

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. A. C. Kübler

**Analyse der Wirksamkeit der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und
der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel auf Zellen des Multiplen Myeloms**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lion Maximilian Schübler

aus Heidelberg

Würzburg, 2019

Referent: Prof. Dr. Dr. Urs Müller-Richter
Korreferent: Prof. Dr. Uwe Gbureck
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2020

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner Mutter Dr. Isolde Schüßler
(1959-2015)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1 -
1.1 Das Multiple Myelom.....	1 -
1.1.1 Grundlagen der Erkrankung.....	1 -
1.1.2 Klinik und Diagnostik.....	4 -
1.1.2.1 Klinik.....	4 -
1.1.2.2 Diagnostik.....	5 -
1.1.3 Aktuelle Therapieformen des Multiplen Myeloms.....	6 -
1.1.4 Die Taxane Docetaxel und Paclitaxel	8 -
1.2 SMAC Mimetics.....	10 -
1.2.1 Grundlagen des Wirkungsmechanismus der SMAC Mimetics	10 -
1.2.2 Funktion und Aufbau der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161	12 -
1.2.3 Grundlagen der Apoptose	15 -
2. Zielsetzung der Arbeit.....	18 -
3. Material und Methoden	19 -
3.1 Materialien	19 -
3.1.1 Zellkulturen und Zellmedium.....	19 -
3.1.2 Materialien zu den Proliferationsassays.....	20 -
3.1.3 Materialien zum Western Blot	21 -
3.1.4 Diverse Verbrauchsmaterialien und Geräte	23 -
3.2 Methoden	24 -
3.2.1 Kultivierung der Zelllinien.....	24 -
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	24 -
3.2.3 Proliferationsassays	25 -
3.2.3.1 Proliferationsassays mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161	25 -
3.2.3.2 Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel	26 -
3.2.3.3 Proliferationsassays kombiniert mit SMAC Mimetics und Zytostatika	26 -
3.2.3d Auswertung der Proliferationsassays mit WST-1	28 -
3.2.4 Western Blot.....	29 -
3.2.4.1 Vorbereitung der Zellproben als Gesamtzelllysat.....	29 -
3.2.4.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29 -
3.2.4.3 Western Blot.....	30 -
3.2.5 Mikroskopische Aufnahmen	31 -
3.2.6 Statistische Auswertung.....	31 -
4. Ergebnisse.....	33 -
4.1 Proliferationsassays	33 -

4.1.1 Proliferationsassays mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161	33 -
4.1.2 Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel als Monotherapie und in Kombination mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161	36 -
4.1.2.1 Proliferationsassays kombiniert mit dem SMAC Mimetic Birinapant und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel	39 -
4.1.2.2 Proliferationsassays kombiniert mit dem SMAC Mimetic BV6 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel	41 -
4.1.2.3 Proliferationsassays kombiniert mit den SMAC Mimetic LCL161 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel	44 -
4.2 Analyse der Expression von cIAP1, cIAP2 und XIAP im Western Blot	47 -
5. Diskussion.....	51 -
5.1 Wertung und Vergleich der Monotherapien der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel	51 -
5.2 Wertung und Vergleich der Kombinationstherapien mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel.....	55 -
5.3 Resumee, Limitationen der Studie und Ausblick.....	58 -
6. Zusammenfassung.....	63 -
7. Literaturverzeichnis.....	65 -
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	77 -
8.1 Abbildungen.....	77 -
8.2 Tabellen.....	79 -
9. Danksagung	
10. Lebenslauf	
Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Ala	Alanin
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APO1	Apoptosis antigen 1
ATP	Adenosine triphosphate
AVPI	Alanin, Valine, Proline, Isoleucine
BAK	BCL2 homologous antagonist/killer
BAX	BCL2 associated protein x
BCL2	B-cell lymphoma 2
BH3	BCL2 homology 3
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
CAP3	Cytotoxicity-dependent APO1-associated protein 3
CARD	Caspase recognition domain
Caspase	CysteinyI-aspartate specific protease
cFLIP	Cellular FLICE-like inhibitory protein
cIAP1/2	Cellular inhibitor of apoptosis 1/2
CRAP	Calcium, renal failure, anemia, bone lesions
DD	Death domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signalling complex
<i>DKK1</i>	Dickkopf-1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DR5	Death receptor 5
FADD	Fas-associated death domain protein
FAS	First apoptosis signal
FasL	FAS ligand
FasR	FAS receptor
FBS	Fetal bovine serum
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FLC	Free light chains
FLICE	Fas-like interleukin (IL)-1 β converting enzyme
HIV	human immunodeficiency virus
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC	Inhibitory concentration
IgA	Immunoglobulin A
IgD	Immunoglobulin D
IgG	Immunoglobulin G
IKK	Inhibitor of κ B-kinase
Ile	Isoleucine
IMWG	International myeloma working group
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MM	Multiple myeloma
MRT	Magnetic resonance tomography
NCCN	National comprehensive cancer network
Nec-1	Necrostatin-1

NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells
NIK	NF- κ B -inducing kinase
PET	Positron emission tomography
PET/CT	Positron emission tomography/computed tomography
pI	Isoelectric point
Pro	Proline
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RING	Really interesting new gene
RIP1	Receptor interacting protein 1
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RKIP	RAF-1 kinase inhibitor protein
rpm	Revolutions per minute
RPMI	RosWell park memorial institute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
TBS	Tris-buffered saline
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFR1/2	Tumor necrosis factor receptor-1/2
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRADD	TNF- α receptor associated death domain
TRAF2/5	TNFR associated factor 2/5
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRIS	Tromethamin
Val	Valine
WST-1	Water soluble tetrazolium
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
YY1	Ying yang 1

1. Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

1.1.1 Grundlagen der Erkrankung

Das Multiple Myelom (MM), eine Erkrankung, die zu den monoklonalen Gammopathien zählt, zeichnet sich durch die maligne Transformation und Proliferation einer einzelnen, monoklonalen, sich im Knochenmark befindlichen Plasmazelle aus. Deren Klone wachsen oftmals invasiv in umliegenden Knochen und sezernieren große Mengen an Fragmenten von funktionslosen Paraproteinen wie zum Beispiel Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin D (IgD) oder nur deren Leichtketten κ und λ . Das klinische Bild des MM wird unter anderem von Symptomen wie Knochenbrüchen und Knochenschmerzen, Hyperkalzämie oder Nierenschädigungen charakterisiert. Im Deutschen wird als Synonym für das MM auch der Begriff Plasmozytom verwendet; im angloamerikanischen Sprachraum findet hier jedoch eine Differenzierung statt: Während das Plasmozytom für einen enossalen, solitären Plasmazelltumor steht, so spricht man von einem MM erst bei einer medullären Streuung des Tumors. Weiter abzugrenzen ist hiervon der Begriff „solitäres Plasmozytom“, welches für einen isolierten Plasmazellentumor steht und sowohl ossär, als auch extramedullär auftreten kann. Kommt es zu einer extramedullären Verbreitung der maligne transformierten Zellen in die Blutbahn, so spricht man von einer Plasmazellenleukämie. (1–3)

Dem MM vorangehend ist die symptomlose monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), die sich unter anderem durch eine unter 10% liegende Infiltration von klonalen Plasmazellen im Knochenmark abgrenzt und bei betroffenen Patienten je nach Typ der MGUS ein Risiko von circa einem Prozent zu einem Fortschreiten in ein MM ausmacht. Diverse genetische Vorgänge in den entarteten Plasmazellen wie karyotypische Instabilitäten, Translokationen, Deletionen und andere Mutationen sind entscheidend, um die MGUS bis hin zum MM voranzutreiben. Formen, wie das smouldering Myeloma oder das solitäre Plasmozytom weisen ebenfalls ein Risiko zum Fortschreiten in ein MM auf. (4) Eine Differenzierung der verschiedenen Formen kann „Tabelle 1 - Vorstufen des Multiplen Myeloms“ entnommen werden.

Tabelle 1 - Vorstufen des Multiplen Myeloms (5–8)

	Multiples Myelom	Smouldering Myeloma	MGUS („non-IgM type“)	Solitäres Plasmozytom
Malignität	maligne	benigne	benigne	benigne
Klonale Plasmazelle im Knochenmark	≥ 10%	≥ 10%	< 10%	< 10%
Monoklonales Protein im Serum	Nachweisbar, Level variabel	≥ 30 g/l	< 30 g/l	0 - 20 g/l
Endorganschäden	Nachweisbar	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
Risiko der Entartung in ein Multiples Myelom	-	10% innerhalb von 1 Jahr	1% innerhalb von 1 Jahr	20 – 60% innerhalb von 3 Jahren

Je nach vorliegendem Stadium und Aggressivität der Erkrankung kann die Überlebenszeit im Schnitt nach der Diagnosestellung zwischen 19 und 72 Monaten liegen. Die Prognose ist mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 45% und 48% auf Grund mangelnder kurativer Therapiemöglichkeiten ungünstig. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter, unter anderem abhängig vom Geschlecht, bei ca. 72 – 74 Jahren, junge Patienten sind selten betroffen (etwa 2 Prozent). Die Inzidenz steht bei 4-6 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen. Da die Ursache, die zu einer unkontrollierten Proliferation der Plasmazellen führt, bislang unklar ist, vermutet man Mutationen u.a. in Onkogenen, ausgelöst durch Risikofaktoren wie Virusinfektionen (HIV und Hepatitis), Umweltgifte oder Strahlenbelastungen. (9) Bestimmte Varianten von Genen konnten mit einem erhöhten Risiko an einem Multiplen Myelom zu erkranken in Zusammenhang gebracht werden. Die Genvariation basiert dabei auf dem Austausch lediglich eines Basenpaares und wird als Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) bezeichnet. Je nach ethnischer Herkunft des Individuums unterscheidet sich die Wahrscheinlichkeit ein solches SNP in einem für die Entstehung der Erkrankung relevanten Gen zu tragen. Ein erhöhtes Risiko weisen auch Menschen mit an Multiplem Myelom erkrankten Verwandten auf. (10,11)

Auf diese Genmutation folgend werden verschiedene Modelle für die weitere Entwicklung hin zu einem Multiplen Myelom verwendet. Hallek *et al.* beschreibt eine lineare klonale Evolution, was bedeutet, dass jede zusätzlich auftretende genetische Aberration in den Plasmazellen die Erkrankung von einem prämaligen Stadium bis hin zum Multiplen Myelom vorantreibt. (12)

Hose *et al.* hingegen spricht von einer subtilen klonalen Evolution mit klonaler Heterogenität und Konkurrenz. Das wiederum bedeutet, dass nur zu Beginn eine genetische Instabilität auftritt, die dazu führt, dass sich diese entarteten Zellen in der Nische der Plasmazellen ausbreiten. Mit steigender Zellzahl führt das zu einer Veränderung der Mikroumgebung des Knochenmarks, sowie zusätzlich zu einem Selektionsdruck, welcher neue Nischen generieren lässt und sich somit die Erkrankung über die verschiedenen Vorstufen zum Multiplen Myelom weiterentwickelt. Die klonale Heterogenität ergibt sich aus der Fehleranfälligkeit der Teilungszyklen der malignen Zellen. (13)

1.1.2 Klinik und Diagnostik

1.1.2.1 Klinik

Die ersten Symptome von denen Patienten vor der Diagnosestellung berichten sind eine reduzierte Leistungsfähigkeit und Schwäche, eine erhöhte Infektneigung, sowie Rücken- und Knochenschmerzen. Diese Symptomatik, teils beeinflusst auf Grund der folgenden Therapie aber auch durch die enorme psychologische Belastung, wird durch Schlafstörungen, Depressionen und Ängste, Obstipation, Muskelkrämpfe oder Atembeschwerden erweitert. Insgesamt sind in der Literatur über den Krankheitsverlauf des MM hinweg 27 verschiedene Symptome mit unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben. (14)

Ein wesentlicher Faktor für die klinische Symptomatik ist unter anderem die Beeinflussung der Homöostase zwischen Osteoklasten und Osteoblasten durch die neoplastischen MM-Zellen, zum einen durch einen erhöhten Spiegel an osteoklastenaktivierenden RANKL-Faktor und zum anderen durch eine erhöhte Produktion an osteoblastenhemmenden DKK1-Faktor. Dies führt zum Abbau von Knochenhartsubstanz in Form von Osteolysen und letztendlich zu Knochenbrüchen und Schmerzen, sowie zu einer Freisetzung von Kalzium aus den osteolytischen Bereichen und entsprechend zu einer Hyperkalzämie und Hyperkalziurie. (15,16)

Aufgrund der fortschreitenden Vermehrung von maligne transformierten Plasmazellen wird die im Knochenmark befindliche Blutbildung gestört, was sich klinisch in einer Anämie, Granulozytopenie und einer Thrombozytopenie darstellt und gleichzeitig zu einem sekundären Antikörpermangelsyndrom führt. Dieses Syndrom ist die Folge einer, mit der wachsenden Tumorzellmasse einhergehenden, erhöhten Sekretion von Paraproteinen, welche die Menge an normal ausgebildeten Immunglobulinen absenkt. (1) Die Anämie wird zusätzlich durch einen Mangel an Erythropoetin verstärkt, welches in der Niere gebildet wird, die allerdings auf Grund verschiedener Faktoren (Hyperkalzämie, primäre Amyloidose, Filterung und Ablagerung von Leichtketten) in ihrer Funktionsfähigkeit, im Krankheitsverlauf zunehmend, eingeschränkt ist.

1.1.2.2 Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose „Multiples Myelom“ wird nach folgenden Kriterien gestellt, die sich unter dem Akronym „CRAB“ („Consisting of hypercalcaemia (Kalziumspiegel im Serum >1 mg/dl), **R**enal impairment (Kreatininspiegel im Serum >177 µmol/l), **A**naemia (Hämoglobin-Wert <20 g/l unter dem niedrigsten normalen Wert oder <100 g/l) and **B**one lesions (eine oder mehr diagnostizierte Osteolysen in einem bildgebenden Verfahren)“) zusammenfassen lassen. Ein kombiniertes Auftreten dieser Symptome erhärtet die Vermutung, dass ein MM vorliegt. (6,17)

Die Diagnosesicherung erfolgt zum einen über eine Gewebeprobe per Knochenmarkpunktion, welche jedoch auf Grund der herdförmigen Läsionen negativ ausfallen kann, zum anderen sind bildgebende Untersuchungsmethoden wie ein Skelett-Röntgen obligat, das gegebenenfalls um eine MRT, PET oder PET/CT erweitert werden kann. (17)

Ein Protein, welches als Korrelat zur Tumormasse ansteigt, ist das β_2 -Mikroglobulin, dessen Bestimmung, ebenso wie die oben genannten Parameter, zur Standarddiagnostik hinzugefügt wurde. Weitere Laborbefunde, die erhoben werden, sind ein Blutbild, die Blutsenkungsgeschwindigkeit und eine Bestimmung des Harnstoff-, Kreatinin-, Albumin-, Kalzium- (u.a. Elektrolyte) und Laktat-Dehydrogenase-Levels.

Allerdings stammen diese Diagnosekriterien aus einer Zeit, in der eine Frühtherapie nicht möglich war und somit ein MM erst bei vorliegenden Endorganschäden diagnostiziert und behandelt wurde. Entsprechend wurde von der IMWG eine Erweiterung der Diagnosekriterien mit Myelom assoziierten Biomarkern verabschiedet, die es ermöglicht, Patienten vor einer Endorganschädigung als behandlungsbedürftig einzustufen und entsprechend zu therapieren. (6)

Über den FISH-Test, welcher Chromosomenaberrationen ermittelt, kann sowohl die zytogenetische Diagnose für ein Vorliegen des Multiplen Myeloms gestellt werden als auch eine Aussage über den möglichen Krankheitsverlauf getroffen werden. (17) Hierbei werden unter anderem die 17p Deletion und die Translokation t(4;14) zur Krankheitsdiagnose ermittelt. Eine Unterteilung in eine Standard- und Hochrisikogruppe erfolgt über weitere Diagnostik von zusätzlichen Deletionen und Translokationen. (18)

1.1.3 Aktuelle Therapieformen des Multiplen Myeloms

Die vorhandenen Therapiemöglichkeiten des Multiplen Myeloms umfassen unter anderem Chemotherapien mit Zytostatika, Knochenmarkstransplantationen, Proteasom-Inhibitoren, Bisphosphonate oder immunmodulierende Medikamente. (15)

Die Induktionstherapie beinhaltet Proteasom-Inhibitoren wie zum Beispiel Bortezomib oder Carfilzomib, deren Wirkung darauf beruht, dass über die Bindung an das katalytische Zentrum des Proteasoms der Abbau von proapoptotischen Faktoren gehemmt wird. Multiple Myelom-Zellen weisen eine höhere Proteasomaktivität auf als normale Zellen und sind somit für diese Wirkstoffklasse sensibel. (19) Kombiniert werden die Proteasom-Inhibitoren mit Glucocorticoiden wie Dexamethason. (20,21) Die Glucocorticoide gehen eine Bindung mit im Zytosol vorkommenden Glucocorticoid-Rezeptoren ein. Dieser Komplex führt über seinen Wirkmechanismus an den Zielgenen zu einer vermehrten Expression von Annexin1 und MAPK-Phosphatasen, die über die Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- κ B indirekt die Apoptose der Zellen begünstigen. (22) Weitere Bestandteile der Induktionstherapie sind Immunmodulatoren oder Zytostatika wie Cyclophosphamid. (20,21) Cyclophosphamid wird erst in der Leber durch ein Cytochrom zu Aldophosphamid hydroxyliert und kann sich dann in einer spontanen Reaktion zu Phosphoramidmustard umwandeln, dessen zytotoxische Wirkung, wie die des Zytostatikums Melphalan, auf einer Quervernetzung von DNA-Strängen beruht. (23)

Derzeit wird über eine Initialtherapie von Patienten mit einer Vorstufe des MM diskutiert; eine präsymptomatische Behandlung zeigte Vorteile bei Patienten mit einer „high-risk smouldering myeloma“, indem die asymptomatische Zeitspanne verlängert werden konnte. (24) Im Allgemeinen wird jedoch eine Therapie erst dann begonnen, sobald eine auf das MM rückzuführende Symptomatik auftritt. (1)

Patienten mit einer Therapieindikation lassen sich zunächst in 2 Gruppen aufteilen: Patienten, welche als mögliche Empfänger für eine Knochenmarkstransplantation in Frage kommen und jene, denen diese Möglichkeit nicht offensteht. Die Einteilung wird nach Alter (nicht älter als 65 Jahre) und nach vorhandenen Komorbiditäten getroffen; im Allgemeinen müssen für eine Knochenmarkstransplantation sowohl Leber als auch Herz, Lunge und Niere (mit Einschränkungen) voll funktionsfähig sein. (2,17)

Nach einigen Zyklen der Initialtherapie wird eine Reevaluation der Therapie, bestehend aus Begutachtung der Laborwerte, einer Knochenmarksbiopsie und einer Befundung der Knochenhartschubstanz, empfohlen, um vor einer Transplantation eine dem Stadium angepasste Ausgangssituation zu gewährleisten. (17)

Als Standardtherapie wird nach einer Hochdosis-Chemotherapie mit z.B. Melphalan die autologe Stammzelltherapie vom NCCN empfohlen, wobei weitere Stammzellen im Vorfeld gesichert werden sollen, um bei einem nur teilweise optimalen Therapieergebnis weitere Therapieoptionen offen zu halten. Eine allogene Stammzelltherapie wird im Rahmen von klinischen Studien bei Patienten mit einer fortschreitenden Erkrankung oder bei Patienten mit einer fortschreitenden Erkrankung nach einer autologen Stammzelltherapie empfohlen. (17)

Die nächsten Behandlungsphasen dienen zum einen zur Verbesserung eines Ansprechens der Erkrankung auf die verabreichten Medikamente und zum anderen um eine Phase der Remission mit einer guten Lebensqualität möglichst lange aufrecht zu erhalten. Allerdings können weder für die Konsolidations- noch für die Erhaltungstherapie allgemeine klinische Maßnahmen empfohlen werden; gängige Medikamente sind wiederum Bortezomib, oder die immunmodulierenden Substanzen Lenalidomid und Thalidomid. (21)

Ein weiterer Bestandteil im Gesamtkonzept der Therapie des MM stellt die adjuvante Therapie dar: Insbesondere von einer Bisphosphonat-Gabe können Patienten in Bezug auf eine Verbesserung der Lebensqualität durch verringerte Schmerzen und Komplikationen, die in Zusammenhang mit Knochendefekten stehen, profitieren; eine Niedrigdosis-Bestrahlung kann als palliative Behandlung in Betracht gezogen werden. Die Prophylaxe von Infektionen, Thrombosen und Anämien, die durch den Tumor oder die verwendeten Therapien induziert werden können, sollte ebenso Teil der Behandlung des MM sein. (17,25)

Trotz fortschreitender Forschung bleibt das Multiple Myelom bis dato inkurabel. Eine besondere Herausforderung stellt hierbei die klonale Heterogenität der Erkrankung dar. Zum einen, weil sich an unterschiedlichen Stellen im Körper verschiedene Klone mit unterschiedlicher Aggressivität befinden können, was zu Fehlklassifikationen führen kann und zum anderen, weil sich die Zusammensetzung der Klonpopulation zeitlich und

mit der durchgeführten Therapie ändert. Somit gilt jedes Rezidiv als schwieriger zu therapieren mit einer folgenden kürzeren Remissionsdauer. (26)

Den Nachweis für eine klonale Heterogenität wurde von Egan *et al.* und Keats *et al.* erbracht. Hose *et al.* schlussfolgerte somit, dass ein partielles Ansprechen einer Therapie nicht unbedingt für die gesamte Tumorzellpopulation gilt, sondern nur für den entsprechend sensitiven Klon, während ein refraktärer Klon sich weiter vermehren kann bzw. stabil bleibt. (13,27,28)

Aus diesem Grund ist weitere Forschungsarbeit notwendig. Ein Ansatzpunkt für weiterführende Medikation stellt, die in Zellen des Multiplen Myeloms erhöhte Expression von Inhibitoren der Apoptose (IAPs) dar. Gegenspieler dieser IAPs sind SMAC Mimetics, welche in Abschnitt 1.2 thematisiert werden. (29,30)

1.1.4 Die Taxane Docetaxel und Paclitaxel

Das bereits seit 1996 als Zytostatikum eingesetzte Docetaxel, welches ebenso wie Paclitaxel zur Gruppe der Taxane gehört, ist ein halb-synthetisch hergestelltes Derivat, dessen Grundsubstanz ursprünglich aus der Rinde der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) gewonnen wurde. (31) Es ist ein Analogon des Zytostatikum Paclitaxel, welches circa 1970 aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert und dessen inhibitorische Wirkung beschrieben wurde. (32)

Der antiproliferative Wirkmechanismus basiert auf der Störung der Funktion des Spindelapparates, indem dessen Abbau gehemmt und somit der reguläre Ablauf der Mitose nicht stattfinden kann. Taxane binden an das β -Tubulin der Mikrotubuli, Bestandteile der Mitosespindel, stabilisieren diesen, sodass der für die Zellteilung notwendige Abbau blockiert wird und somit die Zelle in der Mitosephase stagniert und abschließend in den Zelltod übergeht. (33)

Das Anwendungsgebiet der Taxane erstreckt sich auf Behandlungen von Mamma-, Ovarial-, nicht kleinzelligen Bronchial-, Adenokarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren. Paclitaxel und Docetaxel wurden in Studien von Miller *et al.* und Liu *et al.* bereits als möglicherweise vielversprechend in der Therapie des Multiplen Myelom bewertet. (34–36) Limitierender Faktor für eine Verwendung von Docetaxel und Paclitaxel sind

neben einer geringen Erfolgsrate, insbesondere die hohen hämatologischen Nebenwirkungen. In einer Studie von Friedenberg *et al.* wird es als unwahrscheinlich angesehen, dass eine Therapie mit Docetaxel zu einem Erfolg in Bezug auf eine verlängerte Überlebensrate bei Patienten mit MM führt. (37,38)

1.2 SMAC Mimetics

Die bis dato vorliegenden Therapiemöglichkeiten für das MM erreichen im optimalen Fall eine Eindämmung der Symptomatik und Verlängerung der Lebenszeit mit entsprechender Lebensqualität, ein kurativer Effekt kann jedoch nicht erzielt werden. Aus diesem Grund werden neue Forschungsprojekte mit neuen Medikamenten und Strategien angestrebt, welche eine Verbesserung der bisherigen Therapiemöglichkeiten und eine Chance auf Heilung ermöglichen.

