J., Carosati E., Randazzo G., Mannhold R., Horsch L. D., Schneider A., Heikhaus S., Cruciani G., Gabbert H. E., Mahotka C. (2014) Novel apoptosis inducers overcome IAP-mediated resistance of the renal cell carcinoma cell line ClearCa-2, *Oncology Research and Treatment* **37**, 23.

Stevens J., Carosati E., Randazzo G. M., Mannhold R., Mahotka C. (2016) LBPS03, a novel apoptosis inducer, overcomes a XIAP-mediated resistance by reactivation of caspases in the multidrug-resistant RCC cell line ClearCa-2, *Oncology Research and Treatment* **39**, 68.

Stevens J., (2017) Die Wirkung neuartiger Zelltod-Aktivatoren auf das Nierenzellkarzinom. Inaugural-Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Straub C.S. (2011) Targeting IAPs as an approach to anti-cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* **11**, 291-316.

Sun H., Nikolovska-Coleska Z., Lu J., Meagher J.L., Yang C.Y., Qiu S., Tomita Y., Ueda Y., Jiang S., Krajewski K., Roller P.P., Stuckey J.A., Wang S. (2007) Design, synthesis, and characterization of a potent, non-peptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15279-94.

Sun H., Nikolovska-Coleska Z., Yang C.Y., Qian D., Lu J., Qiu S., Bai L., Peng Y., Cai Q., Wang S. (2008) Design of Small-Molecule Peptidic and Non-Peptidic Smac Mimetics. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1264–1277.

Sun W., Nikolovska-Coleska Z., Qin D., Sun H., Yang C.Y., Bai L., Qiu S., Wang Y., Ma D., Wang S. (2009) Design, synthesis, and evaluating of potent, nonpeptidic mimetics of second mitochondria-derived activator of caspases. *J Med Chem.* **52**, 593-6.

Swerdlow ST, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R et al. (2016) The revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* **127**, 2375 – 90.

Thompson C. B., (1995) Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* **267**, 1456-62.

Thornberry N., Rano T., Peterson E., Rasper D., Timkey T., Garcia-Calvon M., Nicholson D. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **29**, 17907-11.

Thornberry N A. (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell Death and Differentiation.* **6**, 1023-7.

Uren A. G., Pakusch M., Hawkins C.J., Puls K.L., Vaux D.L. (1996) Cloning an expression of apoptosis inhibitory protein homolog that function to inhibit apoptosis and/ or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**, 4974–4978.

van den Höfel N., Carosati E., Randazzo, G., Abo Houf A., Mannhold R., Cruciani G., Funke S., Heikau S., Gabbert H. E., Mahotka C. (2014) Novel apoptosis inducers in the acute lymphatic leukemia cell line JM. *Oncology Research and Treatment* **37**, 130.

Vanden, B. T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. and Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 15, no. 2, 135–147.

Varfolomeev E., Blankenship J., Wayson S., Fedorova A., Kayagaki N., Garg P. (2007) IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAP1, NF- κ B activation, and TNF- α dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681.

Varfolomeev E., Goncharov T., Fedorova A., Dynek J., Zobel K., Deshayes K. (2008) c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 24295-24299.

Varfolomeev E., Vucic D. (2008) (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NF- κ B signaling pathways. *Cell Cycle* **7**, 1511-21.

Varfolomeev E., Alicke B., Elliot J.M., Zobel K., West K., Wong H., Scheer J.M., Ashkenazi A., Gould S.E., Fairbrother W.J., Vucic D. (2009) X chromosome-linked inhibitor of apoptosis regulates cell death induction by proapoptotic receptor agonists. *J. Biol. Chem.* **284**, 34553-34560.

Varfolomeev E., Goncharov T., Maecker H., Zobel K., Kömüves L.G., Deshayes K., Vucic D. (2012) Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF- κ B and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. *Sci. Signal.* **5**, ra22.

Vellanki S.H., Grabrucker A., Liebau S., Proepper C., Eramo A., Braun V., et al. (2009) Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia* **11**, 743–52.

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Vaux D. L. (2000) Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **102**, 43-53.

Vrooman OP, Witjes JA. (2009) Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *International Journal of Urology* **16**, 234-243.

Vucic D., Stennicke H.R., Pisabarro M.T., Salvessen G.S., Dixit V.M. (2000) ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr. Biol.* **10**, 1359–1366.

Vucic D., Deshayes K., Ackerly H., Pisabarro M.T., Kadkhodayan S., Fairbrother W.J., Dixit V.M. (2002) SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *J. Biol. Chem.* **277**, 12275-12279.

Vucic D., Fairbrother W. (2007) The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5995-6000.

Vucic D., Dixit V.M., Wertz I.E. (2011) Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 439-52.

Wagener C. (1999) *Molekulare Onkologie*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Wagner L., Marshall V., Karl S., Cristofanon S., Zobel K., Deshayes K., Fulda S. (2012) Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP-1 and NF-kappaB-dependent manner. *Oncogene* **8**, 988-997.

Weisberg E., Kung A.L., Wright R.D., Moreno D., Catley L., Ray A., et al. (2007) Potentiation of antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: effects on mutant FLT3-expressing cells. *Mol Cancer Ther* **6**, 1951-61.

Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673-82.

Wu G., Chai J., Suber T. L., Wu J.-W., Du C., Wang X. S. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/Diablo. *Nature* **408**, 1008-12.

Wyllie A., Kerr J., Currie A. (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology* **68**, 251-36.

Yang Q.H., Du C. (2004) Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 16963-16970.

Zamzami N, Kroemer G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 67-71.

Zender L., Spector M.S., Xue W., Flemming P., Cordon-Cardo C., Silke J., Fan S.T., Luk J.M., Wigler M., Hannon G.J., Mu D., Lucito R., Powers S., Lowe S.W. (2006) Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach. *Cell* **125**, 1253-67.

Zhang S., Li G., Zhao Y., Liu G., Wang Y., Ma X., Lu J. (2012) Smac Mimetic SM-164 Potentiates APO2L/TRAIL- and Doxorubicin-Mediated Anticancer Activity in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS One* **7**, e51461-e51461.

Ziegler D.S., Keating J., Kesari S., Fast E.M., Zawel L., Ramakrishna N., et al. (2011) A small-molecule IAP inhibitor overcomes resistance to cytotoxic therapies in malignant gliomas in vitro and in vivo. *Neuro Oncol* **13**, 820–9.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405–413.

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. H. E. Gabbert bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion an seinem Institut zu realisieren.

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

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. C. Mahotka für die Übernahme des Gutachtens und für die gute Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und das Interesse am Fortgang dieser Dissertation. Mir hat es sehr viel Freude bereitet, mich mit einem so interessanten und aktuellen Thema auseinander setzen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Mannhold, der leider viel zu früh verstorben ist, sowie Herrn Dr. E. Carosati und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Bereitstellung der Smac-Mimetika.

Zudem möchte ich mich bei meinen Laborkollegen für die herzliche Atmosphäre und die Hilfestellungen bedanken, sodass die Arbeit im Labor mir stets Freude bereitet hat.

Und last but not least natürlich meinen herzlichen Dank an meine liebe Familie. Ihr habt mich in jeder Lebenssituation unterstützt, an mich geglaubt und mir stets zur Seite gestanden. Ich danke meinen Sohn für seine ansteckende Lebensfreude. Insbesondere meine Eltern und mein Bruder Nuri haben mir in den letzten Jahren viel Kraft und Halt gegeben. Das bedeutet mir sehr viel. Danke!