

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Strahlen- und
Chemotherapie durch das *SMAC mimetic* LCL161**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie-Sophie Erdmann
aus Berlin

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	S. 4
Tabellenverzeichnis	S. 5
Abkürzungsverzeichnis	S. 6
Maße und Einheiten	S. 6
Abstrakt (Deutsch)	S. 7
Abstract (Englisch)	S. 9
1. Einleitung	S. 10
2. Methodik	S. 25
2.1 Chemikalien und Reagenzien	S. 25
2.2. Kits und Standards	S. 26
2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien	S. 26
2.4. Puffer und Lösungen	S. 27
2.5. Western-Blot-Antikörper	S. 28
2.6. Chemotherapeutika und LCL161	S. 28
2.7. Inhibitoren	S. 28
2.8. siRNAs, Antisense-Oligonukleotide und Transfektionsreagenz	S. 29
2.9. Taqman-Sonden	S. 30
2.10. Zellen und Zelllinien	S. 30
2.11. Behandlung mit Chemo-/Radiotherapie in Kombination mit LCL161	S. 30
2.12. Durchflusszytometrie	S. 31
2.13. Proteinextraktion	S. 32
2.14. Protein-Bestimmung	S. 33
2.15. Western Blot	S. 33
2.16. Transfektion von siRNAs und Antisense-Oligonukleotiden	S. 34
2.17. RNA-Extraktion	S. 34
2.18. Reverse Transkription	S. 34
2.19. Real-time PCR	S. 36
2.20. Mausversuche	S. 36
2.21. Statistische Auswertung	S. 37
3. Ergebnisse	S. 38
3.1. Überexpression von inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in Osteosarkomzellen	S. 38

3.2. Der Effekt von <i>SMAC mimetic</i> LCL161 auf 143B- und Saos-2-Zellen	S. 39
3.3. Effekte von <i>SMAC mimetic</i> LCL161 in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie in Osteosarkomzellen <i>in vitro</i>	S. 40
3.4. Mechanismen der Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Chemo- und Strahlentherapie mittels <i>SMAC mimetic</i> LCL161	S. 44
3.5. Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Analysen mittels <i>forward scatter/sideward scatter</i> und mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung zum Nachweis der Apoptose-Induktion	S. 52
3.6. Pro-apoptotische Effekte von LCL161 auf Osteosarkomzellen <i>in vivo</i>	S. 53
4. Diskussion	S. 55
5. Literaturverzeichnis	S. 62
6. Eidesstattliche Versicherung	S. 69
7. Lebenslauf	S. 70
8. Danksagung	S. 71

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland	S. 10
Abb.2: Lokalisation und Häufigkeit des Osteosarkoms im Skelett	S. 11
Abb.3: Typische klinische Befunde des Osteosarkoms und korrespondierende Röntgenbilder	S. 13
Abb.4: Bildgebende Diagnostik des Osteosarkoms	S. 13
Abb.5: Histopathologische Subtypen des Osteosarkoms	S. 14
Abb.6: Therapieplan nach Empfehlung der Cooperative OsteoSarkom Studiengruppe	S. 15
Abb.7: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für unterschiedliche prognostische Faktoren	S. 17
Abb. 8: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg und die Rolle von XIAP, cIAP1 und cIAP2	S. 19
Abb. 9: Struktur der <i>inhibitor of apoptosis proteins</i> (IAPs)	S. 19
Abb. 10: Modell zum Effekt von <i>SMAC mimetics</i> auf die Regulation von TNF α , RIP1- und NF κ B-Signalwegen und Apoptose	S. 22
Abb. 11: Auswertung der Durchflusszytometrie mittels FlowJo	S. 32
Abb. 12: Aufbau des <i>Semi-dry-blots</i>	S. 34
Abb. 13: Überexpression von XIAP in Osteosarkomzellen	S. 38
Abb. 14: Effekt von <i>SMAC mimetic</i> LCL161 auf 143B- und Saos-2-Zellen	S. 39
Abb. 15: Sensitivierung von 143B- und Saos-2-Zellen für Bestrahlung mittels des <i>SMAC mimetic</i> LCL161	S. 41
Abb. 16: Sensitivierung von 143B-Zellen für Chemotherapie mittels des <i>SMAC mimetic</i> LCL161	S. 43
Abb. 17: Sensitivierung von Saos-2-Zellen für Chemotherapie mittels des <i>SMAC mimetic</i> LCL161	S. 43
Abb. 18: Proteinlevel von <i>inhibitor of apoptosis proteins</i> in 143B- und Saos-2-Zellen ohne und mit Behandlung	S. 45
Abb. 19: Die Etablierung des cIAP1- <i>knockdowns</i> und der Einfluss des cIAP1- <i>knockdowns</i> auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung der proapoptotischen Effekte von Vincristin in Saos-2-Zellen	S. 47

Abb. 20: Verifizierung effizienter Inhibitorkonzentrationen von Adalimumab, Necrostatin-1 und PBS-1086	S. 49
Abb. 21: Der Einfluss von Adalimumab, Necrostatin-1 und PBS-1086 auf die Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Chemo- und Strahlentherapie mittels des <i>SMAC mimetic</i> LCL161	S. 50
Abb. 22: Etablierung des RIP1- <i>knockdowns</i> und der Einfluss des RIP1- <i>knockdowns</i> auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung der proapoptischen Effekte von Vincristin in Saos-2-Zellen	S. 51
Abb. 23: Durchflusszytometrische Auswertung mittels <i>forward scatter/sideward scatter</i> und AnnexinV/ Propidiumiodid-Färbung	S. 52
Abb. 24: Effekte von <i>SMAC mimetic</i> LCL161 allein und in Kombination mit Doxorubicin in Saos-2-Zellen <i>in vivo</i>	S. 54

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung nach TNM-Klassifikation	S. 12
Tab. 2: Auswahl präklinischer Studien mit <i>SMAC mimetics</i>	S. 23
Tab. 3: Klinische Studien mit LCL161 nach ClinicalTrials.gov	S. 24
Tab. 4: Gelzusammensetzung für die Gelelektrophorese	S. 33
Tab. 5: Pipettierschema für die Reverse Transkription	S. 35
Tab. 6: Temperaturverlauf für die Reverse Transkription	S. 35
Tab. 7: Pipettierschema für die Real-time PCR	S. 36
Tab. 8: Temperaturverlauf für die Real-time-PCR	S. 36