Untersuchungsergebnisse mit SMAC Mimetics erscheinen vielversprechend. So zeigte eine klinische Studie von Amaravadi *et al.* bei zwei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine röntgenologisch messbare Reduktion des Tumolvolumens. Bei weiteren sieben Patienten wurde eine Stagnation des Krankheitsverlaufes erzielt. Die Therapie erfolgte unter geringen Nebenwirkungen mit dem SMAC Mimetic Birinapant. (39)

Auch bereits das erste SMAC Mimetic GDC-0917, das in einer klinischen Studie an Patienten angewandt wurde, zeigte ermutigende Ergebnisse bei der Therapie von Ovarialkarzinomen und MALT-Lymphomen. Die in weiteren klinischen Studien verwendeten SMAC Mimetics DEBIO1143 oder LCL161 erreichten, ebenso wie GDC-0917, im besten Ergebnis eine vollständige Remission oder zumindest eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufes. (40–44)

Im Folgenden werden der Wirkmechanismus, der Aufbau der SMAC Mimetics und die Grundlagen der Apoptose beschrieben.

1.2.1 Grundlagen des Wirkungsmechanismus der SMAC Mimetics

Bei malignen Transformationen von Zellen, die mit einer unkontrollierten Proliferation einhergehen, ist die Einleitung der Apoptose gestört oder verhindert. Intrazelluläre Proteine der Familie der IAPs, wie zum Beispiel cIAP1, cIAP2 oder XIAP sind ein neuer interessanter Ansatzpunkt der Tumorthherapie. (44) SMAC Mimetics werden in klinischen Studien in unterschiedlichen Tumoren mit IAP-Überexpression erprobt. In Multiplen Myelom-Zellen werden insbesondere cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin in großen Mengen gebildet, was zu einer Unterdrückung der Apoptose und somit zum Überleben der kranken Zellen führt. (29,30)

Die in der Krebszelle vermehrt vorkommenden IAPs wirken als negative Rückkopplung für die Effektor-Caspasen 3, 7 und 9, indem sie über das Anhängen von Polyubiquitinketten die Caspasen markieren und somit für Proteasome kenntlich machen, welche sie anschließend in Fragmente zerkleinern und abbauen. (45)

Den Antagonisten zu den IAPs stellt das mitochondriale Protein SMAC („Second mitochondria-derived activator of caspase“), auch DIABLO („Direct Inhibitor of apoptosis-Binding protein with LOw pI“) genannt dar, welches auf apoptotische Reize hin durch Permeabilitäts-Transitions-Poren aus dem Mitochondrium ins Zytosol gelangt. Die Verbindung zwischen dem antagonistischen Protein SMAC/DIABLO und der Familie der Apoptoseinhibitoren erfolgt auf zellulärer Ebene zwischen einem N-terminalen Tetrapeptid (Ala1-Val2-Pro3-Ile4 (AVPI)) des SMAC/DIABLO und einer BIR-Domäne („Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat“) der IAPs. Das Protein XIAP, welches über zwei Bindungsstellen für die Caspasen 3, 7 und 9 nämlich BIR2 und BIR3 - verfügt, die die genannte Ubiquitinierung durchführen, kann an genau diesen beiden BIR-Domänen ebenso von SMAC/DIABLO gebunden werden. Dieser Verbindung zwischen SMAC und XIAP folgt nun eine Deaktivierung der Caspasen-inhibierenden Wirkung des XIAPs und einer daraus folgenden Fortsetzung, Förderung oder Initiation der Apoptose durch eine größere Menge an ungebundenen Caspasen 3, 7 und 9 (siehe Abbildung 1). (29,46)

Die IAPs cIAP1 und cIAP2 gehen nur mit geringer Affinität eine direkte Verbindung zu den Caspasen ein, sie erzielen das Überleben der Zelle durch die Hemmung von RIPK1/RIP1 und die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Bei den Transkriptionsfaktoren der Gruppe NF- κ B handelt es sich um Proteine, deren regulatorische Funktion am Nukleus zur Transkription von Genen führt, die unter anderem das Überleben der Zelle sichern; viele Krebsarten weisen in ihren maligne transformierten Zellen Mutationen dieser Transkriptionsfaktoren bzw. der entsprechenden Gene auf (47). Die Aktivierung der NF- κ B-Proteine geschieht im Zytosol über die Ubiquitinierung von RIPK1 durch cIAP1/2, katalysiert durch die an der RING-Domäne bereitgestellten E3-Ligase. RIPK1 bildet zusammen mit cIAP1 und/oder cIAP2, TRAF2/5 und TRADD einen so genannten Komplex I, welcher durch die Ubiquitinierung von RIPK1 dessen pro-apoptotische Regulation inhibiert und gleichzeitig den NF- κ B-Signalweg aktiviert, welcher die Transkription von anti-

apoptotisch Proteinen im Nukleus anregt. (48,49) Werden cIAP1 und cIAP2 nun in ihrer Funktion eingeschränkt und RIPK1 nicht markiert, so bildet RIPK1 im Zytosol einen Komplex II oder III mit dem Adapter-Molekül FADD und Caspase 8, was letztendlich über die proteolytische Spaltung der zellulären Strukturproteinen durch die Effektor-Caspasen mit dem Zelltod endet (siehe Abbildung 1). (47)

Da die Aktivierung der Caspase 8 über die Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Familie zustande kommt, wurde diese Familie im Zusammenhang mit dem durch IAP-Antagonisten induzierten Zelltod in Studien untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass eine Blockade von TNF- α , aber nicht von APO1 (auch FAS genannt), Zellen vor einem durch IAP-Antagonisten induzierten Zelltod schützte und somit dessen Rolle in einer Erforschung der Apoptose, eingeleitet durch IAP-Antagonisten, hervorhebt. (50)

Ebenso wie XIAP, werden auch cIAP1 und cIAP2 von SMAC/DIABLO inhibiert; die Bindung findet bei diesen IAPs allerdings nur an der BIR3-Domäne statt. (44) Synthetisch hergestellte Moleküle, die bestimmte Strukturen des SMAC/DIABLO Proteins aufweisen, können somit von entscheidender Bedeutung zur Sensitivierung von Zellen für den Zelltod sein, als auch unter bestimmten Voraussetzungen zur eigenständigen Auslösung der Apoptose führen. (51) Die SMAC Mimetics zielen darauf ab, genauso wie das körpereigene SMAC/DIABLO, sich an die vorgesehenen Stellen der IAPs zu heften und somit eine Änderung der Konformation herbeizuführen und folglich zu verhindern, dass der Signaltransduktionsweg der Apoptose bzw. die Effektor-Caspasen in ihrer Funktion gestört werden, was letztendlich zu einer Promotion der Apoptose führt. (52)

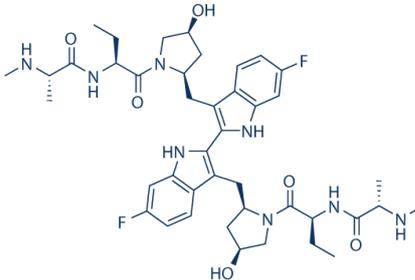
1.2.2 Funktion und Aufbau der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161

Da die in Multiplen Myelom-Zellen vorkommende Überexpression von IAPs die Apoptose unterbindet, sind SMAC Mimetics so konzipiert, dass sie die AVPI-Komponente des in der Zelle vorkommenden SMAC/DIABLO imitieren und somit das durch IAPs herbeigeführte Ausbleiben des Zelltodes verhindern. (44)

Ein Merkmal anhand dessen SMAC Mimetics differenziert werden können, ist die Anzahl der Bindungsstellen mit denen sie einen Inhibitor binden können. So besitzt Birinapant, ein bivalentes SMAC Mimetic, zwei AVPI-Motive, ebenso wie BV6; das SMAC

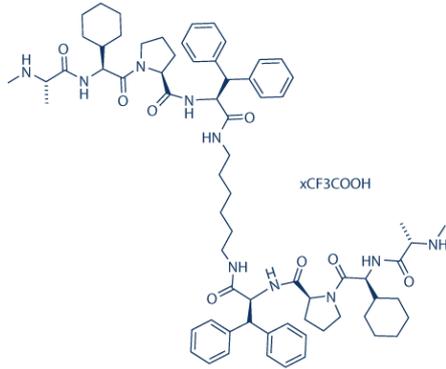
Mimetic LCL161 ist lediglich monovalent. (53) Abhängig von der Anzahl der Bindungsstellen sind bivalente SMAC-Mimetics um den Faktor 100-1000 wirkungsvoller in Bezug auf ein Auslösen der Apoptose in Tumorzellen. Im Gegensatz zu den bivalenten SMAC Mimetics erzielen monovalente SMAC Mimetics, auf Grund einer geringeren molekularen Masse, eine höhere orale Bioverfügbarkeit und scheinen so den bivalenten SMAC Mimetics als mögliches Medikament bei regelmäßiger und häufiger Einnahme überlegen. (54)

Tabelle 2 - SMAC Mimetic Birinapant (53)

Birinapant 	Relative Molekülmasse	806,94
	Summenformel	C ₄₂ H ₅₆ F ₂ N ₈ O ₆

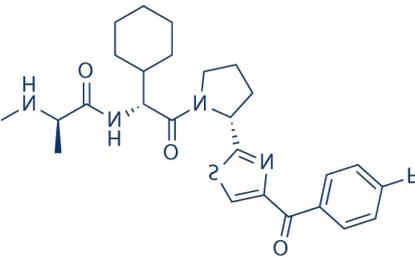
Birinapant (TL32711) bindet als bivalentes SMAC Mimetic mit großer Affinität an die BIR3 Domäne der IAPs XIAP, cIAP1 und cIAP2. Diese Verbindung resultiert in einer Autoubiquitinierung der IAPs mit proteasomaler Degradation von cIAP1 und cIAP2. Deren Abwesenheit führt anschließend zur Bildung des oben genannten Komplexes II oder III und der daraus folgenden Auslösung der Signalkaskade der Effektor-Caspasen und dem Zelltod. (54) Eine Degradation des Komplexes I zwischen cIAP1/2 und TRAF2 wird durch Birinapant nicht erzielt, jedoch konnte dem SMAC Mimetic nachgewiesen werden XIAP aus bereits bestehenden Bindungen mit aktivierten Caspasen verdrängen zu können. (46)

Tabelle 3 - SMAC Mimetic BV6 (53)

BV6		Relative Molekülmasse	1205,57
		Summenformel	$C_{70}H_{96}N_{10}O_8 \cdot xCF_3COOH$
			OH

Das bivalente SMAC Mimetic BV6 zeigt neben einer Affinität zur BIR2-/BIR3-Domäne von XIAP, auch Affinität zur BIR2-/BIR3-Domäne von cIAP1 und cIAP2. Während XIAP von BV6 sowohl an der BIR2- und der BIR3-Domäne gleichzeitig gebunden wird, werden cIAP1-Proteine mit größerer Affinität an der BIR3-Domäne gebunden, wodurch Komplexe, bestehend aus einem BV6-Molekül und zwei cIAP1-Molekülen, gebildet werden. Unabhängig von der Caspase-Aktivität führt diese Bindung zur Degradation von cIAP1/2 und zu einer Inhibition der Caspase-hemmenden Wirkung von XIAP. (30)

Tabelle 4 - SMAC Mimetic LCL161 (53)

LCL161		Relative Molekülmasse	500,63
		Summenformel	$C_{26}H_{33}FN_4O_3S$

Als weiterer Vertreter der SMAC Mimetics bindet das monovalente LCL161 mit hoher Affinität an cIAP1/2 und initiiert deren Degradation. Das Protein XIAP wird ebenfalls gebunden und inhibiert. (40)

1.2.3 Grundlagen der Apoptose

Die Apoptose, der programmierter Zelltod, ist ein aktiver zum Absterben der Zelle führender Prozess, welcher morphologische Veränderungen und molekulare Ereignisse mit sich bringt.

Eine Vielzahl an unterschiedlichen Komponenten ist an der Apoptose beteiligt. Intrazelluläre Enzyme, die Initiator-Caspasen, treten als Auslöser in verschiedenen Abschnitten einer Signalkaskade in Funktion (Caspase 2, 8, 9 und 10). Die Substrate der Effektor-Caspasen (3, 6 und 7) führen letzten Endes zum Zelltod. Im Zytoplasma liegen die Caspasen ständig in inaktiver Form vor.

Die am Mitochondrium wirkenden Proteine der BCL2-Familie nehmen eine regulierende Funktion in der Apoptose ein und beeinflussen somit den Ablauf der Signalkaskade. Sie werden nach ihrer Wirkweise in pro- und anti-apoptische Subfamilien unterteilt und sind über ihre entsprechende Wirkung am Mitochondrium entscheidend für ein Voranschreiten der Apoptose. Die „Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAPs) treten als Gegenspieler der Effektor- und Initiator-Caspasen auf, hemmen diese in ihrer Funktion (Caspasen 3, 7 und 9) und vermitteln eine Ubiquitinierung (Caspase 3 und 7), die letzten Endes zum Abbau der Caspasen durch Proteasome führt. Gleichzeitig wiederum findet eine Regulation bzw. Hemmung der IAPs über das mitochondriale SMAC/DIABLO Protein statt.

Die Auslösung des programmierten Zelltodes kann auf verschiedene Wege initiiert werden: über den extrinsischen und den intrinsischen Weg, wobei beiden Wegen die Aktivierung der Effektor-Caspasen gemeinsam ist.

Zentraler Bestandteil des extrinsischen Signalweges (siehe Abbildung 1), auch rezeptorvermittelte Apoptose genannt, ist die Bindung eines Liganden (FasL) an die extrazelluläre Domäne des passenden Rezeptors (FasR). Dieser Rezeptor, welcher zu der Tumornekrosefaktor Rezeptorfamilie (TNFR) zählt, bindet, nach seiner Ligandenbindung, an seiner zytosolischen Domäne Adaptermoleküle (FADD = Fas-associated death domain protein). Diese Kombination stellt mit weiteren Proteinen, wie das inhibitorische cFLIP, einen Proteinkomplex dar, welcher als DISC (Death-inducing signalling complex) bezeichnet wird. Der DISC aktiviert im weiteren Verlauf des

extrinsischen Weges zunächst die Initiator-Caspase 8 und indirekt in der folgenden Signalkaskade die Effektor-Caspasen. (55)

Typischer Vertreter eines solchen Rezeptors ist der oben genannte Fas-Rezeptor, auch APO1 genannt, welcher charakteristisch für ein Mitglied der TNFR in seiner extrazellulären Proteindomäne drei Cystein-reiche sich wiederholende Einheiten besitzt. Diese Cystein-Einheiten treten mit dem entsprechenden Fas-Liganden in Verbindung, was zu einer Trimerisierung der Monomere des Rezeptors führt. Der intrazelluläre Anteil des Rezeptors, bestehend aus einer Sequenz von 80 Aminosäuren, auch als „death domain“ (DD) bezeichnet, interagiert nun mit einem FADD und bildet über weitere Proteine (FLICE/CAP3) den DISC aus. Über Autokatalyse, wird anschließend Procaspase 8 aktiviert, welche wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 zur proteolytischen Spaltung essentieller Zellbestandteile, wie z.B. DNA-Reparatur-Enzyme und Strukturproteine wie Aktin oder Laminin, anregt und letzten Endes die Apoptose auslöst. (56)

Ein weiteres Mitglied der TNFR-Familie ist TNFR1, welches über seinen Liganden TNF- α das Adaptermolekül TRADD bindet und zusammen mit RIPK/RIP1 an der DD von TNFR1/2 einen Komplex bildet, welcher über biochemische Modifikationen im Zytosol FADD und Procaspase 8 und 10 rekrutiert und letztendlich aktiviert. Das Ende dieser Signalkaskade resultiert über die Effektor-Caspasen im Zelltod. (57)

Das Zytokin TNF- α kann allerdings auch anti-apoptotisch wirken: über Bindung an TNFR1 oder TNFR2 werden an der DD von TNFR1 TRAF2, RIPK/RIP1 und TRADD rekrutiert, bzw. an der zytosolischen Domäne von TNFR2 lediglich Moleküle der TRAF-Familie. Über die Proteine MAPK, NIK und IKK wird letztendlich das zytosolische NF- κ B angeregt im Nucleus die Transkription von Genen, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren oder zur Hemmung der Apoptose führen, einzuleiten. (44)

Der intrinsische Signalweg (siehe Abbildung 1) wird durch eine Störung der am Mitochondrium vorliegenden Balance zwischen dem anti-apoptotischen Protein BCL2 und pro-apoptotischen Proteinen wie BAK, BAX oder BID aktiviert. Auslöser sind intrazelluläre Signale wie z.B. DNA-Schädigungen, aber auch der extrinsische Signalweg kann über Aktivierung von BID durch Caspase 8 zu einer Störung der bestehenden Balance führen. Durch die daraus initiierte Bildung einer Permeabilitäts-Transitions-Pore

bricht das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran zusammen und resultiert in einer Freisetzung von mitochondrialen Apoptosemediatoren wie Cytochrom C, SMAC/Diablo und Endonuklease G. (44) Neben der Freisetzung des IAP-Gegenspieler SMAC/DIABLO wird Cytochrom C ins Zytosol entlassen und bindet nun an das Protein APAF1. Unter ATP-Verbrauch lagern sich weitere 6 APAF1-Moleküle scheibenartig an und bilden das Apoptosom oder „wheel of death“. Über CARD-Proteindomänen findet nun eine Wechselwirkung zwischen den APAF1-Molekülen und Procaspase 9 statt, welche über Autoproteolyse sich selbst aktiviert und im weiteren Verlauf die Proteolyse der inaktiven Effektor-Caspasen in deren aktive Formen induziert, was folglich mit der oben genannten Zerstörung von lebenswichtigen zellulären Proteinen und somit dem Zelltod einhergeht. (58,59)

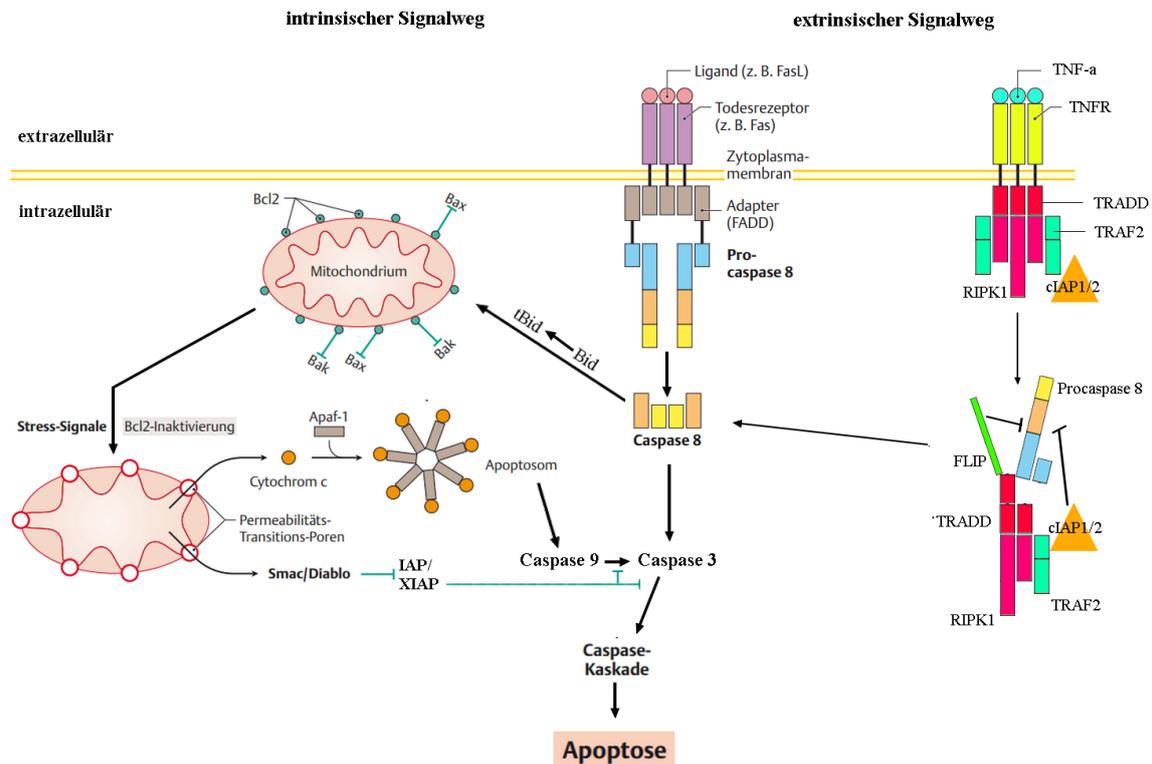


Abbildung 1 - Der in- und extrinsische Signalweg der Apoptose (modifiziert aus "Duale Reihe Biochemie 2016" unter Berücksichtigung des §60c des Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetzes)

2. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Wirkung und den direkten Vergleich der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 auf die IAPs cIAP1, cIAP2 und XIAP in Multiplen Myelom-Zellen klären. Ebenfalls soll die Wirkung der SMAC Mimetics auf die Zellviabilität der Multiplen Myelom Zellen dargestellt werden.

Des Weiteren befasst sich die Studie damit, ob Zytostatika der Gruppe der Taxane eine Wirkung auf die Multiplen Myelom-Zellen haben.

Ferner soll geklärt werden, welche Ergebnisse sich in Bezug auf die Zellviabilität aus einer Kombination von einem der SMAC Mimetics mit den Taxanen erzielen lassen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellkulturen und Zellmedium

Tabelle 5 - humane Zelllinien des Multiplen Myeloms (60–63)

Bezeichnung	Erkrankung	Eigenschaften	Ursprungsquelle
AMO-1	Plasmozytom	Suspensionszellen, einzeln wachsend, rund	Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Patientin
INA6	Multiples Myelom	Suspensionszellen, benötigt Interleukin-6 zum Wachstum	Pleuraerguss eines 80-jährigen Patienten
JJN-3	Plasmazellenleukämie	Suspensionszellen, einzeln wachsend, rund bis oval, mono- bis polynukleär	Knochenmark einer 57-jährigen Patientin
KMS-11	Multiples Myelom	Suspensionszellen, teilweiße mehrkernig, rund	Pleuraerguss einer 67-jährigen Patientin
KMS-12-BM	Multiples Myelom	Suspensionszellen, hauptsächlich einzeln wachsend 1-2% Riesenzellen	Knochenmark einer 64-jährigen Patientin
L-363	Plasmazellenleukämie	Suspensionszellen, einzeln wachsend, rund bis oval	Peripheres Blut einer 36-jährigen Patientin
MM.1S	Multiples Myelom	Suspensionszellen, teilweiße adhären, gruppiert und einzeln wachsend	Peripheres Blut einer 42-jährigen Patienten
OPM-2	Multiples Myelom	Suspensionszellen, einzeln wachsend, rund bis polygonal	Peripheres Blut einer 56-jährigen Patientin
RPMI-8226	Multiples Myelom	Suspensionszellen, adhären und einzeln wachsend	Peripheres Blut eines 61-jährigen Patienten
U-266	Multiples Myelom	Suspensionszellen, gruppiert und einzeln wachsend, rund bis polygonal	Peripheres Blut eines 53-jährigen Patienten

Tabelle 6 – Zusammensetzung des Zellmediums RPMI-1640

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Herkunft
RPMI-1640	2000mg/l Dextrose		
Zusätze	1mg/l Gluthation 5mg/l Phenolrot Aminosäuren Vitamine Anorganische Salze 10% hitzeinaktiviertes FBS 1% Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Materialien zu den Proliferationsassays

Tabelle 7 - SMAC Mimetics

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller	Herkunft
Birinapant	cIAP- und XIAP-Inhibitor		
BV6	cIAP- und XIAP-Inhibitor	Selleckchem	München, Deutschland
LCL161	cIAP- und XIAP-Inhibitor		

Tabelle 8 - Zytostatika

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
Docetaxel	Hexal	Holzkirchen, Deutschland
Paclitaxel	Accord Healthcare	München, Deutschland

Tabelle 9 - Proliferationsassays – weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
Absorbance microplate reader: infiniteF50	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Magellan (Software)	Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Pierce™ 96-Well Polystyrene Plates	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
WST-1	F. Hoffmann-La Roche	Basel, Schweiz

3.1.3 Materialien zum Western Blot

Tabelle 10 - verwendete Antikörper

Bezeichnung	Ziel	Wirt	Hersteller	Herkunft	
Primärantikörper	anti-cIAP1	humanes cIAP1	Hase		
	anti-cIAP2	humanes cIAP2	Hase		
	anti-XIAP	humanes XIAP	Hase	Cell Signaling Technology	Cambridge, Vereinigtes Königreich
	anti- α -Tubulin-Mouse	Humanes α -Tubulin	Huhn		
Sekundärantikörper	anti-Rabbit	Antikörper des Hasen	Ziege	Cell Signaling Technology	Cambridge, Vereinigtes Königreich
	anti-Mouse	Antikörper der Maus	Pferd		

Tabelle 11 - Western Blot – Gele und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trenngel	4,4ml Acrylamid
	2,75ml Trenngelpuffer
	3,9ml H ₂ O
	187 μ l Ammoniumperoxodisulfat (10%)
Sammelgel	15,4 μ l Temed
	1,4ml Acrylamid
	1,75ml Sammelgelpuffer
	3,8ml H ₂ O
	84 μ l Ammoniumperoxodisulfat (10%)
Trenngelpuffer	7 μ l Temed
	90,755g Tris (1,5M)
	2,162g Natriumlaurylsulfat (0,015M) HCl (pH-Wert: 8,8)
Sammelgelpuffer	500ml destilliertes H ₂ O
	30,285g Tris (0,5M)
	2,162g Natriumlaurylsulfat (0,015M) HCl (pH-Wert: 6,8)
Blot-Puffer	500ml destilliertes H ₂ O
	100ml 10 x Western-Puffer
	700ml destilliertes H ₂ O
	200ml Methanol
Lauf-Puffer	1,5ml Natriumlaurylsulfat (20%)
	100ml 10x Western-Puffer
	900ml H ₂ O
	5ml Natriumlaurylsulfat (20%)

Tabelle 12 - Western Blot – weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Chalfont St Giles Vereinigtes Königreich
Amersham Protran 0.2 NC	GE Healthcare	Chalfont St Giles Vereinigtes Königreich
Amplify Fluorographic Reagent	GE Healthcare	Chalfont St Giles Vereinigtes Königreich
Blotting-System PEQPower 250	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Blue Loading Buffer Pack	New England BioLabs	Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
Chemiluminescent Western Blot Detection	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
ColorPlus Prestained Protein Ladder	New England BioLabs	Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
DPBS	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Elektroblotter + Zubehör	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR	CAWO Photochemische Fabrik	Schrobenhausen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Free Stripping-Puffer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
TBS-Puffer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Temed	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tween®	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator Branson™ Ultrasonics SLPe Digital Sonifier Cell Disruptor	Emerson Technologies	Dietzenbach, Deutschland
Universal-Blottingpapier	A.Hartenstein	Würzburg, Deutschland

3.1.4 Diverse Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 13 - weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
AccuJet®Pro Pipettierhelfer Cell Scraper	Brand SPL Life Sciences	Wertheim, Deutschland Pocheon-si, Südkorea
Cellstar®Pipette	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Cellstar®Tubes	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Culture Microscope CK40	Olympus	Tokio, Japan
Eppendorf T.I.P.S. ®	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
HeraCell CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Mehrkanalpipette Eppendorf Reference® 2	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
MiniRocker Shaker MR-1	A.Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Nunc™ zellkulturbehandelte Kolben mit Vent/- Closeverschlusskappen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Präzisionswaage Kern KB	KERN	Frankfurt am Main, Deutschland
Rocking Platform Shaker	VWR International	Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Tabellenkalkulationssoftware Excel (Version 15.0.4927.1000)	Microsoft	Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Universal 320R	Hettich	Kirchlengern, Deutschland
Wasserbad Julabo 5	Julabo	Seelbach, Deutschland
Zellzähler CASY® Model TT	Omni Life Science	Bremen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Zur Durchführung der Forschungsarbeit wurden 10 humane Zelllinien in die Versuchsreihen aufgenommen; eine Auflistung der Zellen ist Tabelle 7 zu entnehmen. Um eine erfolgreiche Vermehrung bei einer Zellzahl von maximal 1×10^6 Zellen pro Milliliter zu gewährleisten, wurde ein Teil des Nährmediums in regelmäßigen Abständen von 2-3 Tagen erneuert. Hierzu wurden an den Flaschenboden und Flaschenwänden festgesetzte Zellen mit Hilfe von einem Zellschaber gelöst und anschließend die Suspension im Verhältnis 1:5 durch frisches Medium ersetzt. Vorher wurde die Zellzahl sowohl über ein Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauerkammer als auch durch Auszählen mit Hilfe eines Teilchenzählers bestimmt. Bei der Zelllinie INA-6 wurde dem Medium zusätzlich Interleukin-6 (2ng/ml) hinzugefügt. (64) Die Kultivierung der Zellen fand in einem CO₂-Inkubator bei konstanten 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% statt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um einen Vergleich zwischen den durchgeführten Versuchsreihen zu ermöglichen, wurde die Zellzahl vor Versuchsbeginn mit einem Zellzähler bestimmt. Die elektronische Messung beruht hierbei auf der Erfassung von einem Signal, welches vitale Zellen mit intakter Membran beim Durchtritt durch eine Messpore und somit einer Unterbrechung eines elektrischen Feldes auslösen. (65)

Vorbereitend für die Messung ist das Pipettieren von 100µl Zellsuspension auf 10ml isotonischer Lösung, wobei sowohl beim Abnehmen der Zellen, als auch unmittelbar vor dem Messvorgang auf eine ausreichende Durchmischung der zu messenden Flüssigkeit geachtet werden muss. Der angegebene Messwert entspricht der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

3.2.3 Proliferationsassays

Alle Proliferationsassays wurden auf einer 96er-Well Platte mit einer Inkubationszeit von 96h und einer Zellzahl von 20.000 Zellen/Well durchgeführt. Des Weiteren wurde in jedem Assay eine logarithmische Verdünnungsreihe des jeweils zu analysierenden Wirkstoffes pipettiert. Ebenso fand eine identische Auswertung, basierend auf dem Prinzip der Spektralphotometrie, mittels WST-1 statt.

3.2.3.1 Proliferationsassays mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161

Zur Veranschaulichung des Aufbaus der Proliferationsassays dient das Pipettierschema in Tabelle 14; die inneren Wells der 96-Well-Platte sind aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt.

Tabelle 14 – Pipettierschema einer 96er-Wellplatte, M=Medium RPMI-1640 (100µl), K=Kontrollgruppe aus Medium (50µl) + MM-Zellen (20.000 in 50µl Medium), IC100= 200µM SMAC Mimetic (50µl) + MM-Zellen (20.000 in 50µl Medium), log. Verdünnungsreihe entsprechend Fließtext, innere Wells sind nicht dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	IC ₁₀₀
B	M	Logarithmische Verdünnungsreihe bestehend aus MM-Zellen, Zellmedium und SMAC Mimetic in abnehmender Konzentration von links nach rechts									K	IC ₁₀₀
C	M										K	IC ₁₀₀
D	M										K	M
E	M										K	M
F	M										K	M
G	M										K	M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Der äußere Kranz, ausgenommen Spalte 12 (A, B und C) der 96er-Well Platte wurde pro Well mit jeweils 100µl RPMI-1640 befüllt. In die leeren Wells in Spalte 2 wurden 100µl/Well und in Spalte 12 (A, B, C) 50µl/Well einer zuvor vorbereiteten Lösung, bestehend aus dem entsprechenden SMAC Mimetics (Birinapant, BV6 oder LCL161) mit

Zellmedium auf eine Konzentration von 200 μ M verdünnt, pipettiert. Alle weiteren freien Wells der Platte wurden mit jeweils 50 μ l Medium befüllt.

Anschließend wurde mit Hilfe einer Mehrkanalpipette eine log₂-Verdünnungsreihe erstellt, indem 50 μ l aus den Wells in Spalte 2 und Zeile B-G, die mit einem SMAC Mimetic bestückt waren, aufgenommen und in das nächstfolgende Well (z.B. von B2 in B3) gegeben, dort dreimal rauf und runter pipettiert und erneut 50 μ l in das nächstfolgende Well (z.B. von B3 in B4) mit anschließender Verdünnung pipettiert wurden. Dies wurde bis in Spalte 10 fortgeführt und anschließend jene 50 μ l, die sich in der Pipettenspitze befanden, verworfen, wodurch in Spalte 11 nur Medium als Kontrolle war, sodass, absteigend von Spalte 2 nach Spalte 11 nach Zugabe der Zellsuspension die Endkonzentrationen an SMAC Mimetics von 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, ~3,13 μ M, ~1,56 μ M, ~0,78 μ M, ~0,39 μ M und 0 μ M erzielt wurden.

Anschließend wurde die 96er-Well Platte bis auf den äußeren Kranz mit jeweils 50 μ l Zellsuspension á 20.000 Zellen pro Well bestückt und für 96h in einem Brutschrank inkubiert. Die Spalte 12 (Zeilen A-C) wurde mit Zellen bestückt, da sie als Kontrollwert für die IC₁₀₀, bestehend aus 50 μ l des jeweiligen SMAC Mimetic in einer Konzentration von 200 μ M und 50 μ l der Zellen in Zellmedium, diente.

3.2.3.2 Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

Die Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel wurden analog zu den Proliferationsassays mit den SMAC Mimetics ausgeführt.

3.2.3.3 Proliferationsassays kombiniert mit SMAC Mimetics und Zytostatika

Der Unterschied zu den davor beschriebenen Proliferationsassays besteht darin, dass jeweils eines der drei SMAC Mimetics in einer konstanten Konzentration vorgelegt wurde und anschließend mit einem der beiden Zytostatika als Verdünnungsreihe kombiniert wurde. Bei den Konzentrationen der SMAC Mimetics handelt es sich um einen Wert, welcher dem IC₁₀-Wert, bei dem 90% der Zellen vital sind, angenähert ist. Für die Zelllinien, welche in der Monotherapie mit einem Abfall der Zellzahl reagierten,

wurde die IC₁₀ graphisch aus den Diagrammen der „Proliferationsassays mit SMAC Mimetics“ ermittelt.

Für alle Zelllinien, auch für diejenigen (wie z. B. OPM-2), die in den Monotherapien mit keinem Abfall der Gesamtzellzahl reagierten, wurde für das jeweilige SMAC Mimetic die gleiche Konzentration verwendet, welche Tabelle 15 entnommen werden kann:

Tabelle 15 – Konzentrationen der SMAC Mimetics in den Kombinationsversuchen

Beschreibung	Konzentration in µM
Birinapant	8µM
BV6	10µM
LCL161	20µM

Erneut wurde der äußere Kranz der 96er-Well Platte mit 100µl Medium befüllt, lediglich Spalte 12 B-G wurde ausgespart. In diese wurde zum einen ein Kontrollwert (12B-12D) bestehend aus 50µl Medium und 50µl Zellen á 20.000 Zellen pro Well und zum anderen der IC₁₀₀-Wert (12E-12G) aus 50µl Birinapant, BV6 oder LCL161 in einer Konzentration von 200µM, entspricht einer Endkonzentration von 100µM, und 50µl Zellen à 20.000 Zellen pro Well gegeben.

Die freien Felder in Spalte 2 wurden mit einer Lösung aus 100µl Medium, Docetaxel oder Paclitaxel in jeweils 200µM und einem SMAC Mimetic, abhängig davon, welches in konstanter Konzentration vorgelegt wurde, gefüllt. Die Konzentration des SMAC Mimetics entsprach dem doppelten, oben erwähnten Wert (siehe Tabelle 15).

In die noch leeren Wells in Spalte 3 – 11 wurden 50µl Medium mit dem jeweiligen SMAC Mimetic in der doppelten Konzentration des Wertes aus Tabelle 15 pipettiert und anschließend eine Verdünnungsreihe analog zu den Proliferationsassays zuvor durchgeführt, sodass die Endkonzentration der SMAC Mimetics konstant bei den in Tabelle 15 angegebenen Werten liegt und die der Zytostatika entsprechend von 100µM beginnend verdünnt wird.

Darauffolgend wurden von Spalte 2 – 12 (den äußeren Kranz ausgenommen) pro Well 20.000 Zellen in 50µl Medium ausgesät und für 96h in einem Brutschrank inkubiert.

3.2.3d Auswertung der Proliferationsassays mit WST-1

Das Grundprinzip des Proliferationsassays mit WST-1 („water soluble tetrazolium“) beruht darauf, dass das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz über eine Superoxiddismutase, die bei nicht vitalen Zellen funktionsunfähig ist, in das dunkelrote Formazan umgesetzt wird (siehe Abbildung 2). Dieser Farbumschlag kann mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen und als relative Anzahl an vitalen Zellen interpretiert werden. (66,67)

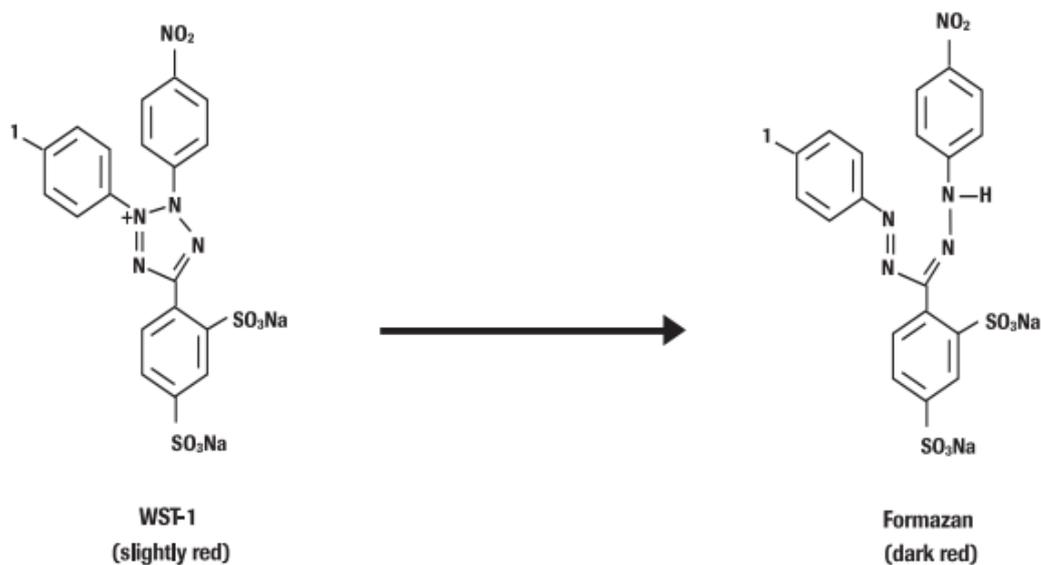


Abbildung 2 - Funktion Superoxiddismutase modifizierte Abbildung (unter Berücksichtigung des §60c des Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetzes) (68)

In jedes mit Zellen bestückte Well wurden 20µl einer Lösung bestehend aus 10µl Medium und 10µl WST-1 pipettiert, um in jedem Well ein Verhältnis von ca. einem Teil WST-1 zu zehn Teilen Zellsuspension zu erzielen. Als Kontrolle diente Medium plus WST-1. Nach exakt 3h wurde der Farbumschlag mit einem Spektralphotometer gemessen und über eine Software ausgewertet.

3.2.4 Western Blot

3.2.4.1 Vorbereitung der Zellproben als Gesamtzellysat

Für den Proteinnachweis per Western Blot wurden 20 Millionen Zellen in 8ml RPMI-1640 Zellkulturmedium auf 4 Wells einer 6-Well Platte zu jeweils 2ml Zellsuspension à 5 Millionen Zellen aufgeteilt und jeweils mit Birinapant, BV6 oder LCL161 in einer Konzentration von 100µM für 24h in einem Brutschrank inkubiert. Eine Probe blieb als Kontrollgruppe ohne jegliche Zusätze.

Im Anschluss wurden die Zellen in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, bei 13.200 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen. Nachfolgend in 1 ml DPBS resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, erneut bei 13.200 rpm für die Dauer von 1 Minute zentrifugiert und wiederholt der Überstand abgesaugt.

Auf das Zellpellet wurden sodann 110µl Proteinprobenpuffer pipettiert, an einem Ultraschall-Homogenisator aufbereitet, bei 95° Celsius in einem Wasserbad für 2min erhitzt und für 5min bei 13.200 rpm erneut zentrifugiert. Die Lysate konnten dann bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.4.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinlysate der einzelnen Proben wurden über die analytische Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als SDS-PAGE, einer Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, nach ihrer Masse aufgetrennt. Hierzu wurden Trenngele zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, mit Isopropanol, welches nach dem Aushärten des Polyacrylamidgels abgeschüttet wurde, überschichtet und anschließend ein Sammelgel aufgetragen, in das der Kamm für die späteren Taschen eingebracht wurde.

Die Elektrophorese-Apparatur wurde mit Laufpuffer befüllt und die erste Tasche eines jeden Gels mit einem Proteinmarker, die weiteren Taschen mit den verschiedenen Zellproben beladen. Die Durchlaufzeit der Gelelektrophorese betrug 45 min bei 0,035 Ampere pro Gel und 250 Volt.

3.2.4.3 Western Blot

Im anschließenden Schritt, dem namensgebenden Western Blot, werden die Gele mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose übertragen.

Hierzu wurden zwei Lagen Blottingpapier, gefolgt von einer Nitrocellulose-Membran in ein Semi-Dry Blotter geschichtet, darauf das Polyacrylamidgel gelegt und mit zwei weiteren Blottingpapieren bedeckt. Sowohl die Blottingpapiere, als auch die Nitrocellulose-Membran wurden zuvor in Blot-Puffer getränkt.

Der Transfer fand bei 250 Volt und $10\text{mA}/\text{cm}^2$ für eine Stunde und 30 Minuten statt. Um nach dem Western Blot eine Bindung von weiteren Proteinen auf der Trägermembran zu blocken, wurde jede Nitrocellulose-Membran für eine Stunde in einer TBS-Lösung mit 5 % Milchpulver geschwenkt und im Anschluss mit den Primärantikörpern versehen. Hierzu wurden, nach Waschen in TBS, die gerollten Membranen in 50ml Flacons überführt und eine Lösung aus 10ml TBS und $10\mu\text{l}$ des entsprechenden Primärantikörpers anti-cIAP1, anti-cIAP2 oder anti-XIAP hinzu pipettiert. Die Falcons mit den Primärantikörpern wurden über Nacht auf einem Roll-Schüttler bei 4 Grad Celsius geschwenkt, anschließend gewaschen und die Membranen mit jeweils 10ml TBS und $2,5\mu\text{l}$ des Sekundärantikörpers anti-Rabbit auf einem Rüttler für 60 Minuten inkubiert. Vor der Auswertung per Chemolumineszenz fanden drei weitere Waschungen à 15 Minuten mit TBS statt. Die zu entwickelnden Membranen wurden für 1 Minute in der Chemolumineszenzflüssigkeit geschwenkt, auf einer Folie positioniert und anschließend in einer Dunkelkammer zusammen mit einem Film in eine Kassette eingelegt und bis zu 24 Stunden belichtet und anschließend in einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

3.2.4.4 Stripping

Zur Bestimmung des Proteinauftrags wurden die einzelnen Proben über den Standard Tubulin quantifiziert. Die Nitrocellulose-Membranen wurden dazu jeweils gestrippt und in ein Gefäß mit Stripping-Puffer überführt und für 30 Minuten inkubiert, anschließend 2 Mal mit TBS für je 20 Minuten gewaschen und für 1 Stunde in Milch gelegt.