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
BIR	<i>baculoviral IAP Repeat</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CI	<i>combination index</i>
clAP1/2	<i>cellular IAP1/2</i>
COSS	Cooperative OsteoSarkom Studiengruppe
CT	Computertomographie
EURAMOS	<i>European American Osteosarcoma Study</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FKS	fetales Kälberserum
HPR	Horseradish Peroxidase
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ML-IAP	<i>Melanoma IAP</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OS	Osteosarkom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	<i>SMAC mimetic</i>
TEMED	Tetramethyl-Ethylen-Diamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Trishydroxy-Methyl-Amino-Methan
XIAP	<i>X chromosome linked IAP</i>

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm = 10 ⁻⁶ Gramm
µl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ Liter
µM	Mikromolar = 10 ⁻⁶ Molar
kDa	Kilodalton = 10 ³ Dalton
h	Stunden
min	Minuten
ml	Milliliter
ng	Nanogramm = 10 ⁻⁹ Gramm
nM	Nanomolar = 10 ⁻⁹ Molar
nm	Nanometer = 10 ⁻⁹ Meter
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunden
V	Volt

Abstrakt

Osteosarkome sind die häufigsten malignen Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter. Die Behandlung von Osteosarkomen wurde in den 1970er Jahren durch die Einführung einer intensiven Polychemotherapie revolutioniert, konnte jedoch seitdem kaum verbessert werden. Besonders die Therapiemöglichkeiten bei inoperablen und metastasierten Tumoren sind weiterhin sehr begrenzt, sodass die Entwicklung von Strategien zur Optimierung der Effektivität der antineoplastischen Therapie dringend erforderlich ist. Als eine vielversprechende neue Strategie zur Überwindung von Resistenz gegenüber antineoplastischer Therapie wurde in den letzten Jahren der Einsatz von *small molecules*, welche gegen zentrale Regulationsproteine der Apoptose gerichtet sind, beschrieben: *SMAC mimetics* (SM) hemmen die Wirkung der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), welche zu den wichtigsten zellulären Inhibitoren der Apoptose gehören.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Osteosarkomzelllinien 143B und Saos-2 mit dem SM LCL161 allein und in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie (Doxorubicin, Methotrexat, Cisplatin und Vincristin) behandelt. Die Apoptose-Induktion wurde per Durchflusszytometrie ermittelt. Um involvierte Signalwege zu untersuchen, wurden sowohl Inhibitoren als auch siRNAs benutzt. Für die *In-vivo*-Versuche wurden NOD/SCID/IL2rg-Mäusen Saos-2-Zellen appliziert und mit LCL161 und/oder Doxorubicin behandelt.

In vitro zeigten Osteosarkomzellen eine Resistenz gegenüber SM allein. Apoptose-Induktion durch Strahlen- oder Chemotherapie ließ sich jedoch durch LCL161 deutlich verstärken. Die Kombination aus Doxorubicin bzw. Vincristin und LCL161 zeigte dabei klare synergistische Effekte, die durch *combination indices* nach der Chou-Talalay-Methode ermittelt wurden. Als Mechanismus dieser LCL161-vermittelten Verstärkung scheint am ehesten die Hemmung von XIAP eine wichtige Rolle zu spielen. Sowohl der Einfluss einer cIAP1-vermittelten Aktivierung von NFκB-Signalwegen, als auch einer TNFα- und RIP1-abhängige Apoptose-Induktion auf die LCL161-vermittelte Verstärkung apoptotischer Effekte konnte für Osteosarkomzellen nicht gezeigt werden. *In vivo* kam es durch die Behandlung mit dem SM LCL161 allein zu einer deutlichen Reduktion des Tumorumfanges. Synergistische Effekte von LCL161 und Doxorubicin ließen sich *in vivo*

aufgrund einer unerwarteten Doxorubicin-Toxizität in dem verwendeten Mausmodell anhand der durchgeführten Experimente nicht sicher demonstrieren.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Behandlung mit SM allein und besonders in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie eine vielversprechende Therapieoption für Kinder und Jugendliche mit nicht-operablen bzw. metastasierten Osteosarkomen sein könnte.

Abstract

Osteosarcoma is the most frequent primary malignant bone tumour. The treatment was revolutionised in the 1970s by the introduction of a polychemotherapy. Since then, nearly no improvements have been achieved in the treatment of osteosarcoma. Especially options for inoperable and metastatic tumours are still very limited. Thus, the development of new treatment strategies to optimise the effectivity of the cancer therapy is of utmost importance. A promising new strategy is the use of small molecules, which target proteins of the apoptosis pathways. SMAC mimetics are such small molecules and interfere with inhibitor of apoptosis proteins.

In this project, the osteosarcoma cell lines 143B and Saos-2 were treated with the SM LCL161 alone or in combination with irradiation or chemotherapy (Doxorubicin, Methotrexate, Cisplatin and Vincristine). Apoptosis was determined by flow cytometry. For pathway analysis, we used inhibitors and siRNAs. For in vivo experiments, Saos-2 cells were injected in NOD/SCID/IL2rg mice and treated with LCL161 alone or in combination with Doxorubicin.

We found that in vitro, osteosarcoma cell lines were resistant to the SM LCL161 alone. However, LCL161 was able to sensitise osteosarcoma cell lines for chemotherapy and irradiation. For the combination of LCL161 and doxorubicin or vincristine, combination indices showed synergetic effects. Our findings suggested, that this sensitisation was neither TNF α nor RIP1 dependent. We also found no involvement of a cIAP-mediated activation of NF κ B pathways. Thus, XIAP seems to play a key role in this LCL161 mediated sensitisation for chemotherapy and irradiation. In vivo, LCL161 was able to reduce tumour growth. Because of the unexpected toxicity of doxorubicin, synergistic effects of the combination of LCL161 and chemotherapy could not be shown.

In conclusion, these findings indicate that the treatment with SM alone or in combination with chemotherapy or irradiation may be a promising option for children and adolescents with inoperable or metastatic osteosarcoma.

1. Einleitung

Maligne Tumoren treten im Kindes- und Jugendalter deutlich seltener auf als im Erwachsenenalter: 2169 Kinder und Jugendliche erkrankten im Jahr 2015 an einer bösartigen Erkrankung (1) versus 436.500 Erwachsenen im Jahr 2004 (2). Auch zwischen den Krebsentitäten und deren Häufigkeiten bestehen in den beiden Altersbereichen große Unterschiede. Zum Beispiel machen Karzinome im Kindes- und Jugendalter nur ca. 1 % der Krebserkrankungen aus, während es im Erwachsenenalter mehr als 90 % sind (3). Leukämien, Hirntumoren und Lymphome sind in dieser Reihenfolge die häufigsten Tumoren im Kinder- und Jugendalter [(1), Abb. 1 nach (4)].

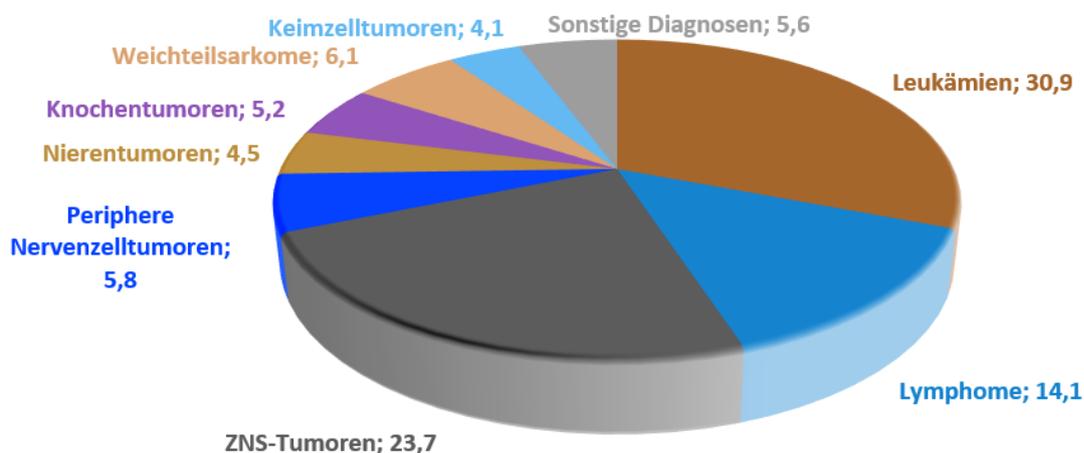


Abb.1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland (in Prozent) (4)

Abkürzungen: ZNS - zentrales Nervensystem

Osteosarkome sind die häufigsten malignen Knochtumoren im Kindes- und Jugendalter. Sie gehen direkt vom Knochengewebe aus und sind somit primäre Knochtumoren. Typischerweise treten sie an den Metaphysen langer Röhrenknochen auf, wobei etwa 65 % kniegelenksnah am distalen Femur oder der proximalen Tibia entstehen [Abb.2 nach (5)]. Der Altersgipfel für Osteosarkomerkrankungen im Kindes- und Jugendalter liegt im zweiten Lebensjahrzehnt. In der Altersgruppe zwischen 15 und 19 Jahren machen sie über 5 % der malignen Erkrankungen aus (6) und sind somit nach Lymphomen und Hirntumoren die dritthäufigste maligne Tumorentität in dieser Altersgruppe. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Osteosarkoms haben Kinder mit einer Mutation des Retinoblastom-Gens oder einer TP53-Mutation (Li-Fraumeni-Syndrom) (7). Darüber hinaus treten Osteosarkome gehäuft als Zweitmalignome nach Strahlentherapie auf (8).

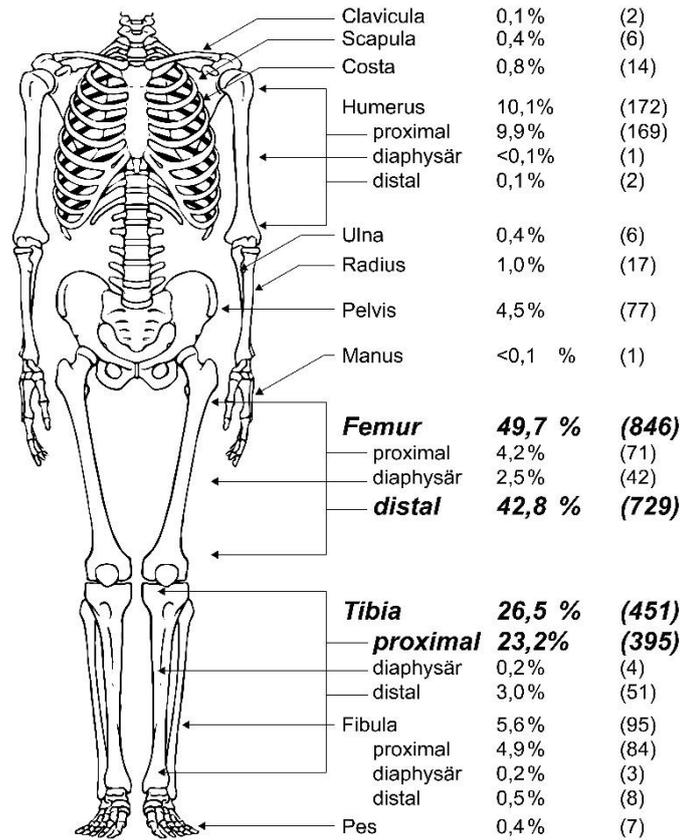


Abb.2: Lokalisation und Häufigkeit des Osteosarkoms im Skelett (modifiziert nach 5)