Anschließend wurden zu jeder Membran 10ml TBS und 2,5µl anti-Tubulin-Antikörper hinzugefügt und für 24 Stunden auf einem Plattformschüttler belassen.

Daraufhin wurden die Membranen in jeweils 10 ml TBS und 1 µl anti-Mouse-IgG-Antikörper für 1 Stunde gelegt und im Anschluss drei Mal für jeweils 20 Minuten mit TBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls per Chemolumineszenz.

3.2.5 Mikroskopische Aufnahmen

Um die Auswirkungen des SMAC Mimetics BV6 auf die Multiplen Myelom Zelllinien aufzuzeigen, wurden für jede Zelllinie 2 Proben, bestehend zum einen aus 2ml Zellsuspension und zum anderen aus 2ml Zellsuspension mit zusätzlich BV6 in einer Konzentration von 100µM, welches 32 Stunden zuvor hinzugegeben wurde, erstellt. Die Proben wurden für den genannten Zeitraum in einem Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss wurden von jeder Probe aus einem zufällig gewählten Abschnitt Aufnahmen mit einer zu dem Mikroskop zugehörigen Software aufgenommen und digital gespeichert.

3.2.6 Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse der Proliferationsassays, welche per Spektralphotometrie und zugehöriger Software ausgewertet wurden, wurde eine Tabellenkalkulationssoftware verwendet.

Nach dem Übertragen der Daten konnte mit Hilfe des Diagrammtools ein Graph erstellt werden, welcher auf der y-Achse die relative Zellzahl in Prozent und auf der x-Achse die Konzentration der verwendeten Substanz wiedergibt. Die relative Zellzahl wurde aus dem Mittelwert der drei bzw. zwei Versuchsreihen geteilt durch den Mittelwert der Kontrolle errechnet, die Konzentration entsprechend der logarithmischen Verdünnungsreihe zu dem jeweiligen Messpunkt hinzugefügt.

Für jeden Messpunkt wurde in der Software die Standardabweichung eingefügt, welche das Programm aus den Daten für den Mittelwert der verwendeten Versuchsreihen

berechnete; die Beschriftungen und die Legende wurden in derselben Software erstellt. Abschließend wurde in dem Graphen für jede Zelllinie ein repräsentativer Versuch mit Wirkungskurve gezeichnet, welche die Reduktion der relativen Zellzahl der jeweiligen Substanz oder Kombination aus Substanzen wiedergibt.

4. Ergebnisse

4.1 Proliferationsassays

4.1.1 Proliferationsassays mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161

Um den Einfluss der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 auf die Multiplen Myelom Zellen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays durchgeführt, aus deren graphischer Darstellung die IC₅₀ ermittelt werden konnte. Der Versuchsaufbau war für alle Versuche identisch: Die jeweiligen MM-Zelllinien wurden mit einer Verdünnungsreihe (log₂) des entsprechenden SMAC Mimetic, beginnend bei einer Konzentration von 100µM für 96 Stunden inkubiert. Ziel dieser Versuchsreihe war es zum einen die Wirkung der einzelnen SMAC Mimetics und zum anderen einen Vergleich zwischen den einzelnen SMAC Mimetics anhand der IC₅₀ zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Proliferationsassays sind in Abbildung 3 als Dosenwirkungsdiagramme dargestellt, wobei pro Zelllinie ein Diagramm mit den 3 SMAC Mimetics (Birinapant, BV6 und LCL161) erstellt wurde.

Die y-Achse gibt hierbei die relative Zellzahl an vitalen Zellen in Prozent wieder, die x-Achse die verwendete Konzentration des entsprechenden SMAC Mimetics in µM. Aus dem resultierenden Diagramm wurden anschließend die IC₅₀ Werte bestimmt, also die Konzentration bei der der Wirkstoff 50% seiner biologischen Aktivität erreicht.

Während BV6 bei nahezu allen Zelllinien, ausgenommen INA6 und OPM-2, eine Reduktion der relativen Zellzahl auf mindestens unter 40% der Gesamtzellzahl auslöste, fiel die Reaktion bei den zwei weiteren SMAC Mimetics unterschiedlich aus: bei 7 von 10 Zelllinien löste Birinapant kaum eine Veränderung der Zellzahl aus; LCL161 erreichte bei den Zelllinien, mit Ausnahme von L363 und OPM-2, eine Reduktion der Zellzahl von unter 80% der Gesamtzellzahl. Lediglich die Zelllinien AMO-1 und MM.1S zeigen bei allen drei SMAC Mimetics eine ähnliche Reaktion mit einem Abfall der relativen Zellzahl auf mindestens unter 60% der Gesamtzellzahl.

Die IC₅₀-Werte sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Werte zeigen die wesentlich bessere Wirksamkeit von BV6 gegenüber den anderen beiden SMAC Mimetics. Die IC₅₀ wird bei BV6 im Durchschnitt bei einer Konzentration von ca. 25,3 µM erreicht (ausgenommen sind die Zelllinien, bei denen die IC₅₀ nicht erreicht wurde). Im Gegensatz hierzu stehen Birinapant und LCL161, die sich in Bezug auf die IC₅₀ als kaum wirksam

darstellen, da sie lediglich bei zwei Zelllinien überhaupt einen deutlichen Effekt zeigen. Somit resultiert aus dieser Versuchsreihe zum einen das Ergebnis, dass BV6 den größten Einfluss auf die Multiplen Myelom Zelllinien hat und zum anderen, dass Birinapant und LCL161 in der Monotherapie als eher unwirksam in Bezug auf die direkte Reduktion der relativen Zellzahl in der Monotherapie angesehen werden müssen.

Tabelle 16 - IC50 Werte der drei SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161. Dargestellt ist die IC50 in μM der 3 SMAC Mimetics für die 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe des Softwareprogrammes Excel. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Zelllinie	IC₅₀ [μM] der SMAC Mimetics		
	Birinapant	BV6	LCL161
AMO-1	11	15,5	50
INA6	-	12,5	-
JJN-3	-	22	-
KMS-11	-	25	-
KMS-12-BM	-	25	-
L-363	-	50	-
MM.1S	50	15,5	15,5
OPM-2	-	-	-
RPMI-8226	-	31,3	-
U-266	-	31,3	-

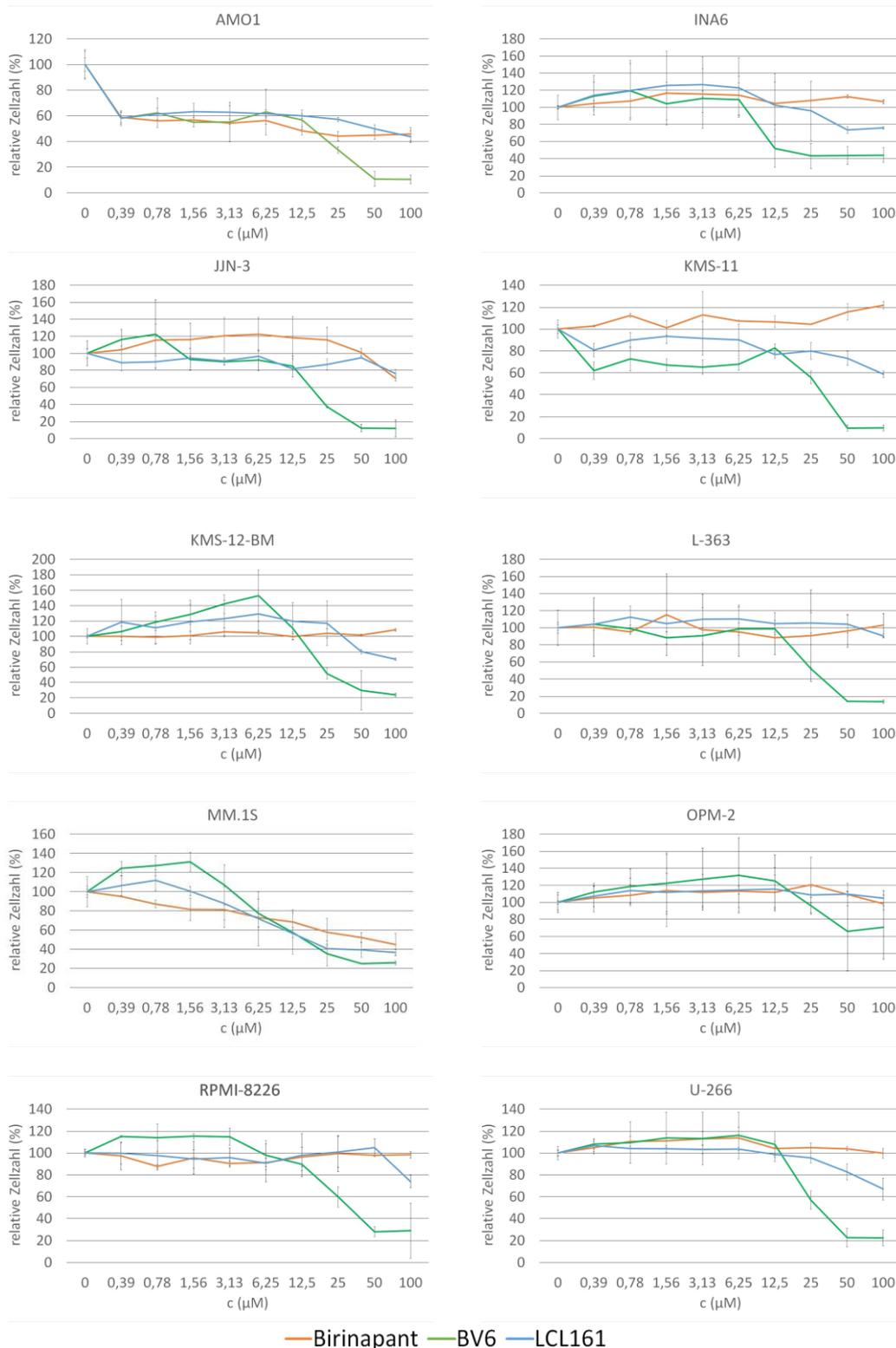


Abbildung 3 – Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der jeweiligen SMAC Mimetics nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien im Proliferationsassay. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm für die 3 SMAC Mimetics: orange für die Monotherapie mit Birinapant, grün für BV6 und hellblau für LCL161. Die x-Achse gibt die Konzentration des SMAC Mimetics in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent an. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt.

4.1.2 Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel als Monotherapie und in Kombination mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161

Analog zu der vorhergehenden Versuchsreihe, war es auch bei den Proliferationsassays mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel das Ziel, die zytotoxische Wirkung der Medikamente auf die Zelllinien des Multiplen Myeloms zu bestimmen. Dazu wurde die IC_{50} ermittelt. Die Zelllinien wurden mit einer Verdünnungsreihe (log2) des jeweiligen Zytostatikums für 96 Stunden inkubiert und anschließend mittels WST-1 im Proliferationsassay analysiert

Die Wirkung von Docetaxel und Paclitaxel resultierte in fast allen Fällen mit einem Abfall der relativen Zellzahl auf unter 60%. In den Versuchsreihen konnte keine signifikante Wirkung an den Zelllinien OPM-2 und U-266 nachgewiesen werden.

Der Tabelle 17 kann die IC_{50} für Docetaxel und Paclitaxel für jede einzelne Zelllinie entnommen werden. Die IC_{50} wurde bei Docetaxel im Schnitt bei einer Konzentration von ca. 15,9 μ M und bei Paclitaxel mit ca. 3,6 μ M erreicht. Daraus ergibt sich, dass Paclitaxel im direkten Vergleich der IC_{50} -Werte potenter als Docetaxel eingestuft werden kann, da es schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen wirksam ist.

Setzt man die IC_{50} der SMAC Mimetics dagegen, welche in der vorhergehenden Versuchsreihe ermittelt wurde, so ist die zytotoxische Wirkung der beiden Wirkstoffe Docetaxel und Paclitaxel auf die MM-Zelllinien als größer einzustufen.

Tabelle 17 - IC_{50} Werte der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel. Dargestellt ist die IC_{50} in μ M von Docetaxel und Paclitaxel für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC_{50} konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Zelllinie	IC_{50} [μ M] der Zytostatika	
	Docetaxel	Paclitaxel
AMO-1	43,8	-
INA6	12,5	2,7
JJN-3	12,6	5,4
KMS-11	12,5	5,4
KMS-12-BM	3,9	0,8
L-363	10,9	2,7
MM.1S	15,6	2,7
OPM-2	-	-
RPMI-8226	15,6	5,4
U-266	-	-

Bei den Kombinationstherapien war es das Ziel zu analysieren, ob die Kombination mit einem SMAC Mimetic und jeweils einem Zytostatikum die Wirksamkeit des Zytostatikums durch eine Sensibilisierung der Zelle hinsichtlich der Apoptose im Vergleich zur Monotherapie verstärkt. Grundlegend dafür ist die Annahme, dass die Sensitivierung der Zelle für die Apoptose durch ein SMAC Mimetic in einen synergistischen Effekt in der Kombinationstherapie führen könnte.

Hierzu wurde zunächst das jeweilige Zytostatikum in einer Verdünnungsreihe vorgelegt und anschließend eine Suspension aus Zellen der entsprechenden Zelllinie und jeweils einem SMAC Mimetic in konstanter Konzentration hinzugegeben. Bei der Konzentration handelt es sich um die Annäherung an die IC_{10} , da bei dieser Konzentration die Wirksamkeit des Stoffes nachweisbar ist, die zytotoxische Wirkung im Vergleich zu der sensitivierenden und damit fördernden Wirkung aber im Hintergrund steht. Die IC_{10} der SMAC Mimetics wurde hierbei aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche ermittelt. Für diejenigen Zelllinien (wie z. B. OPM-2), die in den Monotherapien nur geringe oder keine Wirkung in Bezug auf eine Reduktion der Gesamtzellzahl zeigten, wurden die Werte an diejenigen Werte der anderen Zelllinien angepasst. Für alle Zelllinien wurden für das jeweilige SMAC Mimetic dieselben Konzentrationen verwendet, welche in Tabelle 15 aufgeführt sind. Die Auswertung wurde nach 96-stündiger Inkubationszeit durchgeführt.

Pro Zelllinie wurde ein Diagramm (siehe Abbildung 4) erstellt, welches repräsentative Wirkungskurven für die Monotherapien der beiden Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel beinhaltet. Die Beschriftung der y- und x-Achsen sind identisch zu den vorhergehenden Diagrammen.

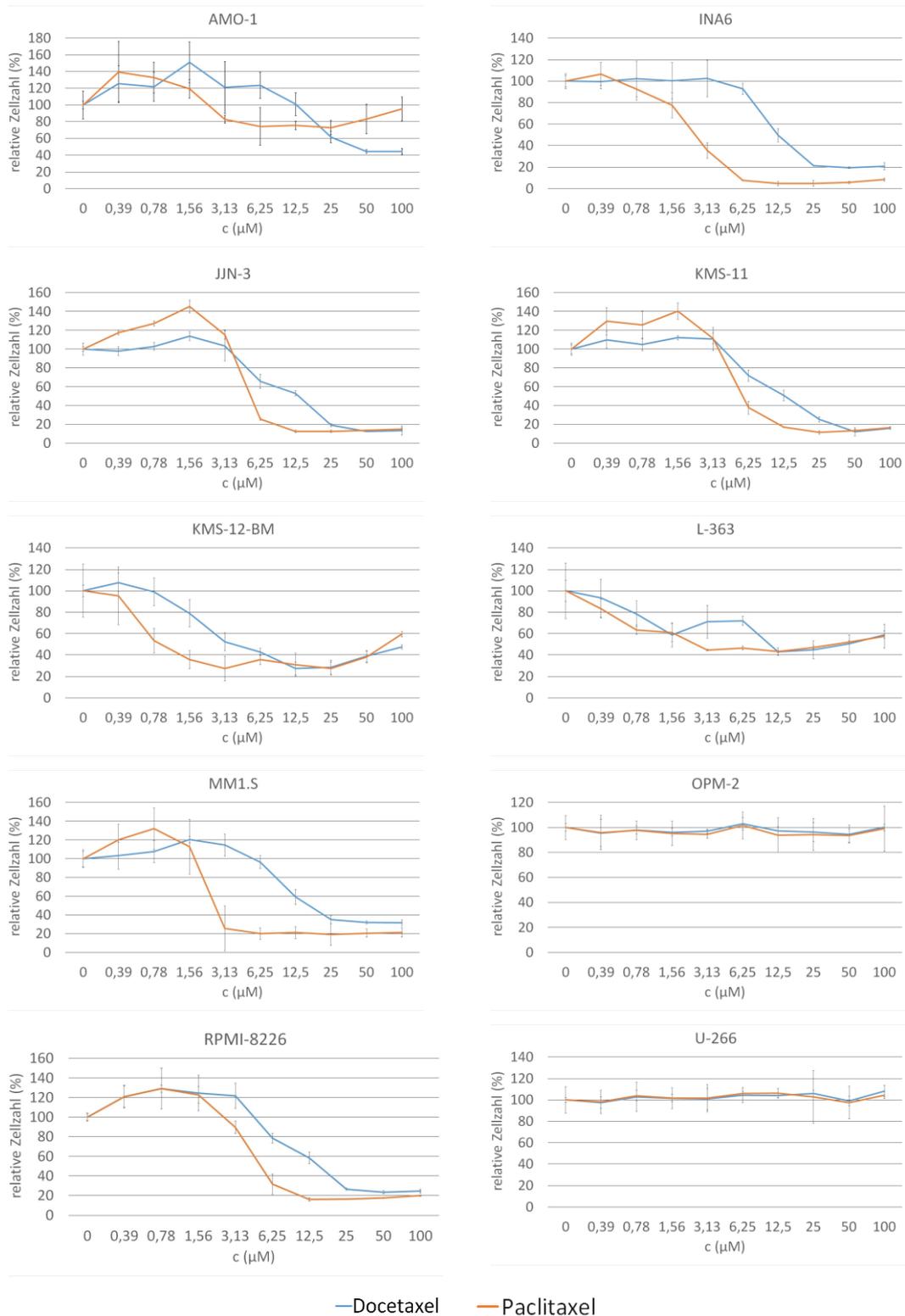


Abbildung 4 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Monotherapien mit Docetaxel und Paclitaxel nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 2 Kurven: hellblau für die Wirkungskurven von Docetaxel und orange für die Wirkungskurven von Paclitaxel. Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt.

4.1.2.1 Proliferationsassays kombiniert mit dem SMAC Mimetic Birinapant und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

Die Kombination des SMAC Mimetics Birinapant mit den Zytostatika resultiert bei allen Zelllinien mit einer Abnahme der relativen Zellzahl auf unter 60% im Verlauf zur höchsten Konzentration hin (siehe Abbildung 5).

Wie Tabelle 18 entnommen werden kann, wird die IC_{50} bei der Kombination Birinapant mit Paclitaxel bei bereits niedrigeren Konzentrationen erreicht. Die IC_{50} liegt hier im Durchschnitt bei einer Konzentration von ca. 8,5 μM für Paclitaxel und bei ca. 19,3 μM für Docetaxel; analog zu den Ergebnissen der Monotherapie der Zytostatika zeigt sich Paclitaxel auch in Kombination mit den SMAC Mimetics als das potentere Mittel in Bezug auf die Reduktion der relativen Zellzahl.

Im Vergleich zu den Monotherapien mit Docetaxel und Paclitaxel zeigen sich lediglich bei den Zelllinien OPM-2 und U-266 eine Erhöhung der Sensitivität: Während sich bei diesen Zelllinien die Monotherapien als unwirksam in Bezug auf die Reduktion der Zellzahl erweisen, zeigt sich bei den Kombinationstherapien ein veränderter Verlauf der Wirkungskurve, welcher eine wesentlich stärkere Reduktion der relativen Zellzahl darstellt.

Die übrigen Zelllinien zeigen im Vergleich zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie keine signifikanten Abweichungen voneinander.

In Abbildung 5 sind die repräsentativen Wirkungskurven für die Kombination aus Birinapant + Docetaxel und Birinapant + Paclitaxel abgebildet. Zum Vergleich sind die Wirkungskurven mit den Kurven aus der Monotherapie der Zytostatika hinterlegt.