Typische klinische Symptome des Osteosarkoms sind Schmerzen, Schwellung, Überwärmung und Bewegungseinschränkung des angrenzenden Gelenks (Abb. 3A). Typische radiologische Zeichen sind ein Weichteiltumor mit atypischen Knochenanteilen (Spiculae), Zerstörung der Knochenstruktur und Abhebung des Periosts (Codman-Dreieck) (Abb. 3B/D, Abb. 4A/B). Bei etwa 10% der Patienten kommt es zu einer pathologischen Fraktur (Abb. 3D). Die Diagnose ist auch bei typischem radiologischem Bild immer durch eine Biopsie und histopathologische Untersuchung zu sichern. Hier können folgende histopathologische Subtypen unterschieden werden: chondroblastisch, osteoblastisch und fibroblastisch (Abb. 5A/B/C)

Das Metastasierungsmuster des Osteosarkoms umfasst in erster Linie die Lunge und das Skelett. Bei 10 bis 20 % der Kinder und Jugendlichen findet man bei Diagnosestellung bereits Metastasen. Diese liegen bei etwa 70 % in der Lunge und seltener in Knochen oder anderen Organen (7). Die wichtigsten apparativen Untersuchungen im Rahmen des initialen Stagings sind daher eine Röntgenaufnahme und eine Computertomographie (CT) des Thorax sowie eine Knochenszintigraphie (Abb. 4C/D). Neue Untersuchungen

lassen jedoch vermuten, dass eine Positronen-Emissions-Tomographie mit Fluordesoxyglucose in Kombination mit einer CT (FDG-PET/CT, Abb. 4E) für das initiale Staging (9) und für die Beurteilung des Ansprechens auf Chemotherapie (10) der Kombination von CT Thorax und Knochenszintigraphie überlegen sind.

Die Stadieneinteilung des Osteosarkoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (Tab. 1).

Tab. 1: Stadieneinteilung nach TNM-Klassifikation

Stadium IA	T1	N0	M0	G 1,2
Stadium IB	T2	N0	M0	G 1,2
Stadium IIA	T1	N0	M0	G 3,4
Stadium IIB	T2	N0	M0	G 3,4
Stadium III	T3	N0	M0	jedes G
Stadium IVA	jedes T	N0	M1a	jedes G
Stadium IVB	jedes T	N1	jedes M	jedes G
	jedes T	jedes N	M1b	jedes G
Primärtumor (T)				
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor			
T1	größte Tumorausdehnung < 8 cm			
T2	größte Tumorausdehnung > 8 cm			
T3	diskontinuierliche Tumoren in der primär befallenen Region			
Regionäre Lymphknoten (N)				
N0	kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten			
N1	Befall regionärer Lymphknoten			
Fernmetastasen (M)				
M0	kein Anhalt auf Fernmetastasen			
M1	Fernmetastasen vorhanden (M1a: Lunge, M1b: andere Fernmetastasen)			
Histopathologisches Grading				
G1	gut differenziert			
G2	mäßig differenziert			
G3	schlecht differenziert			
G4	undifferenziert			

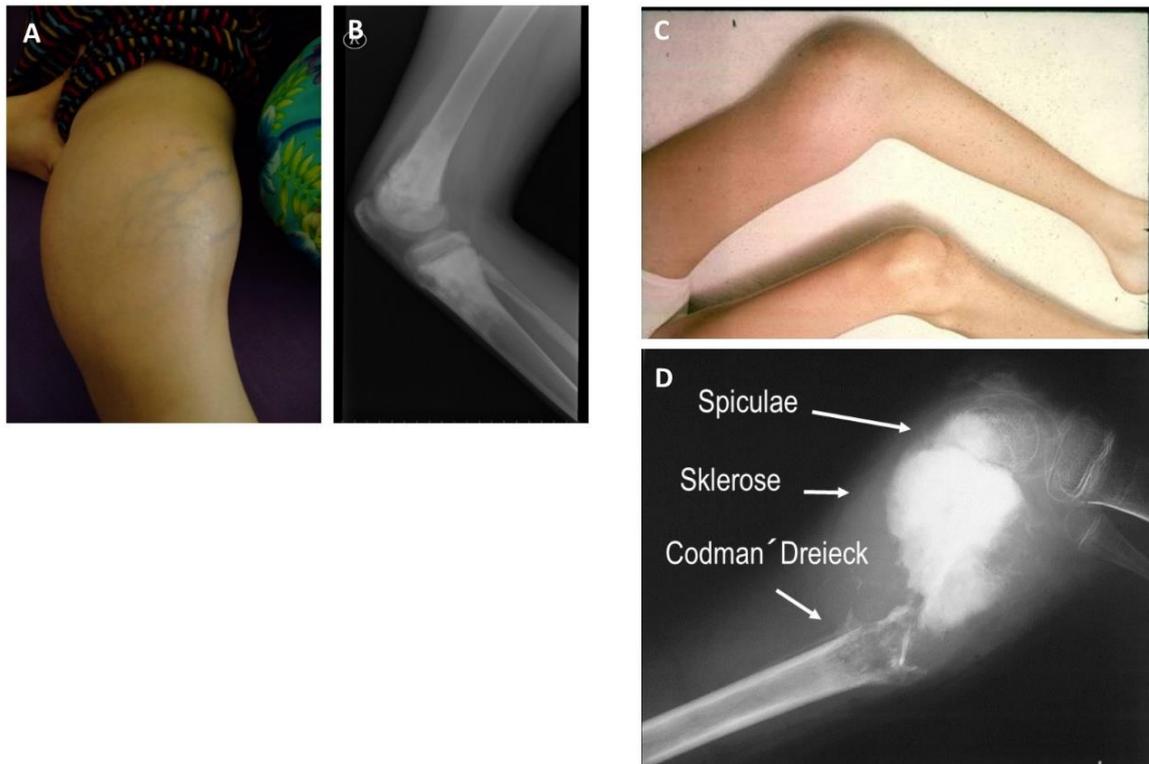


Abb.3: Typische klinische Befunde des Osteosarkoms und korrespondierende Röntgenbilder: Schwellung (A), pathologische Fraktur (C, D)