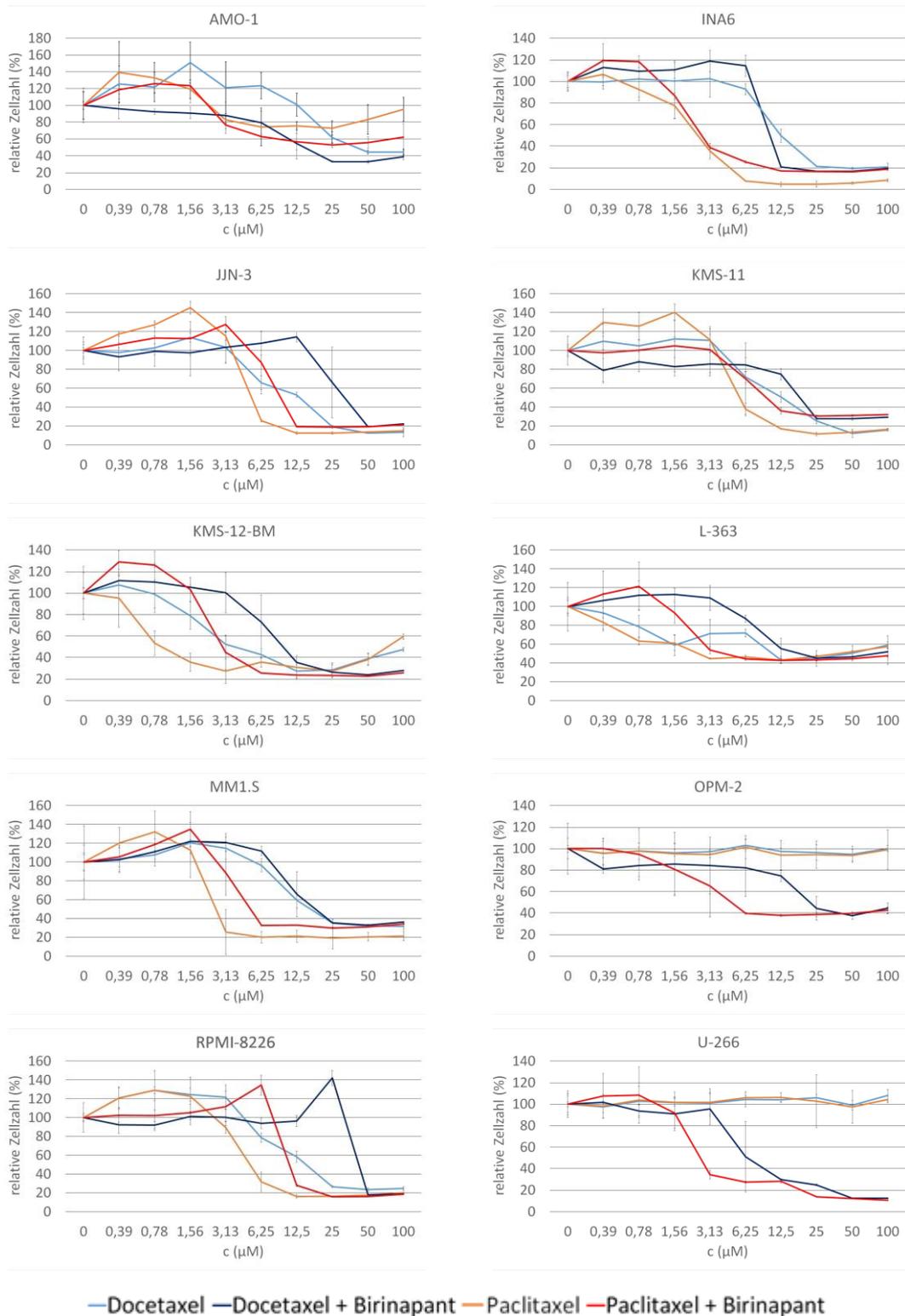


Abbildung 5 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic Birinapant nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + Birinapant, rot für die Kombination Paclitaxel + Birinapant; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt.

Tabelle 18 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit Birinapant und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Dargestellt ist die IC₅₀ in μM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit Birinapant für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Zelllinie	IC ₅₀ [μM] der Kombination Birinapant und Zytostatika	
	Docetaxel + Birinapant	Paclitaxel + Birinapant
AMO-1	15,6	-
INA6	10,9	2,7
JJN-3	31,3	9,4
KMS-11	15,6	9,4
KMS-12-BM	9,4	3,0
L-363	18,8	4,7
MM.1S	18,8	5,4
OPM-2	21,9	4,8
RPMI-8226	43,8	10,9
U-266	6,3	2,4

4.1.2.2 Proliferationsassays kombiniert mit dem SMAC Mimetic BV6 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

Mit Ausnahme der Zelllinien KMS-11 und OPM-2 wird bei der Kombination von BV6 mit Docetaxel und Paclitaxel eine Reduktion der relativen Zellzahl auf unter 60% erreicht. In Tabelle 21 ist die Konzentration zum Erreichen der IC₅₀ gelistet. Bei der Kombination mit Docetaxel wird ähnlich wie in den Monotherapien mit den Zytostatika die IC₅₀ bei einer höheren durchschnittlichen Konzentration von ca. 9,4 μM erreicht im Vergleich zu der Kombinationstherapie mit Paclitaxel, welche im Schnitt bei ca. 3,4 μM liegt.

Bei der Gegenüberstellung der Monotherapien mit den Kombinationstherapien zeigen 7 der 10 Zelllinien einen ähnlichen Verlauf der Wirkungskurven und somit auch keine wesentliche Beeinflussung der Zytostatika-Wirkung durch eine Kombination mit den SMAC Mimetics.

Differenzen treten jedoch bei den Zelllinien AMO-1, KMS-11 und OPM-2 auf: Besonders hervorzuheben ist die Zelllinie KMS-11 in der Kombinationstherapie mit BV6, da sich hier keine Verbesserung der Sensitivität, sondern sogar eine Resistenz zeigt. Bei AMO-1 und OPM-2 zeigt sich eine Verbesserung der Wirksamkeit in Bezug auf die Verminderung der Zellviabilität bei der Verwendung der Kombination von Zytostatika und BV6 im Vergleich zu der Monotherapie: So wurde für AMO-1 die IC₅₀ in der

Kombinationstherapie mit Docetaxel und BV6 um den 4,5-fachen Faktor früher erreicht als in Behandlung mit Docetaxel allein; im Gegensatz zur nicht erreichten IC₅₀ in der Monotherapie mit Paclitaxel, wurde sie in der Kombination mit BV6 bereits bei 3,9µM erreicht. OPM-2 stellte sich für beide Zytostatika als resistent heraus, in der Kombination mit BV6 wurde die IC₅₀ bei 6,3 µM mit Docetaxel und bei 3,1 µM mit Paclitaxel erreicht. In Abbildung 6 sind repräsentativ die Wirkungskurven aus der Kombination BV6 + Docetaxel/Paclitaxel mit den vergleichenden Kurven aus der Monotherapie der Zytostatika dargestellt.

Tabelle 19 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit BV6 und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Für alle 10 Zelllinien ist die IC₅₀ in µM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit dem SMAC Mimetic BV6 aufgezeigt. Die graphische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwareprogrammes „Excel“ erzielt. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Zelllinie	IC ₅₀ [µM] der Kombination BV6 und Zytostatika	
	Docetaxel + BV6	Paclitaxel + BV6
AMO-1	9,4	3,9
INA6	-	1,4
JJN-3	15,6	5,4
KMS-11	-	-
KMS-12-BM	3,1	2,7
L-363	6,3	1,6
MM.1S	9,4	4,7
OPM-2	6,3	3,1
RPMI-8226	15,6	4,7
U-266	-	-

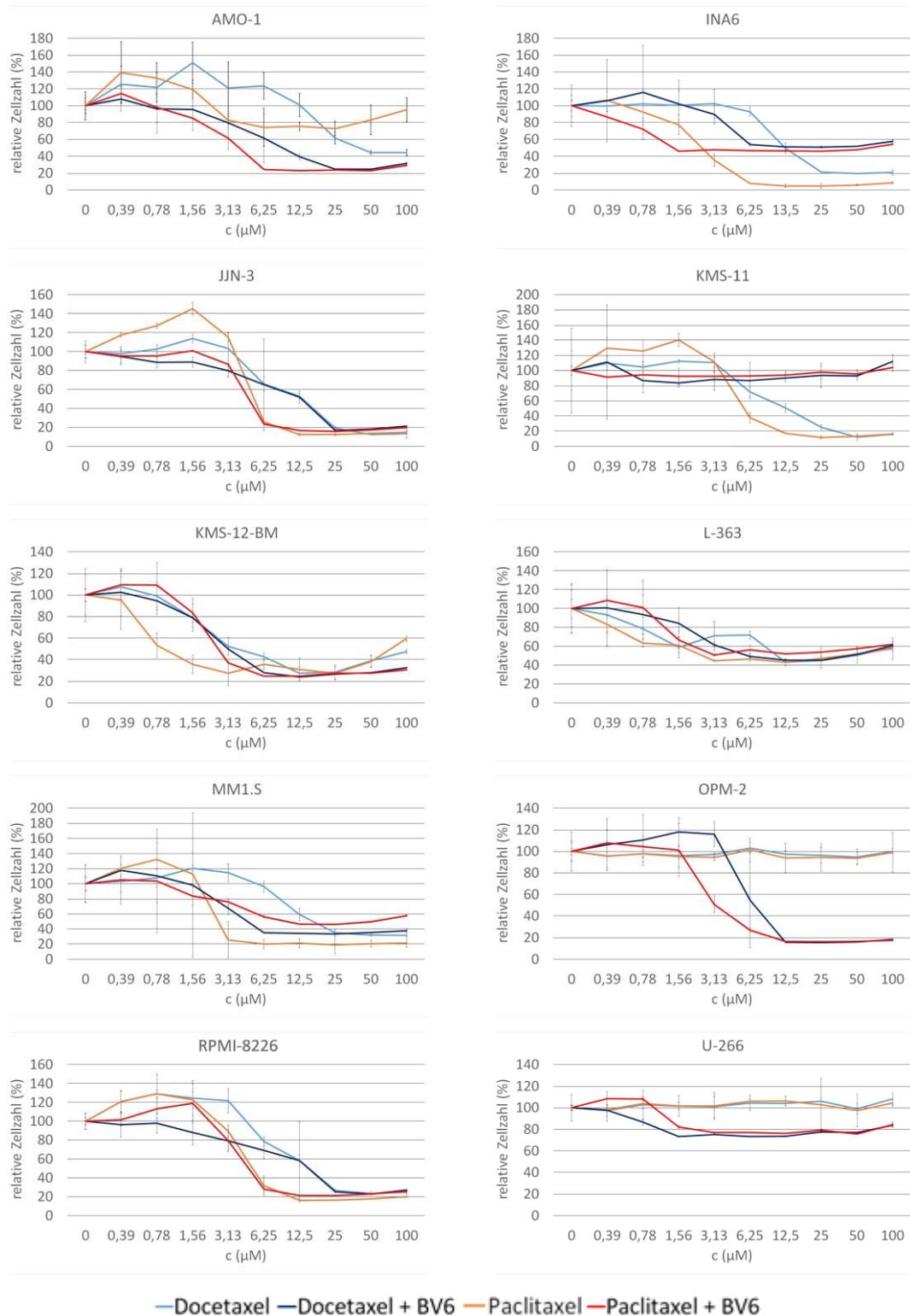


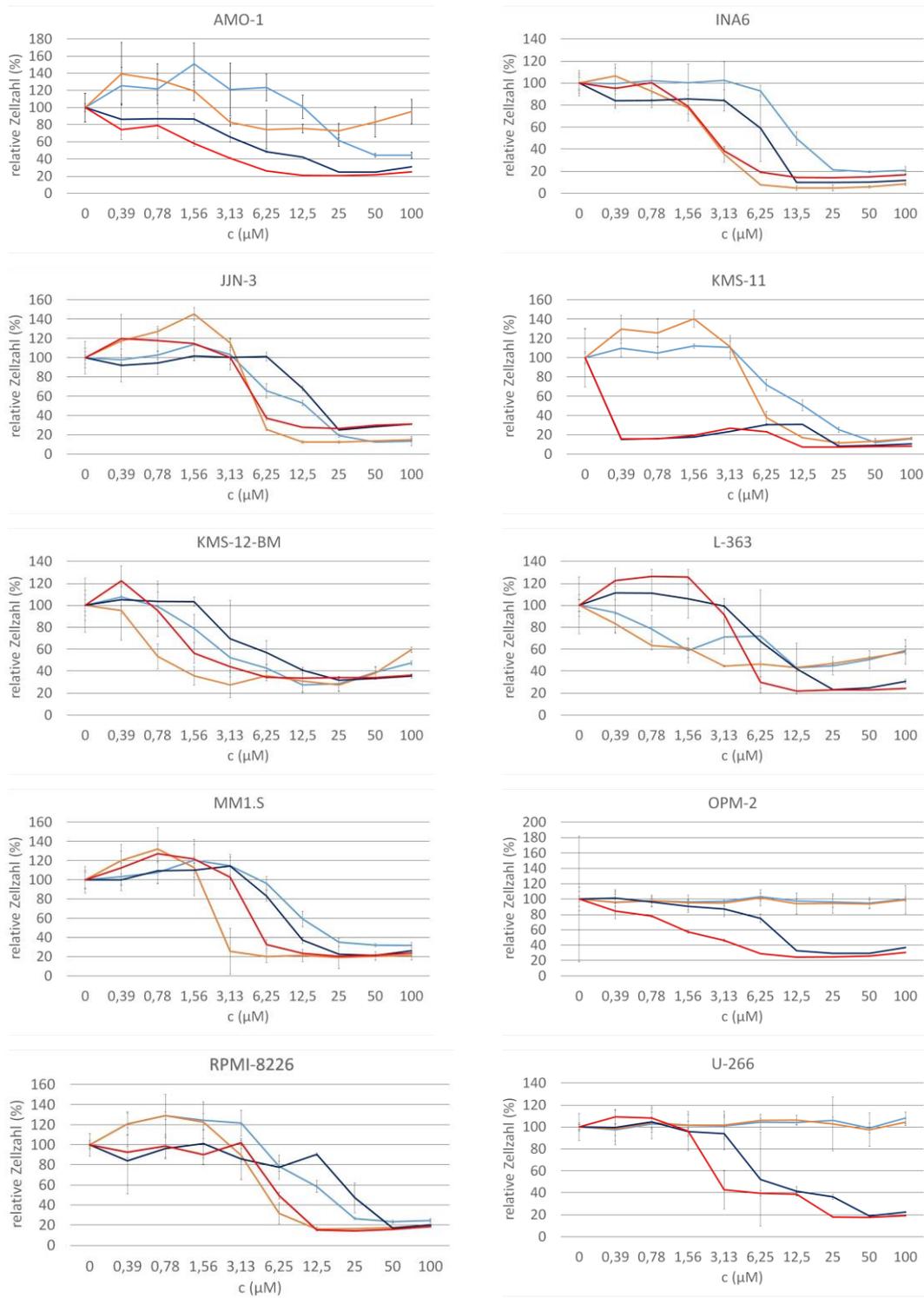
Abbildung 6 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic BV6 nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + BV6, rot für die Kombination Paclitaxel + BV6; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt.

4.1.2.3 Proliferationsassays kombiniert mit den SMAC Mimetic LCL161 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

Die Kombination von LCL161 mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel resultierte bei allen Zelllinien in einer Zellzahlverringerng auf unter 50%. Während bei der Kombination mit Docetaxel im Schnitt zum Erreichen der IC_{50} eine Konzentration von ca. 10,2 μM nötig war, wurde bei Paclitaxel mit LCL161 die IC_{50} bereits bei ca. 4 μM erreicht. Die Werte der IC_{50} können Tabelle 22 entnommen werden.

Bei der Gegenüberstellung der Kombinationstherapie mit der Monotherapie der Zytostatika fällt auf, dass die Ergebnisse von 4 der 10 Zelllinien der Kombinationstherapie (KMS-11, OPM-2 und U-266) von dem Verlauf der Wirkungskurve der Monotherapie abweichen, während die anderen 6 Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchen zeigen.

Sowohl bei der Zelllinie OPM-2, als auch bei U-266 lässt sich im Vergleich zu der Monotherapie mit Zytostatika eine erhöhte Reduktion der Zellzahl erkennen; die Zelllinie KMS-11 erreicht bei beiden Kombinationen mit Docetaxel + LCL161 und Paclitaxel + LCL161 die IC_{50} wesentlich früher, jeweils bei ca. 0,2 μM , welche in der Monotherapie mit Docetaxel erst bei 12,5 μM , bzw. bei 5,4 μM für Paclitaxel erreicht wurde. Ähnliches stellte sich bei der Zelllinie AMO-1 heraus, deren Ansprechen auf eine Kombination von LCL161 und den Zytostatika in einer signifikanten Reduktion der Konzentration zum Erreichen der IC_{50} resultierte. Bei der Kombination Docetaxel + LCL161 wurde die IC_{50} um den Faktor 7 früher erreicht als in der Monotherapie mit Docetaxel, bei der Kombination Paclitaxel + LCL161 bei einer Konzentration von 2,3 μM . Auf eine alleinige Therapie mit Paclitaxel stellte sich AMO-1 als resistent heraus. Die Wirkungskurven der Kombination aus LCL161 + Docetaxel/Paclitaxel und als Vergleich die Wirkungskurven der Monotherapie der Zytostatika können Abbildung 7 entnommen werden.



— Docetaxel — Docetaxel + LCL161 — Paclitaxel — Paclitaxel + LCL161

Abbildung 7 Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic LCL161 nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + LCL161, rot für die Kombination Paclitaxel + LCL161; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in µM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt.

Tabelle 20 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit LCL161 und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Dargestellt ist die IC₅₀ in µM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit LCL161 für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.

Zelllinie	IC₅₀ [µM] der Kombination LCL161 und Zytostatika	
	Docetaxel + LCL161	Paclitaxel + LCL161
AMO-1	6,3	2,3
INA6	7,8	2,7
JJN-3	18,8	5,4
KMS-11	0,2	0,2
KMS-12-BM	9,4	2,3
L-363	10,9	5,4
MM.1S	10,9	5,4
OPM-2	9,4	2,3
RPMI-8226	25	6,3
U-266	2,8	7,8

4.2 Analyse der Expression von cIAP1, cIAP2 und XIAP im Western Blot

Wie in Kapitel „1.2.1 Grundlagen des Wirkungsmechanismus der SMAC Mimetics“ aufgeführt, binden die SMAC Mimetics an IAPs und lösen eine Konformationsänderung aus, die zu einer Degradation oder Inhibition der IAPs führt und somit Zellen für die Apoptose sensitiviert bzw. diese sogar schon einleiten kann. Dazu ist für die Proteine cIAP1 und cIAP2 eine Degradation notwendig, während XIAP in der Regel nur inhibiert, aber nicht degradiert wird (30,54,69). Da die Kombinationstherapien der Wirkstoffe Docetaxel und Paclitaxel mit verschiedenen SMAC Mimetics nur bei einer geringen Anzahl der Zelllinien eine signifikante Wirkung zeigte, wurde die grundlegende Wirksamkeit der SMAC Mimetics im Western Blot analysiert.

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Western Blots der einzelnen Zelllinien aufgezeigt. Das Ziel war es nachzuweisen, ob die Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP, 24 Stunden nachdem zu den Zelllinien die jeweiligen SMAC Mimetics hinzu pipettiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Zelllinien degradiert werden.

Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse (Kontrolle und jeweils die über 24 Stunden mit BV6, LCL161 und Birinapant in einer Konzentration von jeweils 100µM behandelten Gruppen).

Bei allen Zelllinien konnten die IAPs im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr oder nur noch schwach nachgewiesen werden. Anzumerken ist, dass die genannten Proteine in der Zelllinie OPM-2 mittels Western Blot nicht detektiert werden konnten, ebenso konnte das Protein cIAP2 in der Zelllinie KMS-12-BM nicht nachgewiesen werden.

Als Ladekontrolle/Standard wurde Tubulin verwendet. Während in der Kontrolle und in den mit Birinapant und LCL161 behandelten Zellen Tubulin und somit die Degradation von cIAP1 und cIAP2 bei den meisten Zelllinien eindeutig nachgewiesen werden konnte, zeigten die BV6 behandelten Zellen nur eine extrem schwache bis gar keine spezifische Tubulin-Bande. Problematisch war hier die Identifikation des geeigneten Zeitfensters. Western Blot-Analysen zu früheren Zeitpunkten (z.B. 8h, Daten nicht gezeigt), zeigten keine Degradation der analysierten Proteine, während schon zu gering späteren Zeitpunkten sich das gleiche Ergebnis wie nach 24h Inkubation mit BV6 zeigte. Dies erklärt auch die hohe Effizienz von BV6 im Vergleich zu den anderen SMAC Mimetics, da bei BV6 vor allen Dingen der Proteasom-vermittelte Abbau von Proteinen induziert wird. Dass sowohl die Western Blot-Methode, als auch die Degradation der Proteine

cIAP1, cIAP2 und XIAP fehlerfrei funktioniert, konnte eindeutig mit Hilfe der beiden SMAC Mimetics Birinapant und LCL161 gezeigt werden. Somit konnte die Wirkung der SMAC Mimetics auf die IAPs nachgewiesen werden, welche jedoch nicht mit einer erhöhten Aktivität in Bezug auf eine Reduktion der Zellzahl in den Proliferationsassays korreliert.

Zur Unterstützung der Argumentation wurden von ausgewählten Zelllinien mikroskopische Aufnahmen gemacht, die nach 24h Stunden Inkubation mit BV6 in einer Konzentration von 100 μ M aufzeigen, dass sowohl die Zellzahl reduziert als auch die Morphologie in Form der Membranintegrität in Form stark verschrumpelter Zellen vorangeschritten ist; ein morphologischer Hinweis auf Apoptose. Diese Aufnahmen sind in Abbildung 9 dargestellt.