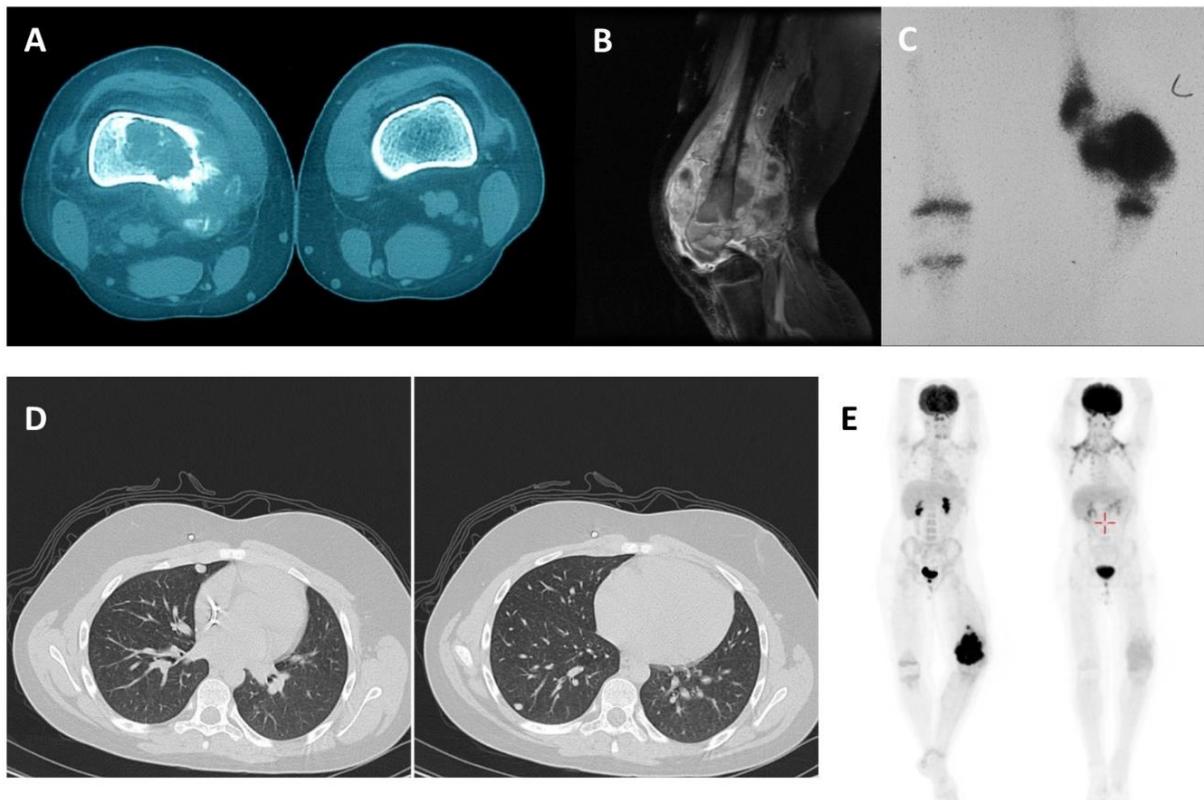


Abb.4: Bildgebende Diagnostik des Osteosarkoms: Magnetresonanztomographie (A,B), Knochenszintigraphie (C), Computertomographie des Thorax (D), FDG-PET/CT (E)

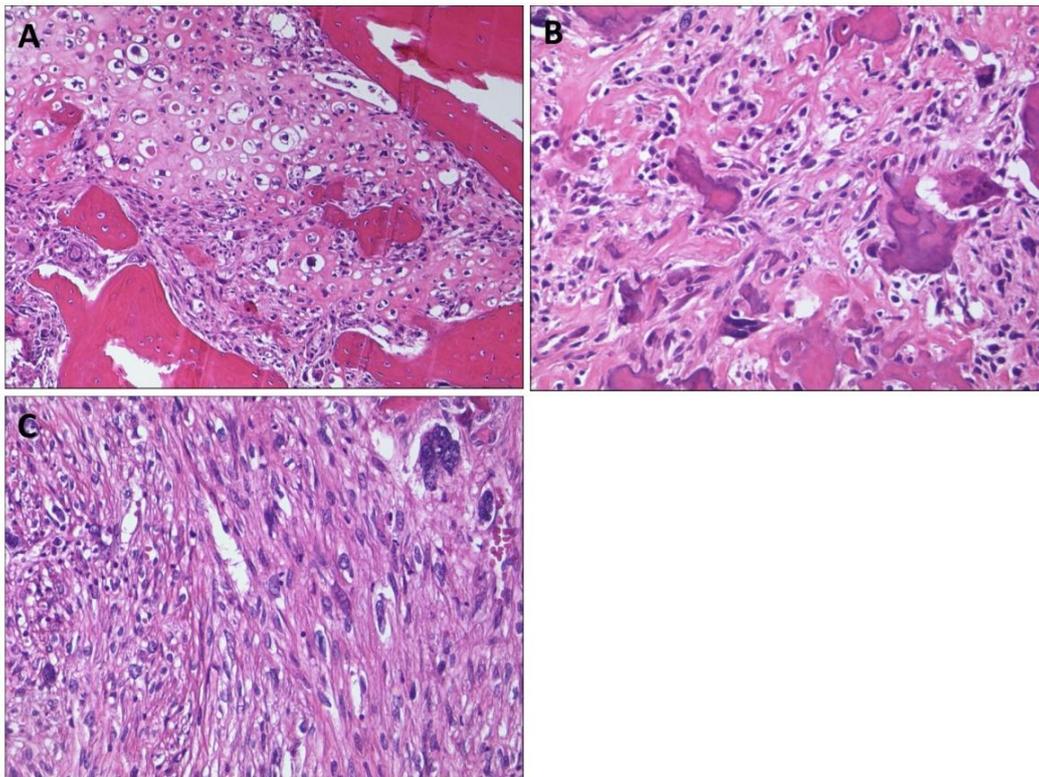


Abb.5: Histopathologische Subtypen des Osteosarkoms: chondroblastisch (A), osteoblastisch (B), fibroblastisch (C)

Als generelles Therapie-Paradigma solider Tumoren des Kindes – und Jugendalters gilt die Kombination aus neoadjuvanter Polychemotherapie, Lokalthherapie und adjuvanter Polychemotherapie. In Deutschland werden nahezu alle Kinder- und Jugendlichen mit einem Osteosarkom nach den Therapie-Empfehlungen der *European American Osteosarcoma Study (EURAMOS) Group* und deren deutschen Abteilung der Cooperative OsteoSarkom Studiengruppe (COSS) behandelt (Abb. 6). Auch hier ist neben der neoadjuvanten und adjuvanten Polychemotherapie die Lokalthherapie des Tumors von zentraler Bedeutung. Angestrebt wird in der Regel die chirurgische Tumorresektion, während aufgrund der hohen Strahlenresistenz von Osteosarkomen und des Zweitmalignomrisikos die Strahlentherapie nur nachrangig in Betracht gezogen wird. Bei inoperablen Tumoren, nach makroskopisch oder mikroskopisch inkompletter Resektion oder bei Ablehnung der Tumorresektion (z.B. bei Indikation zur Amputation) bietet jedoch auch eine Strahlentherapie die Chance auf eine lokale Langzeitkontrolle bzw. Heilung (11). Neue Methoden wie die Partikeltherapie mittels Protonen- oder Schwerionentherapie werden für die Behandlung von Sarkomen in den letzten Jahren zunehmend erprobt (12, 13). In Deutschland werden sie jedoch nur an weniger Zentren

angeboten (z.B. am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum und am Westdeutschen Protonentherapiezentrum Essen). Insbesondere von der höheren biologischen Aktivität der Partikeltherapie verspricht man sich eine effektivere Bestrahlung von Patienten mit einem Osteosarkom. Die Effektivität der Schwerionenradiotherapie mit Kohlenstoffatomen wird derzeit in der OSCAR Studie geprüft (14).

Nach Diagnosesicherung durch eine Tumorbiopsie erfolgt eine präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie mit zwei Zyklen Doxorubicin/Cisplatin und vier Zyklen Methotrexat (zusammen zwei MAP-Blöcke, Abb. 6). Der Vorteil gegenüber der primären Tumorresektion ist neben der Regression des Primärtumors die frühzeitige systemische Therapie von Mikrometastasen. Außerdem kann anhand der beobachteten Tumorregression die Wirksamkeit der Chemotherapie abgeschätzt werden. Erst anschließend sollte eine Lokalthherapie des Primärtumors und ggf. der Metastasen durchgeführt werden. Die klinische (Rückgang von Schmerzen, Überwärmung, Schwellung und Bewegungseinschränkung) und radiologische (MRT, Knochenszintigraphie, FDG-PET/CT) Untersuchung sowie die histologische Aufarbeitung des resezierten Tumors ermöglicht die Beurteilung des Ansprechens auf die neoadjuvante Chemotherapie. Postoperativ wird die Chemotherapie für mindestens 18 Wochen fortgesetzt (zwei MAP- und zwei MA-Blöcke ohne Cisplatin, Abb. 6).

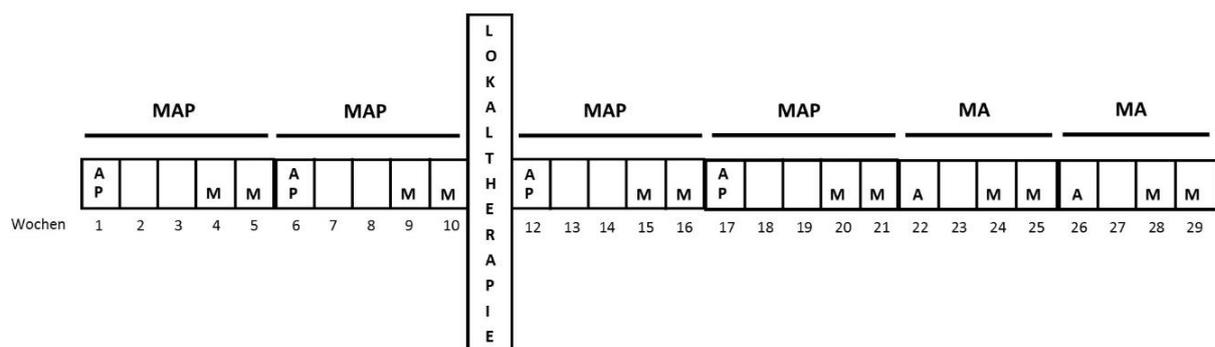


Abb.6: Therapieplan nach Empfehlung der Cooperative OsteoSarkom Studiengruppe (COSS). Die Lokalthherapie erfolgt in Form einer operativen Entfernung oder einer Bestrahlung.
A = Doxorubicin, P = Cisplatin, M = Methotrexat

In der 2011 abgeschlossenen Therapieoptimierungsstudie EURAMOS-1 der *European American Osteosarcoma Study Group* wurde die postoperative Chemotherapie je nach histologischem Ansprechen durch weitere antineoplastische Substanzen ergänzt: bei gutem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie durch Interferon- α -2b und bei schlechtem Ansprechen durch Ifosfamid/Etoposid (15). Im Rahmen der Auswertung der Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass weder die zusätzliche Interferon-Gabe (16) noch die Verwendung zusätzlicher zytostatischer Substanzen (Ifosfamid/Etoposid) einen prognostischen Vorteil bietet (17).