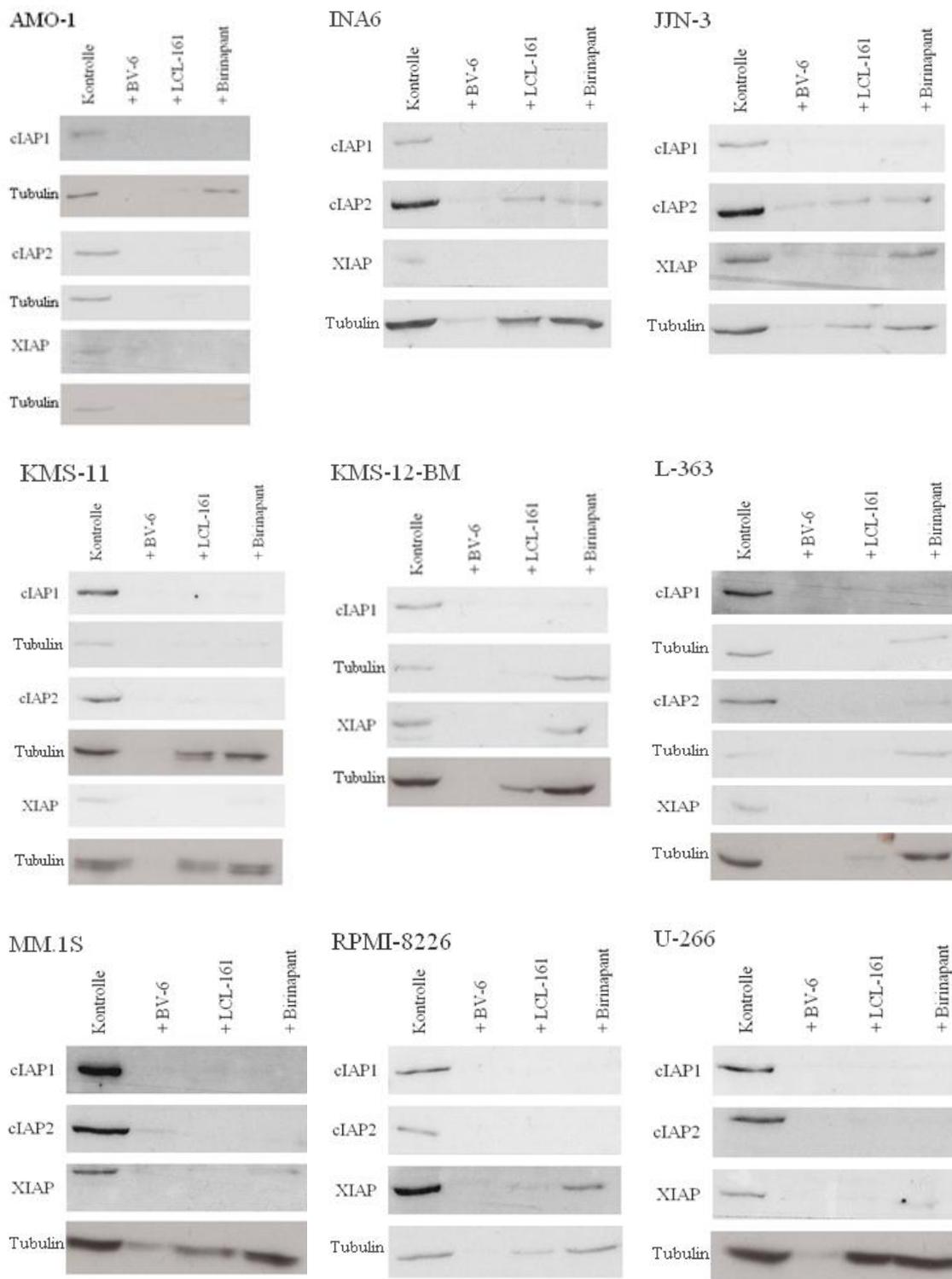
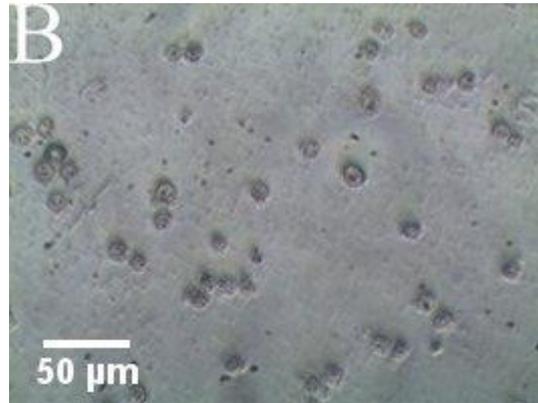
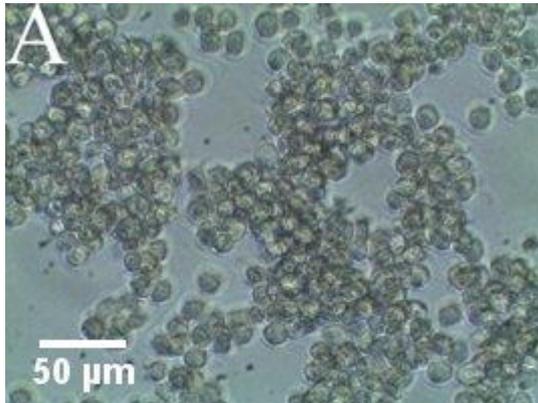
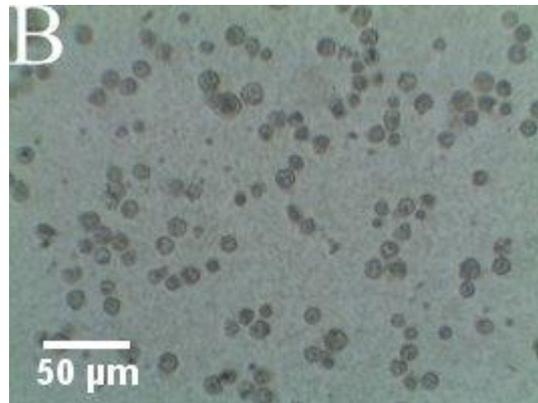
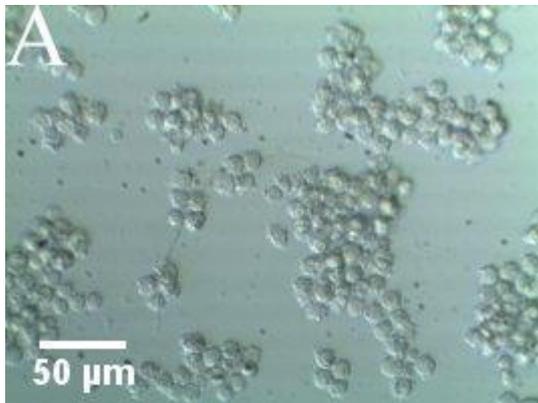


Abbildung 8 – Auflistung der Western Blot- und Tubulinanalyse der Multiplen Myelom Zelllinien. Dargestellt ist für jede Zelllinie der Nachweis der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP, beginnend von links nach rechts mit der unbehandelten Kontrollgruppe und folgend nach 24 stündiger Inkubationszeit mit den SMAC Mimetics BV6, LCL161 und Birinapant. Den Western Blots sind die Tubulin-Analysen angehängt, bei nicht ausreichendem Nachweis aller Proben, wurde für jedes Protein ein separater Tubulin-Nachweis aufgelistet. Bei der Zelllinie OPM-2 konnten keine Proteine nachgewiesen werden, bei der Zelllinie KMS-12-BM lediglich cIAP2 nicht.

AMO-1



JJN-3



KMS-12-BM

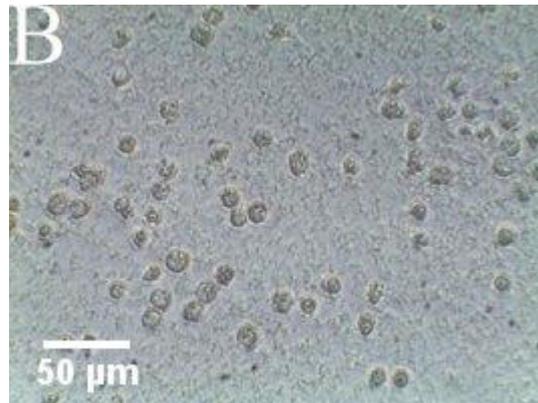
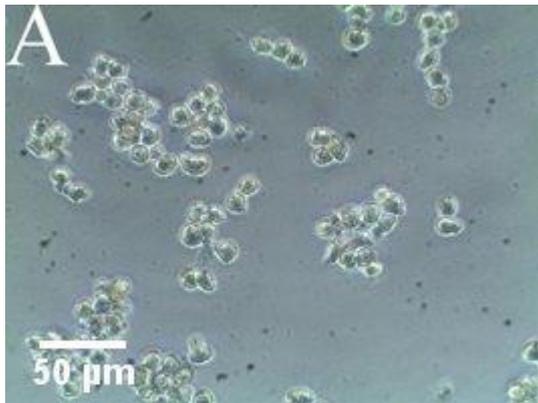


Abbildung 9 - Mikroskopische Darstellung der Zellen nach Behandlung mit BV6; repräsentativ gezeigt am Beispiel der Zelllinien AMO-1, JJN-3 und KMS-12-BM. Visualisiert ist eine Gegenüberstellung einer unbehandelten Zellgruppe (A) mit Zellen, welche 32h mit BV6 in einer Konzentration von 100 µM inkubiert wurden (B). Während die unbehandelten Zellen sich meist gruppiert angeordnet und in hoher Anzahl darstellen, ist bei den hauptsächlich einzeln vorkommenden Zellen, der behandelten Gruppen, eine geringere Zellzahl zu erkennen.

5. Diskussion

Das Multiple Myelom gilt als eine unheilbare Erkrankung des blutbildenden Systems. Einen allgemein neuen Ansatzpunkt in der Krebsforschung stellen die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) dar und damit einhergehend deren synthetisch hergestellten Gegenspieler, die SMAC Mimetics, welche durch die Degradation bzw. Inhibition der IAPs cIAP1, cIAP2 und XIAP Zellen allgemein für Apoptose sensitivieren oder sogar schon allein die Apoptose einleiten können.

Das Ziel dieser experimentellen Doktorarbeit stellte zum einen die Analyse der Wirkung der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161, so wie die der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel auf Zellen des Multiplen Myelom dar und zum anderen, auf welche Weise sich eine Kombination der SMAC Mimetics mit den Zytostatika auf das Überleben der Tumorzellen auswirkt. So wurden über Proliferationsassays Dosis-Wirkungskurven erstellt, aus denen sich die Potenz von Wirkstoffen im Einzelnen, aber auch in Kombination, in Form der IC_{50} ableiten lassen. Erweitert wurde die Studie durch Western Blots, die den Einfluss der SMAC Mimetics auf die Degradation/Inhibition der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP in Zelllinien des Multiplen Myeloms aufzeigen.

5.1 Wertung und Vergleich der Monotherapien der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

BV6 stellte sich in den Proliferationsassays als das potenteste SMAC Mimetic in Bezug auf eine Reduktion der relativen Zellzahl heraus. Jedoch wurden, abhängig von der untersuchten Zelllinie, unterschiedliche Konzentrationen benötigt, um die IC_{50} , welche im Durchschnitt bei einer Konzentration von 25,3 μ M lag, zu erreichen; lediglich die Zelllinie OPM-2 zeigte keine Reaktion auf eine Behandlung mit BV6. Obwohl somit 9 von 10 Zelllinien mit einer Reduktion der relativen Zellzahl auf die Therapie mit BV6 antworteten, muss diese dennoch als eher schwach bewertet werden, da eine signifikante Abnahme der Zellviabilität erst bei sehr hohen Konzentrationen erreicht wurde.

Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit einer Arbeit von El-Mesery *et al.* aus dem Jahr 2016. Die untersuchten Multiplen Myelom Zelllinien (KMS12.BM, L363, MMI.s,

OPM2, RPMI, Amo-1 und KMS.11) reagierten fast ausschließlich nach einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubationszeit mit BV6 (10 μ M) mit einer Abnahme der Zellzahl. Zwar wird hierbei von einer Resistenz der Zelllinien AMO-1 und KMS.11 gesprochen, welche in den eigenen Proliferationsassays jedoch mit einer Reduktion der Zellzahl auf unter 50% reagierten, allerdings erst bei der Verwendung von BV6-Konzentrationen, welche weit über den in der vergleichenden Arbeit von El-Mesery *et al.* verwendeten 10 μ M liegen. Eine Differenz liegt bei der Zelllinie OPM2 vor, welche bei El-Mesery *et al.* bereits bei 10 μ M nur noch ca. 60% vitale Zellen aufweist; der eigene Proliferationsassay ergab eine derartige Wirkung erst bei der ca. 5-fachen Konzentration an BV6. Identische Ergebnisse liegen bei der Analyse der Western Blots vor: so zeigten die bei El-Mesery *et al.* dargestellten Zelllinien (KMS12.BM, KMS.11, RPMI und MMI.s) eine Degradation der IAPs cIAP1 und cIAP2 mit BV6 (10 μ M), lediglich bei der Zelllinie RPMI konnte diese nicht nachgewiesen werden. (70)

Das bivalente SMAC Mimetic Birinapant erreichte in der Monotherapie lediglich bei 2 von 10 Zelllinien die IC_{50} und erscheint somit deutlich weniger potent als BV6. Dennoch konnte in allen Zelllinien eine Degradation der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP beobachtet werden. Nichtsdestotrotz muss von einer Resistenz der Multiplen Myelom Zellen gegenüber dem SMAC Mimetic Birinapant gesprochen werden.

Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Eytan *et al.* gestützt, die zum einen eine hohe Affinität von Birinapant zu einer Anzahl von IAPs wie z.B. cIAP1, cIAP2 und XIAP darstellt und zum anderen auch die Degradation der Proteine cIAP1 und cIAP2 in Zellen beschreibt. Des Weiteren wurde die IC_{50} von 111 Zelllinien unterschiedlicher Tumore bestimmt von denen in der Monotherapie lediglich 18 als sensitiv, d. h. deren IC_{50} mit einer Konzentration an Birinapant unter 1 μ M erreicht wurde, eingestuft werden konnten. Zwar konnte die Sensitivität mit Hilfe von einer Kombination aus Birinapant und TNF oder TRAIL erhöht werden, die Resultate der Monotherapie decken sich jedoch mit denen der eigenen Versuchsreihen, die ebenfalls eine hohe Resistenzrate gegenüber Birinapant aufzeigen. (71)

Als ebenso wirkungslos in Bezug auf eine Reduktion der relativen Zellzahl stellte sich das SMAC Mimetic LCL161 heraus. So wurde, identisch zu den Ergebnissen aus den

Versuchsreihen mit Birinapant, in den durchgeführten Proliferationsassays lediglich bei 2 der 10 Zelllinien bei hohen Konzentrationen die IC_{50} erreicht. Somit kann auch in diesem Fall von einer Resistenz der Zelllinien gegenüber LCL161 gesprochen werden. Die Wirkung des SMAC Mimetics LCL161 wurde ebenso von Ramakrishnan *et al.* in einer Studie untersucht, welche zu dem Ergebnis gelangte, dass sich einige Zelllinien als resistent gegenüber diesem SMAC Mimetic zeigen und somit den Ergebnissen der eigenen Versuchsreihen mit einem schlechten Ansprechverhalten der Multiplen Myelom Zelllinien entspricht. In Experimenten wurde unter anderem die IC_{50} der Zelllinien MM1.S, OPM-2 und U-266 ermittelt, welche ähnliche Resultate ergab, wie die eigenen Untersuchungen: So wurde bei Ramakrishnan *et al.* für die Zelllinie MM1.S die IC_{50} bei einer Konzentration von ca. 15 μ M erreicht, die weiteren Zelllinien erreichten diese erst bei einem Wert von über 30 μ M. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben aufgeführten eigenen Wirkungskurven und spiegeln die Resistenz der Zelllinien gegenüber LCL161 wider. Des Weiteren wird in dieser Studie eine Degradation bzw. Inhibition der Proteine cIAP1 bzw. XIAP bei mit LCL161 (10 μ M) inkubierten Multiplen Myelom Zellen beobachtet, jedoch keine Auswirkung auf den Inhibitor cIAP2, welcher bei den Auswertungen der eigenen Western Blots ebenfalls mit einer Degradation reagierte. Ursächlich kann hierbei die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen sein. (30)

Ein positiver Effekt in der Reduktion der Zellviabilität durch eine Monotherapie mit LCL161 ließ sich auch in anderen Studien nicht nachweisen. So zeigten Brands *et al.* auf, dass ein Erreichen der IC_{50} bei Zellen eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich eine Konzentration an LCL161 von mindestens über 11 μ M voraussetzt. Gleichzeitig konnte jedoch eine signifikantere Reduktion der Zellzahl in einer Kombination mit Fas-Liganden erzielt werden als in den jeweiligen Monotherapien. (72)

Die Behandlung der Multiplen Myelom-Zellen mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel ergab bei den meisten Zelllinien ein gutes Ansprechen auf die verwendeten Substanzen mit einer Reduktion der relativen Zellzahl auf unter 50% bei durchschnittlich 15,9 μ M für Docetaxel und 3,6 μ M für Paclitaxel. Die Zelllinien OPM-2 und U-266 stellten sich in den Proliferationsassays für beide Zytostatika als resistent heraus, die Zelllinie AMO-1 lediglich für Paclitaxel.

In einer Forschungsarbeit von Liu *et al.* wurde ein ähnlicher Effekt von Docetaxel auf die Multiple Myelom-Zelllinie RPMI-8226 nachgewiesen, deren Proliferation durch die Behandlung mit Docetaxel gehemmt und deren Zellzahl durch induzierte Apoptose verringert wurde. (34) Im Gegensatz zu dem guten Ansprechverhalten der Zelllinien *in vitro* steht eine klinische Studie von Friedenberg *et al.* aus dem Jahr 2003 gegenüber, deren Untersuchungen sich mit der Auswirkung von Docetaxel auf Patienten mit einem behandlungsresistenten bzw. rezidivierenden Multiplen Myelom befassten. Das Ergebnis umfasste nicht nur eine Erfolglosigkeit in Bezug auf eine Bekämpfung der Erkrankung, sondern auch eine ausgeprägte Toxizität auf das blutbildende System. (38)

Klinische Studien von Dimopoulos *et al.* und Kortuem *et al.*, die sich der Wirkung von Paclitaxel auf das Multiple Myelom widmeten, ergaben ein Ansprechen des Zytostatikums auf die Erkrankung, allerdings auch auf Kosten einer erhöhten Toxizität und forderten somit weitere Forschungsarbeiten, auch in Kombination mit anderen Substanzen. (36,73) Hassan *et al.* zeigte in Proliferationsassays die Wirkung von Paclitaxel *in vitro* am Beispiel der Zelllinie RPMI-8226 auf, welche in den dargestellten Wirkungskurven mit einer den eigenen Ergebnissen übereinstimmenden Abnahme der relativen Zellzahl reagierte. (74)

Zusammenfassend zeigten die SMAC Mimetics im Vergleich zu den Zytostatika eine eher schwache Wirkung auf die Reduktion der Zellzahl der Multiplen Myelom Zelllinien auf. BV6, sowie LCL161 und Birinapant sind laut dieser *in vitro* durchgeführten Experimente als alleinige Medikation zur Bekämpfung des Multiplen Myelom ungeeignet. Im Gegensatz hierzu stehen die Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel, welche bei niedrigeren Konzentrationen die IC_{50} erreichten. Insbesondere Paclitaxel fiel mit einem besseren Ansprechverhalten auf, jedoch, wie Dimopoulos *et al.* und Kortuem *et al.* beschrieben, auf Kosten einer in klinischen Versuchen auftretenden ausgeprägten Toxizität. (36,73)

Dass eine Monotherapie mit SMAC Mimetics direkt in einer Reduktion der Zellviabilität resultiert, ist als eher ungewöhnlich einzustufen. So zeigte zwar BV6 bei einigen Zelllinien ausgeprägte zytotoxische Wirkung, jedoch scheint die Rolle der SMAC Mimetics als Gegenspieler zu den IAPs insbesondere dann ihren Effekt, wenn sie in

Kombination mit anderen Wirkstoffen, wie zum Beispiel Fas-Ligand, Norcantharidin oder Caspase-Inhibitoren verwendet werden. (30,72,75)

5.2 Wertung und Vergleich der Kombinationstherapien mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel

Das Ergebnis der Proliferationsassays mit der Kombination Birinapant und jeweils Docetaxel bzw. Paclitaxel, lässt darauf schließen, dass die Kombinationstherapie in Bezug auf die Reduktion der relativen Zellzahl für den Großteil der Zelllinien keine signifikanten Vorteile zeigt. Dies gilt nicht für die beiden Zelllinien OPM-2 und U-266, welche zuvor weder in den Monotherapien mit den Zytostatika noch in den Monotherapien mit den SMAC Mimetics die IC_{50} erreichten. In der Kombination mit Birinapant und Docetaxel bzw. Paclitaxel zeigten sie jedoch ein Ansprechverhalten auf die Therapie, was sich in einer Senkung der IC_{50} -Werte (im Schnitt bei unter $10 \mu M$) zeigte (ausgenommen ist die Zelllinie OPM-2 in Kombination mit Birinapant und Docetaxel). Bei den anderen Zelllinien konnte kein verbessertes Ansprechen in Form einer Verbesserung der IC_{50} bei niedrigeren Konzentrationen der Zytostatika festgestellt werden.

Grundsätzlich kann die Kombinationstherapie durchaus eine klinische Relevanz haben, allerdings ist dies eher die Ausnahme und stark spenderspezifisch. Für genaue Analysen, ob diverse Subtypen auf SMAC Mimetics ansprechen im Vergleich zu anderen Formen, sind weiterführende Studien notwendig.

In einer Studie von Eytan *et al.* konnte ein synergetischer Effekt von Birinapant in Kombination mit Docetaxel an Zelllinien von Kopf-Hals-Karzinomen *in vitro* nachgewiesen werden, welcher sich hingegen in einer weiteren Versuchsreihe *in vivo* nicht bestätigen ließ. Diese Zelllinien zeigten jedoch schon in Monotherapien ein Ansprechen gegenüber Birinapant, welches bei den in den eigenen Versuchsreihen verwendeten Zelllinien des Multiplen Myeloms nicht auftrat. (71)

Benetatos *et al.* konnte jedoch bei Zelllinien, welche unter anderem aus einem Ovarialkarzinom oder einem Patienten mit Leukämie gewonnen worden, einen synergetischen Effekt mit einem SMAC Mimetic und einem Zytostatikum nachweisen. Auf eine Monotherapie mit Birinapant reagierten die Zellen nicht zytotoxisch, auch nicht

auf eine Monotherapie mit dem Zytostatikum Gemcitabin. Eine Reduktion der Zellzahl wurde jedoch in einem Kombinationsversuch erzielt und somit konnten Zellen durch einen synergetischen Effekt durch Birinapant und Gemcitabin zur Apoptose gebracht werden. (46)

Das potenteste der drei SMAC Mimetics BV6 konnte in den Monotherapien für nahezu alle Zelllinien (ausgenommen OPM-2) ein Erreichen der IC_{50} verzeichnen, wenn auch bei teilweise sehr hohen Konzentrationen. Setzt man die Ergebnisse der Kombinationstherapie mit BV6 in Vergleich zu den Monotherapien mit den Zytostatika zeigt sich, mit Ausnahme der Zelllinien AMO-1 und OPM-2, bei denen ein Zusammenspiel der Substanzen zu einem früheren Erreichen der IC_{50} führte, kein Vorteil in Bezug auf die Reduktion der Zellviabilität.

Eine Studie von Panayotopoulou *et al.* wies jedoch an Brustkrebszellen eine Sensitivierung für Paclitaxel durch BV6 nach. So konnten Zellen, welche in einer Therapie mit Paclitaxel nicht zugrunde gingen, mit einer anschließenden Konfrontation mit BV6 eliminiert werden. (76)

Des Weiteren konnte von Lueck *et al.* eine Kombination aus BV6 und dem Zytostatikum Cytarabin zur Behandlung von Zelllinien einer primären akuten myeloischen Leukämie einen additiven Effekt hervorrufen, der die Zellzahl im Vergleich zur Monotherapie mit Cytarabin reduzierte. (77)

Ein ähnlicher synergetischer Effekt konnte von Bhatti *et al.* an Zellen eines Non-Hodgkin-Lymphoms beobachtet werden. Während auf die Behandlung von BV6 oder Bortezomib nur wenige Zelllinien zytotoxisch reagierten, konnte ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität in der Kombination der beiden Wirkstoffe festgestellt werden. (78)

Die Monotherapie mit LCL161 zeigte ein eher schwaches bis resistentes Verhalten der Zelllinien auf. In Kombination mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel konnte bei allen Zelllinien die IC_{50} erreicht werden, welches in den Monotherapien nicht geschafft wurde. Ein synergetischer Effekt lässt sich insbesondere bei den Zelllinien AMO-1, KMS-11, OPM-2 und U-266 beobachten, welche in der Kombinationstherapie sensibler

und somit mit einem früheren Erreichen der IC_{50} als in den Monotherapien mit den Zytostatika reagierten.

Ähnliche Effekte wurden in Experimenten von Yang *et al.* aufgezeigt, die darlegen konnten, dass eine Kombination aus LCL161 und Paclitaxel auf deren Zelllinien eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine deutliche Reduktion der Zellviabilität hervorruft, welche in der Monotherapie mit LCL161 gar nicht und für Paclitaxel kaum eintrat. (79)

Im Gegensatz dazu konnte von Tian *et al.* kein additiver Effekt in Bezug auf eine Reduktion der Zellzahl bei Zelllinien eines Hepatozellulären Karzinoms beobachtet werden, welche mit einer Kombination aus LCL161 und Paclitaxel therapiert wurden; ein synergetischer Effekt trat jedoch in Form einer reduzierten Proliferationsrate auf. (80)

Für die SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 in der Kombinationstherapie mit den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel lässt sich schlussfolgern, dass für einige Zelllinien synergetische Effekte beobachtet werden konnten, die im Gegensatz zur Monotherapie zu einem verbesserten Ansprechen in Form einer Reduktion der Zellviabilität führten. Der Großteil der Zelllinien konnte jedoch nicht mit Hilfe einer Kombinationstherapie positiv beeinflusst werden.

Wie schon andere Studien aufzeigten, erscheinen SMAC Mimetics in Form einer Monotherapie ungeeignet; synergetische Effekte in Kombination mit Zytostatika konnten aber dennoch für einige Tumore und vor allem maligne hämatologische Erkrankungen beschrieben werden. (81,82)

5.3 Resumee, Limitationen der Studie und Ausblick

Zusammengefasst lassen sich folgende Erkenntnisse aus den Untersuchungen ableiten:

- Das SMAC Mimetic BV6 ist im Vergleich zu Birinapant und LCL161 potenter im Erreichen einer Reduktion der relativen Zellzahl der Multiplen Myelom Zellen, jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen.
- Sowohl das Zytostatikum Docetaxel als auch Paclitaxel eigneten sich als alleinige Medikation zur Reduktion der relativen Zellzahl. Allerdings erreichte Paclitaxel die IC50 bei deutlich geringeren Konzentrationen und geringeren Resistenzraten und ist somit als potenter einzustufen.
- Ein additiver/synergetischer Effekt durch eine Kombinationstherapie mit SMAC Mimetics und Zytostatika ließ sich bei einigen wenigen Zelllinien beobachten, was sich in einer Reduktion der relativen Zellzahl äußerte, welche in den Monotherapien gar nicht oder kaum bzw. nur bei höheren Konzentrationen (< 10µM) gelang.
- In Western Blots konnte die Degradation bzw. Inhibition der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP nach einer Behandlung mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 bei nahezu allen Zelllinien und damit die Wirksamkeit und biologische Aktivität der verwendeten Substanzen nachgewiesen werden.

Eine Sensitivierung für Apoptose durch SMAC Mimetics ist bei den Multiplen Myelom Zellen nachweisbar, was sich in einer Degradation der IAPs zeigt. Ein synergetischer Effekt in der Kombination mit den in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel ließ sich bei einigen wenigen Zelllinien beobachten und kann somit nicht als grundlegende Therapieempfehlung angesehen werden.

Ursächlich für ein Ausbleiben der Apoptose in einigen Zelllinien in den Monotherapien mit SMAC Mimetics können Mutationen in Genen sein, deren Expression die Apoptose beeinflussen. Zum Beispiel wurde von Cekay *et al.* die Rolle von RIP1 in BV6 induzierter Apoptose bei einer gleichzeitigen Hemmung der Caspasen untersucht. Diese Hemmung der Caspasen simuliert z.B. eine mögliche Mutation des Pro-Caspase 8 exprimierenden Gens, wie sie von Li *et al.* in 9% der Primärtumore von Kopf-Hals-Karzinomen

nachgewiesen wurde. (83) Das Resultat der Studie von Cekay et al zeigt auf, dass bei einer ausbleibenden Expression durch genetischen Knockout von RIP1 oder über eine Überexpression des Antagonisten Nec-1, auch die zuvor erfolgreiche Reduktion der Zellviabilität der Zelllinien eines kolorektalen und eines Mammakarzinoms ausbleibt. Ähnliches wurde für RIP3 und MLKL, wichtige Schlüsselproteine in der Auslösung der Nekroptose, der regulierten Nekrose, beobachtet. Die Abhängigkeit von diesen Proteinen für den Zelltod durch BV6 legt dar, dass Zellen unter der Behandlung von BV6 bei gleichzeitiger Caspasen-Inhibition in regulierter Nekrose zugrunde gehen. (84,85) Somit könnten Mutationen in den entsprechenden Genen für die genannten Proteine zu einer Resistenz gegenüber SMAC Mimetic führen und möglicherweise auch als Erklärung für nicht erreichte Reduktionen der Zellviabilität dienen. Gleichzeitig lassen sich auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, bei denen BV6 in einigen Zelllinien als alleinige Medikation zum Zelltod von Krebszellen führten, über das Modell der Nekroptose erklären. Dieses, für SMAC Mimetics eher ungewöhnliche Resultat, wurde ebenso von El-Meserey *et al.* für das Multiple Myelom, aber auch andere humane Krebszellen beschrieben, welche nach einer Inkubation mit BV6 in den Zelltod übergingen. (70)

Die Nekroptose konnte vermutlich auch bei Zellen einer akuten myeloischen Leukämie beobachtet werden, welche über eine Hemmung von Caspase 8 durch Caspase-Inhibitoren zu einem verbesserten Ansprechen auf Birinapant stimuliert werden konnten. Des Weiteren konnten sogar Zelllinien, welche zuvor resistent reagierten, für Birinapant sensibilisiert werden. (86) Diese Ergebnisse könnten Anlass geben weitere Versuchsreihen mit SMAC Mimetics durchzuführen, jedoch nicht mit dem Ziel den Zelltod durch die Apoptose, sondern über die Nekroptose durch zum Beispiel Kombinationen mit Caspase-Inhibitoren zu erreichen.

Eine Erklärung, warum einige Zellen trotz Proteindegradation nicht in Apoptose gehen, kann eine Überexpression des Proteins cFLIP darstellen, welches die Interaktionsmöglichkeiten insbesondere von Pro-Caspase 8 unterbindet und somit deren Aktivierung verhindert, was letztendlich in einem Ausbleiben der Apoptose resultiert. Dass eine Regulation der cFLIP Proteine zu einem besseren Ansprechen der SMAC Mimetics führen kann, wurde in einer Studie von Li Zhao *et al.* bewiesen, welche darstellten, dass über eine Stimulierung durch das Medikament Norcantharidin Brustkrebszellen für Birinapant sensitiviert werden konnten, indem Norcantharidin über

eine Senkung des cFLIP Levels die Wirkung des SMAC Mimetics verstärkte und somit die Zellviabilität der Tumorzellen erheblich reduzierte. (75) In Multiplen Myelom Zellen sind erhöhte Spiegel von cFLIP nachweisbar; diese Überexpression führt mit einem gleichzeitigen nachweisbaren, niedrigen Level an Procaspase-8 zu Resistenzen, insbesondere gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. (87) Wie bereits oben beschrieben könnte auch bei solchen Zellen von einer Therapie mit SMAC Mimetics profitiert werden, indem, unter Umgehung der Apoptose, die Nekroptose ausgelöst wird.

Ebenso ursächlich für ein Ausbleiben der Apoptose kann eine vermehrte Expression von Proteinen der teilweise anti-apoptotischen BCL2-Familie darstellen, welche durch Mutation der entsprechenden Gene in Krebszellen nachzuweisen ist. Ein Gegenspieler der BCL2-Proteine ist Obatoclax, dessen synergetische Wirkung zusammen mit LCL161 in Multiplen Myelom Zellen untersucht wurde. So konnte gezeigt werden, dass Multiple Myelom Zelllinien wie z. B. MM1.S mit einer Kombinationstherapie aus Obatoclax und LCL161 mit einer erhöhten Reduktion der Zellviabilität reagierten im Vergleich zu einer Monotherapie mit diesen Wirkstoffen. (88)

Eine wichtige Rolle in der Resistenzbildung von Multiplen Myelom-Zellen gegenüber Medikamenten scheinen Mediatoren, welche für das Überleben von Zellen zuständig sind, zu spielen. Besonders hervorzuheben ist hier TNF- α , welches in MM-Zellen als proliferatorischer Faktor das Überleben der entarteten Zellen sichert, indem es über die Rekrutierung von TRADD, RIP und TRAF2 NF- κ B aktiviert, welches im Nukleus die Transkription von anti-apoptotischen bzw. die Zellvitalität-sichernde Mediatoren bewirkt. (89) So kann ein Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- α und der Schwere der Erkrankung hergestellt werden. (90) Auch eine Mutation in dem Transkriptionsfaktor RelB, welcher mit NF- κ B in Wechselwirkung zum Überleben der Multiplen Myelom Zellen beiträgt, hat Anteil an einer Medikamentenresistenz, insbesondere gegenüber Behandlungen, die eine Apoptose über TRAIL ansteuern. (91) In der Studie von Ramakrishnan *et al.* wird jedoch aufgezeigt, dass eine Behandlung des Multiplen Myeloms mit dem SMAC Mimetic LCL161 zu einer Sensibilisierung der Zellen für eine Therapie mit TRAIL und Fas-Ligand, Proteine welche über Bindung an deren entsprechenden Rezeptoren Apoptose auslösen, führte. Ähnliche Beobachtungen konnten von El-Meserey *et al.* bei dem SMAC Mimetic BV6 und einer gesteigerten Sensibilisierung für die Liganden TNF- α und TRAIL gezeigt werden. (70,88)

Neben Überexpressionen von Genen, die anti-apoptotische Proteine kodieren, kommen in MM-Zellen Proteine, welche den Zelltod begünstigen, nur in sehr niedrigen Levels vor und können somit eine Proliferation der geschädigten Zellen nicht unterbinden. Eines dieser Proteine ist RKIP, ein Enzym, welches unter anderem die NF- κ B-Funktion inhibiert, und in einer Vielzahl von Krebserkrankungen kaum exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu liegt jedoch, bis dato noch ungeklärt, beim MM eine Überexpression der Vorstufen von RKIP in phosphorylierter Form vor, welche die aktiven RKIP-Moleküle antagonisiert und mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf korreliert. Neben RKIP werden auch BCL2 und DR5 vermehrt gebildet. Die Überexpression von DR5, einem Todesrezeptor, zur Familie der TNF-Rezeptor Familie gehörend, hängt mit der Überexpression von RKIP zusammen, welche gleichzeitig auch den Antagonisten von DR5 YY1 inhibiert, und könnte als möglicher Ansatzpunkt zur Behandlung des MM gelten. Niedrige Expressions-Level finden sich bei Bcl-6, einem Repressor des anti-inflammatorischen IL-4, und TNFR2. Bcl-6 kann jedoch in Vorstufen des MM auch überexprimiert sein. (92,93)

Auch wurde aufgezeigt, dass die Degradation aller drei IAPs notwendig ist, um zu einem optimalen Ansprechen der Zellen auf die SMAC Mimetics zu gelangen, im Vergleich zu Versuchsreihen, bei denen die Degradation lediglich eines IAPs erfolgreich war. Zu dieser Erkenntnis kamen Ramakrishnan *et al.* indem sie Versuchsreihen an der Multiplen Myelom-Zelllinie MM1.S mit „ausgeschaltetem“ cIAP2 und einer Behandlung mit LCL161 und einer Behandlung nur mit LCL161, welches in vorhergehenden Versuchen cIAP2 nicht degradierte, gegenüberstellten. (30)

Die entgegen der in der Literatur beschriebene Degradation von XIAP in den Multiplen Myelom Zelllinien lässt sich insbesondere auf die verwendete Konzentration der SMAC Mimetics von 100 μ M zurückführen, da auch Falkenhorst *et al.* eine Degradation von XIAP bei Konzentrationen über 1 μ M beschreibt. (94)

Die SMAC Mimetics zeichnen sich in vielen Studien als vielversprechender Ansatzpunkt in der Bekämpfung von Krebserkrankungen aus, jedoch erscheint es sinnvoll, neben den teilweise zytotoxischen Wirkungen und insbesondere für die bivalenten SMAC Mimetics geltende Unverträglichkeit, geeignete Kombinationen mit anderen Wirkstoffen zu finden, um optimalen Nutzen aus der Degradation der IAPs zu ziehen. Auch die Komplexität der maligne transformierten Zellen des MM, auf Grund ihrer klonalen Heterogenität, gibt

Anlass dazu, dass möglicherweise nur eine fallabhängige Entscheidung zur Therapie getroffen werden kann und keine allgemein gültige Therapieempfehlung mit SMAC Mimetics ausgesprochen werden darf.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von 10 Zelllinien, welche sowohl in Monotherapien mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und den Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel, als auch in Kombination der SMAC Mimetics mit den Zytostatika behandelt wurden. Grundlegend sollte analysiert werden, inwiefern sich unterschiedliche SMAC Mimetics zur Apoptose-Sensitivierung und somit zum Einsatz im Multiplen Myelom eignen. Hierzu wurden Proliferationsassays durchgeführt, um über eine Erstellung von Dosis-Wirkungskurven die IC50 zu bestimmen, indem Zellen mit einer Verdünnungsreihe der SMAC Mimetics oder Zytostatika für 96 Stunden inkubiert wurden.

Die Ergebnisse der Studie lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die SMAC Mimetics in vitro als Monotherapie, um die Zellviabilität der Multiplen Myelom Zellen zu reduzieren, nicht eignen. Ausgenommen sind hier einzelne Zelllinien, welche durchaus mit einer Reduktion der Zellzahl auf eine niedrige Konzentration der SMAC Mimetics reagierten.

Auf die Zytostatika, insbesondere Paclitaxel, zeigten die Zellen ein besseres Ansprechen, was sich in einem Erreichen der IC50, welche stellvertretend für die Potenz eines Wirkstoffes in Bezug auf eine Reduktion der Zellviabilität steht, bei Konzentrationen von durchschnittlich unter 10µM äußerte.

In der Kombinationstherapie ließen sich synergetische Effekte bei einigen Zelllinien beobachten, deren relative Zellzahl sich mit der Kombination aus einem SMAC Mimetic und einem Zytostatikum im Vergleich zu den Monotherapien stärker reduzierten, bzw. bei niedrigeren Konzentrationen die IC50 überschritten. Über die Mehrheit der Zelllinien hinweg konnten jedoch für die Multiplen Myelom Zelllinien keine Vorteile aus einer Kombinationstherapie gezogen werden.

Des Weiteren wurde in Western Blots nachgewiesen, dass bei nahezu allen Zelllinien eine Behandlung in Form von einer 24 stündigen Inkubation mit den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 zu einer Degradation der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP führte. Die SMAC Mimetics waren nachweislich biologisch aktiv.

Als Ergebnis dieser Doktorarbeit lässt sich zusammengefasst darlegen, dass eine Kombinationstherapie aus den SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 mit den

Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel für einzelne Zelllinien des Multiplen Myeloms Vorteile im Erreichen einer Reduktion der Zellviabilität darstellt und somit als mögliche Alternative für, gegenüber den bisherigen Therapiemöglichkeiten resistenten, Zelllinien dienen könnte. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass sich das Zytostatikum Paclitaxel in den Monotherapien als äußerst wirkungsvoll herausgestellt hat und Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeit im Bereich des Multiplen Myelom sein könnte. Die Wirkung der SMAC Mimetics als Gegenspieler der IAPs konnte über die Degradation mittels Western Blot bei den Multiplen Myelom Zellen aufgezeigt werden und kann in Kombination mit anderen Wirkstoffen, wie z. B. den oben genannten Caspase 8-Inhibitoren, zu vielversprechenden Ergebnissen in der Therapie des Multiplen Myeloms führen.

7. Literaturverzeichnis

1. **Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, et al. (2013):** Innere Medizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Online verfügbar unter <https://dx.doi.org/10.1055/b-002-5209>, zuletzt geprüft am 27.07.2018.
2. **Eslick R, Talaulikar D (2013):** Multiple myeloma: From diagnosis to treatment. In: Australian Family Physician 42 (10), S. 684–688. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130968>, zuletzt geprüft am 27.07.2018.
3. **Sher T, Miller KC, Deeb G, Lee K, Chanan-Khan A (2010):** Plasma cell leukaemia and other aggressive plasma cell malignancies. In: The British Journal of Haematology 150 (4), S. 418–427. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701603>, zuletzt geprüft am 17.02.2019
4. **Kyle RA, Rajkumar SV (2004):** Multiple myeloma. In: The New England Journal of Medicine 351 (18), S. 1860–1873. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1056/NEJMra041875>, zuletzt geprüft am 27.07.2018.
5. **Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. (2007):** Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. In: The New England Journal of Medicine 356 (25), S. 2582–2590. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070389>, zuletzt geprüft am 27.07.2018.
6. **Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. (2014):** International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. In: The Lancet Oncology 15(12), S. 538–548. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/leu.2013.293>, zuletzt geprüft am 27.07.2018.
7. **Finsinger P, Grammatico S, Chisini M, Piciocchi A, Foà R, Petrucci MT (2016):** Clinical features and prognostic factors in solitary plasmacytoma. In: The British Journal of Haematology 72 (4), S. 554–560. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1111/bjh.13870>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.
8. **The International Myeloma Working Group (2003):** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. In: The British Journal of Haematology 121(5), S. 749–757. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04355.x>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.
9. **Kaatsch P et al. (2011):** Krebs in Deutschland. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 10. Auflage, S. 126. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2015-004>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.

10. **Rand KA, Song C, Dean E, Serie DJ, Curtin K, Sheng X, et al. (2016):** A Meta-analysis of Multiple Myeloma Risk Regions in African and European Ancestry Populations Identifies Putatively Functional Loci. In: *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 25 (12), S. 1609–1618. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27587788>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
11. **Landgren O, Weiss BM (2009):** Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. In: *Leukemia* 23 (10), S. 1691–1697. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587704>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
12. **Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC (1998):** Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. In: *Blood* 91 (1), S. 3–21. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414264>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
13. **Hose D, Seckinger A (2014):** Biologie des multiplen Myeloms. In: *Der Onkologe* 20 (3), S. 208–216. Online verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s00761-013-2568-z>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
14. **Ramsenthaler C, Kane P, Gao W, Siegert RJ, Edmonds PM, Schey SA, et al. (2016):** Prevalence of symptoms in patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. In: *European Journal of Haematology* 97(5), S. 416–429. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1111/ejh.12790>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.
15. **Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR (2016):** Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1364 (1), S. 32–51. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1111/nyas.13038>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.
16. **Delgado-Calle J, Bellido T, Roodman GD (2014):** Role of osteocytes in multiple myeloma bone disease. In: *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 8 (4), S. 407–413. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1097/SPC.000000000000090>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.
17. **Anderson KC, Alsina M, Atanackovic D, Biermann JS, Chandler JC, Costello C, et al. (2015):** Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology. In: *The official Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 13 (11), S. 1398–1435. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553768>, zuletzt geprüft am 28.07.2018.

18. **Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. (2016):** Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. In: *Blood* 127 (24), S. 2955–2962. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27002115>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
19. **Sun C-Y, Li J-Y, Chu Z-B, Zhang L, Chen L, Hu Y (2017):** Efficacy and safety of bortezomib maintenance in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a meta-analysis. In: *Bioscience Reports* 37 (4). Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706008>, zuletzt geprüft am 17.02.2019
20. **Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, López-Jiménez J, de la Rubia J, et al. (2012):** Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. In: *Blood* 120 (8), S. 1589–1596. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-408922>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
21. **Ludwig H, Miguel J, Dimopoulos M, Palumbo A, Sanz RG, Powles R, et al. (2013):** International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. In: *Leukemia* 28, S. 981-922. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/leu.2013.293>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
22. **Rhen T, Cidlowski JA (2005):** Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. In: *The New England Journal of Medicine* 353 (16), S. 1711–1723. Online verfügbar unter: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra050541>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
23. **Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. (2012):** Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. In: *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 92 (4), S. 414–417. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992668>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
24. **Korde N (2016):** Treatment of high-risk smoldering myeloma. In: *Seminars in Oncology* 43 (6), S. 695–696. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061988>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
25. **Baden LR, Swaminathan S, Angarone M, Blouin G, Camins BC, Casper C, et al. (2016):** Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. In: *The official Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 14 (7), S. 882–913. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2016.0093>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

26. **Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C, et al. (2017):** Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. In: *Nature Communications* 8 (1), S. 268. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814763>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
27. **Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. (2012):** Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. In: *Blood* 120 (5), S. 1067–1076. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22498740>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
28. **Egan JB, Shi C-X, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. (2012):** Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. In: *Blood* 120 (5), S. 1060–1066. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529291>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
29. **Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG (2017):** Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. In: *Apoptosis* 22 (12), S. 1487–1509. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1429-4>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
30. **Ramakrishnan V, Painuly U, Kimlinger T, Haug J, Rajkumar S V, Kumar S (2014):** Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in multiple myeloma. In: *Leukemia* 28 (7), S. 1519–1528. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/leu.2014.2>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
31. **Vella-Zarb L, Dinnebier RE, Baisch U (2013):** The Devil is in the Detail: A Rare H-Bonding Motif in New Forms of Docetaxel. In: *Crystal Growth and Design* 13 (10), S. 4402–4410. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1021/cg400814a>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
32. **Hiñe KE, Childs RF, Wani MC, Kepler JA, Thompson JB, Wall E, et al. (1971):** Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia* 1·2. In: *Journal of the American Chemical Society* 93 (9), S. 2325–2327. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
33. **Parnessi J, Kingston D, Powel R, Harracksingh C, Horwitz SB (1982):** Structure-activity study of cytotoxicity and microtubule assembly *in vitro* by taxol and related taxanes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 105 (3), S. 1082–1089. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)91080-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)91080-4), zuletzt geprüft am 29.07.2018.
34. **Liu B-L, Liu X, Qi M-Y, Zhou N-C, Xu B (2012):** Effects of docetaxel on proliferation and apoptosis of human multiple myeloma cell RPMI8226 In: *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 20(6), S. 1378–1383. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257437>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

35. **Miller HJ, Leong T, Khandekar JD, Greipp PR, Gertz MA, Kyle RA (1998):** Paclitaxel as the initial treatment of multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1A93). In: *American Journal of Clinical Oncology* 21 (6), S. 553–556. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856654>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
36. **Kortuem KM, Zidich K, Schuster SR, Khan ML, Jimenez-Zepeda VH, Mikhael JR, et al. (2014):** Activity of 129 Single-Agent Drugs in 228 Phase I and II Clinical Trials in Multiple Myeloma. In: *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 14 (4), S. 284–290. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.12.015>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
37. **Jain T, Dueck AC, Kosiorek H e., Ginos BF, Mayo A, Reeder CB, et al. (2016):** Phase II trial of nab-paclitaxel in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. In: *The American Journal of Hematology* 91 (12), S. 504–505. Online verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581088>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
38. **Friedenberg WR, Graham D, Greipp P, Blood E, Winston RD (2003):** The treatment of multiple myeloma with docetaxel (an ECOG study). In: *Leukemia Research* 27 (8)S. 751–754. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(02\)00344-2](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(02)00344-2), zuletzt geprüft am 29.07.2018.
39. **Amaravadi RK, Schilder RJ, Martin LP, Levin M, Graham MA, Weng DE, et al. (2015):** A Phase I Study of the SMAC-Mimetic Birinapant in Adults with Refractory Solid Tumors or Lymphoma. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (11), S. 2569–2575. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0475>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
40. **Houghton PJ, Kang MH, Reynolds CP, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, et al. (2012):** Initial testing (stage 1) of LCL161, a SMAC mimetic, by the pediatric preclinical testing program. In: *Pediatric Blood Cancer* 58 (4), S. 636–639. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/pbc.23167>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
41. **Infante JR, Dees EC, Olszanski AJ, Dhuria S V, Sen S, Cameron S, et al. (2014):** Phase I dose-escalation study of LCL161, an oral inhibitor of apoptosis proteins inhibitor, in patients with advanced solid tumors. In: *Journal of Clinical Oncology* 32 (28), S. 3103–3110. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.3993>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
42. **Hurwitz HI, Smith DC, Pitot HC, Brill JM, Chugh R, Rouits E, et al. (2015):** Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of oral DEBIO1143 (AT-406) in patients with advanced cancer: results of a first-in-man study. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 75 (4), S. 851–859. Online verfügbar unter <https://Doi.org/10.1007/s00280-015-2709-8>, zuletzt geprüft am 29.07.18.