Im Rahmen der COSS-/EURAMOS-Studien behandelte Kinder mit nicht-metastasierten Osteosarkomen im Bereich der Extremitäten haben eine Heilungschance von 60 bis 70 %. Sehr wichtig für die Prognose ist hierbei das histologische Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. Finden sich histologisch weniger als 10 % vitale Tumorzellen (Saltzer-Kutschik-Klassifikation (SK) I-III = gutes Ansprechen), bedeutet dies eine deutlich bessere Prognose als ein schlechtes Ansprechen (> 10 % vitale Tumorzellen = SK IV-VI) (5-Jahres-Überlebensrate bei gutem Ansprechen 78 % und bei schlechtem Ansprechen 56 %) [Abb. 7 nach (18)]. Bei metastasierten Tumoren, makroskopisch inkompletter chirurgischer Resektion oder Rezidiven ist die Prognose jedoch nach wie vor sehr schlecht: bei metastasierte Tumore liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 29-32 %, bei makroskopisch inkompletter Resektion bei 16 % und im Fall von Rezidiven bei 26-32 % (18-20). Die Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit einem Osteosarkom wurde in den 1970er Jahren durch Einführung der intensiven Polychemotherapie revolutioniert. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nahezu alle Kinder mit einem Osteosarkom trotz Amputation der betroffenen Extremität an den Folgen der Fernmetastasierung verstorben. Seitdem konnte die Behandlung jedoch kaum weiter verbessert werden. Als klinisch wirksam haben sich bislang nur drei Zytostatika erwiesen: Methotrexat, Cisplatin und Doxorubicin. Zudem bleiben die Therapiemöglichkeiten bei inoperablen/metastasierten Tumoren weiterhin sehr begrenzt. Die Entwicklung von Strategien zur Optimierung der Effektivität der antineoplastischen Therapie ist daher dringend erforderlich.

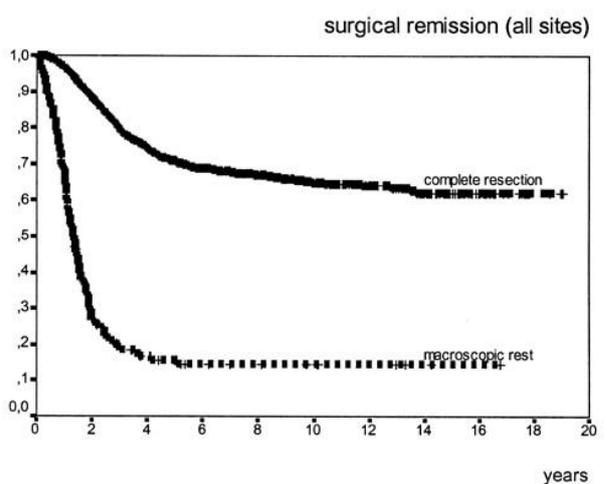
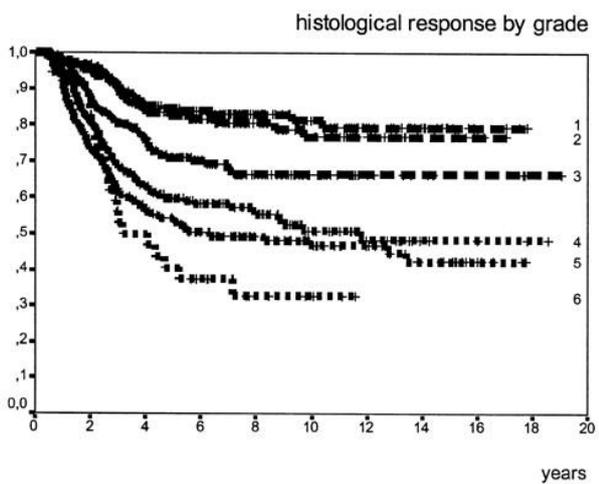
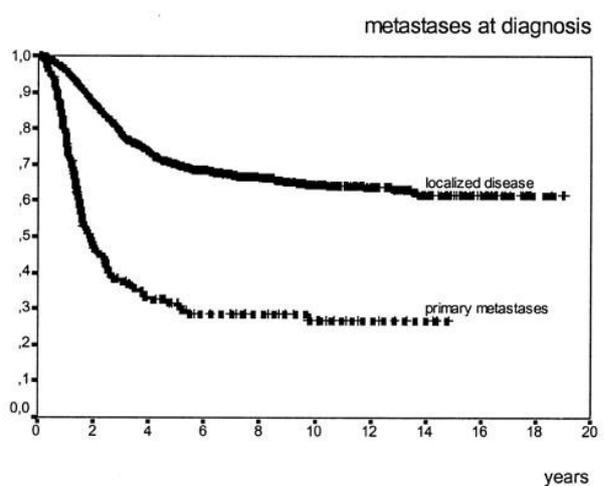
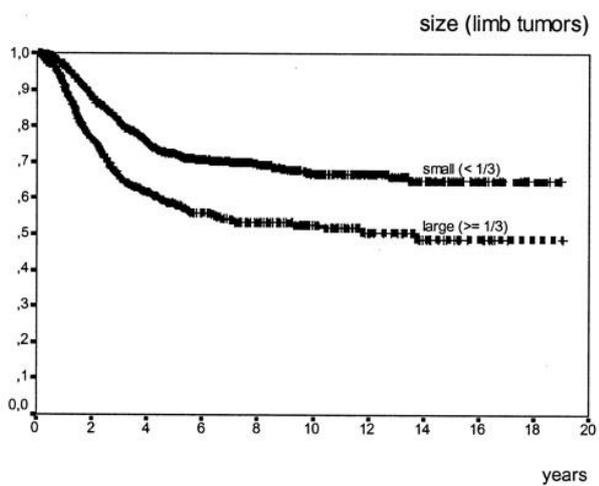
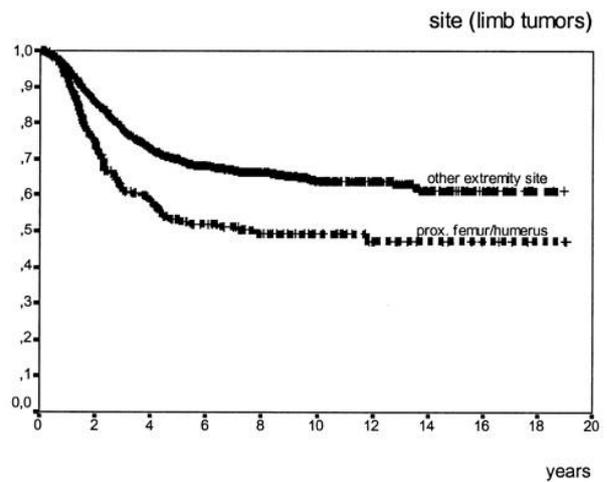
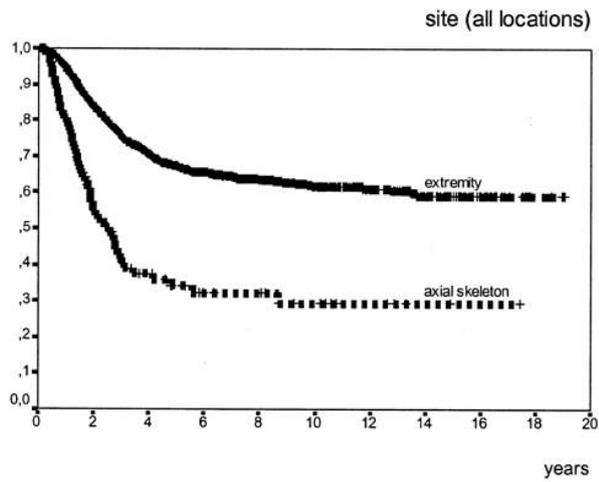