43. **Tolcher AW, Bendell JC, Papadopoulos KP, Burris HA, Patnaik A, Fairbrother WJ, et al. (2016):** A Phase I Dose-Escalation Study Evaluating the Safety Tolerability and Pharmacokinetics of CUDC-427, a Potent, Oral, Monovalent IAP Antagonist, in Patients with Refractory Solid Tumors. In: *Clinical Cancer Research* 22 (18), S. 4567–4573. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0308>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
44. **Bai L, Smith DC, Wang S (2014):** Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. In: *Pharmacology and Therapeutics* 144 (1), S. 82–95. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.007>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
45. **Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JPR, Melendez-Zajgla J (2008):** Role of SMAC/DIABLO in cancer progression. In: *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 27 (1), S. 48. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-48>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
46. **Benetatos CA, Mitsuuchi Y, Burns JM, Neiman EM, Condon SM, Yu G, et al. (2014):** Birinapant (TL32711), a Bivalent SMAC Mimetic, Targets TRAF2-Associated cIAPs, Abrogates TNF-Induced NF- κ B Activation, and Is Active in Patient-Derived Xenograft Models. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (4), S. 867–879. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0798>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
47. **Gyrd-Hansen M, Meier P (2010):** IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. In: *Nature Reviews Cancer* 10 (8), S. 561–574. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/nrc2889>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
48. **Bertrand MJM, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, et al. (2008):** cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. In: *Molecular Cell* 30 (6), S. 689–700. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.014>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
49. **Graber TE, Holcik M (2011):** Distinct roles for the cellular inhibitors of apoptosis proteins 1 and 2. In: *Cell Death and Disease* 2 (3), S. 135–135. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.20>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
50. **Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova A V., Kayagaki N, Garg P, et al. (2007):** IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B Activation, and TNF α -Dependent Apoptosis. In: *Cell* 131 (4), S. 669–681. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

51. **Dueber EC, Schoeffler AJ, Lingel A, Elliott JM, Fedorova A V., Giannetti AM, et al. (2011):** Antagonists Induce a Conformational Change in cIAP1 That Promotes Autoubiquitination. In: *Science* 334 (6054), S. 376–380. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1126/science.1207862>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
52. **Shi Y et al. (2001):** A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. In: *Nature Structural and Molecular Biology* 8 (5), S. 394–401. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/87548>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
53. **Selleckchem (2014):** Inhibitor Catalog. In: [selleckchem.com](http://file.selleckchem.com/publicity/Selleck-Inhibitor-Catalog-Low-Resolution-EN.pdf), S. 60. Online verfügbar unter <http://file.selleckchem.com/publicity/Selleck-Inhibitor-Catalog-Low-Resolution-EN.pdf>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
54. **Condon SM, Mitsuuchi Y, Deng Y, LaPorte MG, Rippin SR, Haimowitz T, et al. (2014):** Birinapant, a SMAC-mimetic with improved tolerability for the treatment of solid tumors and hematological malignancies. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (9), S. 3666–3677. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1021/jm500176w>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
55. **Rassow J, Hauser K, Netzker R et al. (2016):** *Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-003-129341>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
56. **Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, et al (2000):** Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. In: *Pharmacology and Therapeutics* 88 (3), S. 333–347. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00096-6), zuletzt geprüft am 29.07.2018.
57. **Varfolomeev E, Vucic D (2008):** (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NF&#amp;kappa;B signaling pathways. In: *Cell Cycle* 7 (11), S. 1511–1521. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.4161/cc.7.11.5959>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
58. **Bonora M, Wieckowski MR, Chinopoulos C, Kepp O, Kroemer G, Galluzzi L, et al. (2015):** Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. In: *Oncogene* 34 (12), S.1608. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/onc.2014.462>, zuletzt geprüft am 29.07.18.
59. **Yuan S, Akey CW (2013):** Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. In: *Structure* 21 (4), S. 501–515. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>, zuletzt geprüft am 29.07.18.

60. **Diehl V, Schaadt M, Kirchner H, Hellriegel KP, Gudat F, Fonatsch C, et al. (1978):** Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. In: *Blut* 36 (6), S. 331–338. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/207377>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
61. **Katagiri S, Yonezawa T, Kuyama J, Kanayama Y, Nishida K, Abe T, et al. (1985):** Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. In: *International Journal of Cancer* 36 (2), S. 241–246. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/ijc.2910360217>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
62. **Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Pontén J (1970):** Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. In: *Clinical and Experimental Immunology* 7 (4), S. 477–489. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712861/?tool=pmcentrez&report=abstract>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
63. **Drexler HG, Matsuo Y (2000):** Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. In: *Leukemia Research* 24 (8), S. 681–703. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(99\)00195-2](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(99)00195-2), zuletzt geprüft am 29.07.2018.
64. **Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Löffler D, Koczan D, et al. (2004):** Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. In: *Blood* 103 (1), S. 242–251. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1048>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
65. **Roche Diagnostics Corporation (2012):** CASY Model TT - Cell Counter and Analyzer. In: <https://lifescience.roche.com/>, S. 10–15. Online verfügbar unter http://netdocs.roche.com/PPM/CASY_Model_TT_Operator_Guide_2_5_and_Addendum_1_0_August_2012.pdf, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
66. **Peskin A V, Winterbourn CC. A (2000):** Microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). In: *Clinica Chimica Acta* 293 (1–2), S. 157–66. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00246-6), zuletzt geprüft am 29.07.2018.
67. **Schröterová L, Králová V, Voráčová A, Hasková P, Rudolf E, Cervinka M (2009):** Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. In: *Toxicology in Vitro* 23 (7), S. 1406–1411. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.013>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

68. **Merk:** Cell Proliferation Reagent WST-1. In: sigmaaldruch.com. Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
69. **Li W, Li B, Giacalone NJ, Torossian A, Sun Y, Niu K, et al. (2011):** BV6, an IAP antagonist, activates apoptosis and enhances radiosensitization of non-small cell lung carcinoma in vitro. In: *Journal of Thoracic Oncology* 6 (11), S. 1801–1809. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318226b4a6>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
70. **El-Mesery M, Shaker ME, Elgaml A (2016):** The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF- and TRAIL-induced apoptosis. In: *Experimental Biology and Medicine* 241 (18), S. 2015–2022. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1177/1535370216661779>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
71. **Eytan DF, Snow GE, Carlson SG, Schiltz S, Chen Z, Van Waes C (2015):** Combination effects of SMAC mimetic birinapant with TNF α , TRAIL, and docetaxel in preclinical models of HNSCC. In: *The Laryngoscope* 125 (3), S. 118–24. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/lary.25056>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
72. **Roman C. Brands, Franziska Herbst, Stefan Hartmann AS, Müller-Richter, Christian Linz ACK (2016):** Cytotoxic effects of SMAC-mimetic compound LCL161 in head and neck cancer cell lines. In: *Clinical Oral Investigations* 20 (9), S. 2325–2332. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1741-3>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
73. **Dimopoulos MA, Arbuck S, Huber M, Weber D, LUCKETT R, Delasalle K, et al. (1994):** Primary therapy of multiple myeloma with paclitaxel (taxol). In: *Annals of Oncology* 5 (8), S. 757–759. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826909>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
74. **Hassan S, Dhar S, Sandström M, Arsenau D, Budnikova M, Lokot I, et al. (2005):** Cytotoxic activity of a new paclitaxel formulation, Pacliex, in vitro and in vivo. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 55 (1), S. 47–54. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0855-5>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
75. **Zhao L, Yang G, Bai H, Zhang M, Mou D (2017):** NCTD promotes Birinapant-mediated anticancer activity in breast cancer cells by downregulation of cIAP. In: *Oncotarget* 8 (16), S. 26886–26895. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15848>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

76. **Panayotopoulou EG, Müller A-K, Börries M, Busch H, Hu G, Lev S, et al. (2017):** Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells. In: *Oncotarget* 8 (28), S. 45088–45104. Online verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/15125>, zuletzt geprüft am 17.02.2019.
77. **Lueck SC, Russ AC, Botzenhardt U, Schlenk RF, Zobel K, Deshayes K, et al. (2016):** SMAC mimetic induces cell death in a large proportion of primary acute myeloid leukemia samples, which correlates with defined molecular markers. In: *Oncotarget* 7 (31), S. 49539–49551. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10390>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
78. **Bhatti IA, Abhari BA, Fulda S. (2017):** Identification of a synergistic combination of SMAC mimetic and Bortezomib to trigger cell death in B-cell non-Hodgkin lymphoma cells. In: *Cancer Letters* 405, S. 63–72. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.008>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
79. **Yang C, Wang H, Zhang B, Chen Y, Zhang Y, Sun X, et al. (2016):** LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC. In: *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 35 (1), S. 158. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0435-7>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
80. **Tian A, Wilson GS, Lie S, Wu G, Hu Z, Hebbard L, et al. (2014):** Synergistic effects of IAP inhibitor LCL161 and paclitaxel on hepatocellular carcinoma cells. In: *Cancer Letters* 351 (2), S. 232–241. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.006>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
81. **Fulda S. (2015):** Promises and Challenges of SMAC Mimetics as Cancer Therapeutics. In: *Clinical Cancer Research* 21 (22), S. 5030–5036. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0365>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
82. **Fulda S. (2015):** SMAC mimetics as IAP antagonists. In: *Seminars in Cell and Developmental Biology* 39, S. 132–138. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.12.005>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
83. **Li C, Egloff AM, Sen M, Grandis JR, Johnson DE (2014):** Caspase-8 mutations in head and neck cancer confer resistance to death receptor-mediated apoptosis and enhance migration, invasion, and tumor growth. In: *Molecular Oncology* 8 (7), S. 1220–1230. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.018>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
84. **Degterev A, Linkermann A (2016):** Generation of small molecules to interfere with regulated necrosis. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (11–12), S. 2251–2267. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2198-x>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

85. **Cekay MJ, Roesler S, Frank T, Knuth A-K, Eckhardt I, Fulda S (2017):** SMAC mimetics and type II interferon synergistically induce necroptosis in various cancer cell lines. In *Cancer Letters* 410, S. 228–237. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.002>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
86. **Brumatti G, Ma C, Lalaoui N, Nguyen N-Y, Navarro M, Tanzer MC, et al. (2016):** The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. In *Science Translation Medicine* 8 (339), S. 339–369. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3099>, zuletzt verfügbar unter 29.07.2018.
87. **Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Anderson KC, Treon SP (2002):** Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. In: *Blood* 99 (6), S. 2162–2171. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.2162>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
88. **Ramakrishnan V, Gomez M, Prasad V, Kimlinger T, Painuly U, Mukhopadhyay B, et al. (2016):** SMAC mimetic LCL161 overcomes protective ER stress induced by obatoclax, synergistically causing cell death in multiple myeloma. In: *Oncotarget* 7 (35), S. 56253–56265. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11028>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
89. **Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996):** Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. In: *Science* 274 (5288), S. 787–789. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1126/science.274.5288.787>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
90. **Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, Brochier J, Rossi JF, Klein B (1999):** Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. In: *European Cytokine Network* 10 (1), S. 65–70. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2025696/>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
91. **Roy P, Mukherjee T, Chatterjee B, Vijayaragavan B, Banoth B, Basak S (2017):** Non-canonical NFκB mutations reinforce pro-survival TNF response in multiple myeloma through an autoregulatory RelB:p50 NFκB pathway. In: *Oncogene* 36 (10), S. 1417–1429. Online verfügbar unter <https://www.nature.com/articles/onc2016309>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.
92. **Shvartsur A, Givechian KB, Garban H, Bonavida B (2017):** Overexpression of RKIP and its cross-talk with several regulatory gene products in multiple myeloma. In: *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 36 (1), S. 62. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0535-z>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

93. **Baritaki S, Huerta-Yopez S, Cabrava-Haimandez M da L, Sensi M, Canevari S, Libra M, et al. (2011):** Unique Pattern of Overexpression of Raf-1 Kinase Inhibitory Protein in Its Inactivated Phosphorylated Form in Human Multiple Myeloma. In: Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics 2 (2), S. 179–188. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.v2.i2.90>, zuletzt geprüft am 29.07.2018
94. **Falkenhorst J, Grunewald S, Mühlenberg T, Marino-Enriquez A, Reis A-C, Corless C, et al. (2016):** Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the proapoptotic activity of imatinib. In: Oncotarget 7 (27), S. 41390–41403. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9159>, zuletzt geprüft am 29.07.2018.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

- Abbildung 1 - Der in- und extrinsische Signalweg der Apoptose (modifiziert aus "Duale Reihe Biochemie 2016" unter Berücksichtigung des §60c des Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetzes) - 17 -
- Abbildung 2 - Funktion Superoxiddismutase modifizierte Abbildung (unter Berücksichtigung des §60c des Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetzes) (68)..... - 28 -
- Abbildung 3 – Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der jeweiligen SMAC Mimetics nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien im Proliferationsassay. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm für die 3 SMAC Mimetics: orange für die Monotherapie mit Birinapant, grün für BV6 und hellblau für LCL161. Die x-Achse gibt die Konzentration des SMAC Mimetics in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent an. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt. - 35 -
- Abbildung 4 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Monotherapien mit Docetaxel und Paclitaxel nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 2 Kurven: hellblau für die Wirkungskurven von Docetaxel und orange für die Wirkungskurven von Paclitaxel. Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt. - 38 -
- Abbildung 5 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic Birinapant nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + Birinapant, rot für die Kombination Paclitaxel + Birinapant; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt. - 40 -
- Abbildung 6 - Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic BV6 nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + BV6, rot für die

Kombination Paclitaxel + BV6; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt..... - 43 -

Abbildung 7 Darstellung der Wirkungskurven eines repräsentativen Versuches der Kombinationstherapie mit Docetaxel und Paclitaxel mit dem SMAC Mimetic LCL161 nach 96 stündiger Inkubationszeit für alle 10 Zelllinien. Gezeigt ist pro Zelllinie ein Diagramm mit 4 Kurven: Dunkelblau für die Kombination mit Docetaxel + LCL161, rot für die Kombination Paclitaxel + LCL161; hinterlegt sind jeweils die Wirkungskurven aus den Monotherapien mit Docetaxel (hellblau) und Paclitaxel (orange). Die x-Achse gibt die Konzentration des Zytostatikums in μM an, die y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt als Balken dargestellt. .. - 45 -

Abbildung 8 – Auflistung der Western Blot- und Tubulinanalyse der Multiplen Myelom Zelllinien. Dargestellt ist für jede Zelllinie der Nachweis der Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP, beginnend von links nach rechts mit der unbehandelten Kontrollgruppe und folgend nach 24 stündiger Inkubationszeit mit den SMAC Mimetics BV6, LCL161 und Birinapant. Den Western Blots sind die Tubulin-Analysen angehängt, bei nicht ausreichendem Nachweis aller Proben, wurde für jedes Protein ein separater Tubulin-Nachweis aufgelistet. Bei der Zelllinie OPM-2 konnten keine Proteine nachgewiesen werden, bei der Zelllinie KMS-12-BM lediglich cIAP2 nicht. - 49 -

Abbildung 9 - Mikroskopische Darstellung der Zellen nach Behandlung mit BV6; repräsentativ gezeigt am Beispiel der Zelllinien AMO-1, JJN-3 und KMS-12-BM. Visualisiert ist eine Gegenüberstellung einer unbehandelten Zellgruppe (A) mit Zellen, welche 32h mit BV6 in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ inkubiert wurden (B). Während die unbehandelten Zellen sich meist gruppiert angeordnet und in hoher Anzahl darstellen, ist bei den hauptsächlich einzeln vorkommenden Zellen, der behandelten Gruppen, eine geringere Zellzahl zu erkennen..... - 50 -

8.2 Tabellen

Tabelle 1 - Vorstufen des Multiplen Myeloms (5–8).....	- 2 -
Tabelle 2 - SMAC Mimetic Birinapant (53)	- 13 -
Tabelle 3 - SMAC Mimetic BV6 (53)	- 14 -
Tabelle 4 - SMAC Mimetic LCL161 (53).....	- 14 -
Tabelle 5 - humane Zelllinien des Multiplen Myeloms (60–63)	- 19 -
Tabelle 6 – Zusammensetzung des Zellmediums RPMI-1640.....	- 20 -
Tabelle 7 - SMAC Mimetics	- 20 -
Tabelle 8 - Zytostatika	- 20 -
Tabelle 9 - Proliferationsassays – weitere Materialien	- 20 -
Tabelle 10 - verwendete Antikörper	- 21 -
Tabelle 11 - Western Blot – Gele und Puffer	- 21 -
Tabelle 12 - Western Blot – weitere Materialien.....	- 22 -
Tabelle 13 - weitere Materialien.....	- 23 -
Tabelle 14 – Pipettierschema einer 96er-Wellplatte, M=Medium RPMI-1640 (100µl), K=Kontrollgruppe aus Medium (50µl) + MM-Zellen (20.000 in 50µl Medium), IC100= 200µM SMAC Mimetic (50µl) + MM-Zellen (20.000 in 50µl Medium), log. Verdünnungsreihe entsprechend Fließtext, innere Wells sind nicht dargestellt.	- 25 -
Tabelle 15 – Konzentrationen der SMAC Mimetics in den Kombinationsversuchen	- 27 -
Tabelle 16 - IC ₅₀ Werte der drei SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161. Dargestellt ist die IC ₅₀ in µM der 3 SMAC Mimetics für die 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe des Softwareprogrammes Excel. Bei nicht erreichter IC ₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.	- 34 -
Tabelle 17 - IC ₅₀ Werte der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel. Dargestellt ist die IC ₅₀ in µM von Docetaxel und Paclitaxel für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC ₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.	- 36 -
Tabelle 18 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit Birinapant und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Dargestellt ist die IC ₅₀ in µM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit Birinapant für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC ₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet.	- 41 -

Tabelle 19 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit BV6 und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Für alle 10 Zelllinien ist die IC₅₀ in μM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit dem SMAC Mimetic BV6 aufgezeigt. Die graphische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwareprogrammes „Excel“ erzielt. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet. - 42 -

Tabelle 20 - Charakterisierung der Wirkung der Kombinationstherapie mit LCL161 und Docetaxel bzw. Paclitaxel der untersuchten Zelllinien. Dargestellt ist die IC₅₀ in μM von Docetaxel und Paclitaxel in Kombination mit LCL161 für alle 10 Zelllinien. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe eines Softwareprogrammes. Bei nicht erreichter IC₅₀ konnte entsprechend kein Wert ermittelt werden. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet. - 46 -

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die sich durch die Mitarbeit an diesem Promotionsprojekt beteiligt haben.

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Müller-Richter für die Möglichkeit dieses Forschungsthema zu bearbeiten bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Axel Seher, ohne dessen unerschöpfliche Bemühungen, seinen immer zügigen Korrekturen und Hilfestellungen ein solches Promotionsvorhaben nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich den MTAs des wissenschaftlichen Labors Margit Schleyer und Irina Kucerov danken, deren Erfahrungsschatz der verschiedenen Forschungsmethoden von enormen Wert für das Gelingen der Versuchsvorhaben war.

Abschließend gebührt mein Dank meiner Mutter Dr. Isolde Schüßler, ohne deren Rat ich ein derart aufwendiges Promotionsvorhaben erst gar nicht begonnen und verfolgt hätte.

10. Lebenslauf

Name	Lion Maximilian Schüßler	
Geburt	**.**.19** in Heidelberg	
Eltern	Dr. Jörg Schüßler Dr. Isolde Schüßler	
Geschwister	Dr. Felix Schüßler Dr. Melina Schüßler	
Schule	2002- 2011	Burghardt-Gymnasium Buchen
	Juni 2011	Allgemeine Hochschulreife
Studium	2011-2016	Studium der Zahnmedizin an der Universität
	November 2016	Würzburg
Berufserfahrungen	2017	Approbation als Zahnarzt Kieferchirurgische Praxis Dr. Dr. Jell in Rosenheim
	Seit 2018	Zahnklinik Mühldorf am Inn Ärztlicher Direktor: Dr. Gebauer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse der Wirksamkeit der SMAC Mimetics Birinapant, BV6 und LCL161 und der Zytostatika Docetaxel und Paclitaxel auf Zellen des Multiplen Myeloms“ eigenständig, d.h. selbständig und ohne zur Hilfenahme Dritter, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 18.02.2019