Abb.7: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für unterschiedliche prognostische Faktoren (18)

Histologische Regressionsgrade nach Salzer-Kuntzschik:

Grad 1: Keine vitalen Tumorzellen, **Grad 2:** Einzelne vitale Tumorzellen, **Grad 3:** Weniger als 10% vitales Tumorgewebe, **Grad 4:** 10-50% vitales Tumorgewebe, **Grad 5:** Mehr als 50% vitales Tumorgewebe, **Grad 6:** Komplette vitaler Tumor

Die Effektivität antineoplastischer Therapie ist verringert, wenn in Tumorzellen pro-apoptotische Moleküle gehemmt (z.B. p53-Mutation) oder anti-apoptotische aktiviert werden. Als eine vielversprechende neue Strategie zur Überwindung von Resistenz gegenüber antineoplastischer Therapie wurde in den letzten Jahren der Einsatz von *small molecules*, welche gegen zentrale Regulationsproteine der Apoptose gerichtet sind, beschrieben: SMAC *mimetics* (SM) hemmen die Wirkung der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), welche zu den wichtigsten zellulären Inhibitoren der Apoptose gehören.

Es können zwei Apoptosewege voneinander unterschieden werden: der extrinsische und der intrinsische. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden an einen *death receptor*, der zur Familie der *tumor necrosis factor receptors* gehört, initiiert. Die Rezeptorbindung von Tumornekrosefaktor- α (TNF α), *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) oder CD95-Ligand führt zur Aktivierung von Caspase 8 und 10, die wiederum die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren (21). Der intrinsische Apoptoseweg beginnt mit der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C (z.B. nach Chemotherapie oder Bestrahlung). Cytochrom C aktiviert Caspase 9, die wiederum die Effektorcaspase 3 aktiviert. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der BCL-2-Familie reguliert (22). SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*), das nach Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt wird, bindet an Mitglieder der IAP-Familie und führt somit zu einer Dysinhibition von Apoptosewegen (Abb. 8) (23).

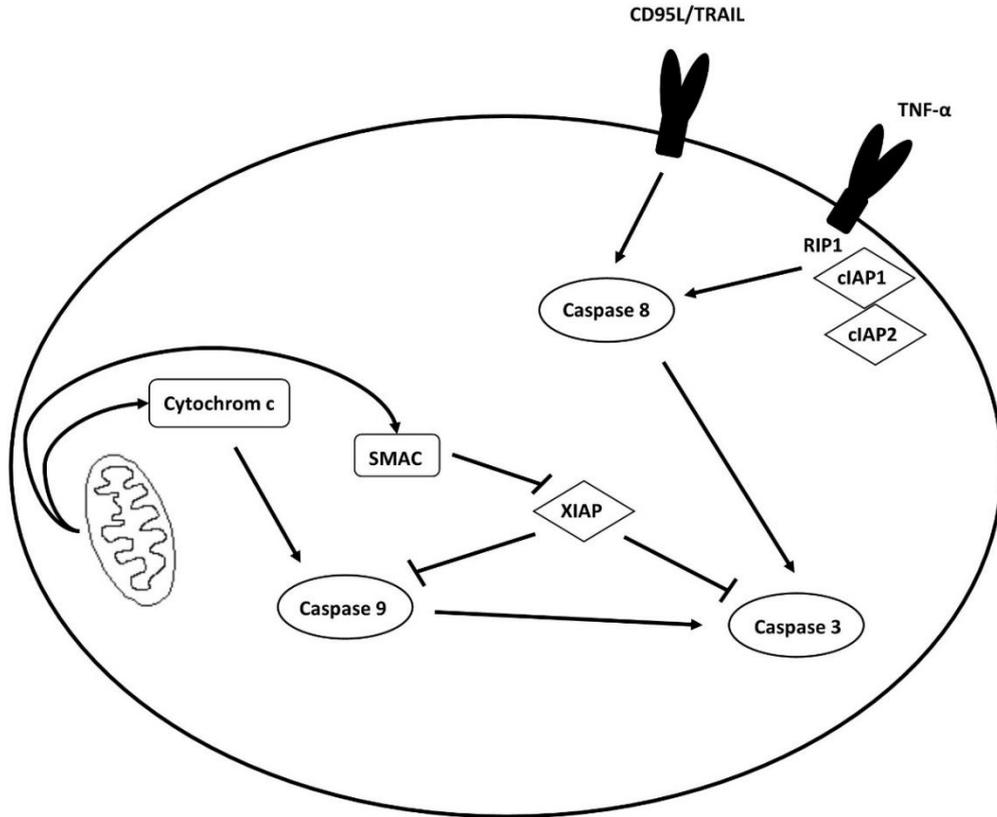


Abb. 8: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg und die Rolle von XIAP, cIAP1 und cIAP2

IAP = *Inhibitor of Apoptosis Proteins*

XIAP = *X chromosome linked IAP*

cIAP = *cellular IAP*

RIP1 = *receptor-interacting protein 1*

SMAC = *second mitochondria-derived activator of*

TNF- α = *tumor necrosis factor α*

TRAIL = *TNF- α related apoptosis inducing ligand*

CD95L = *CD95-Ligand*

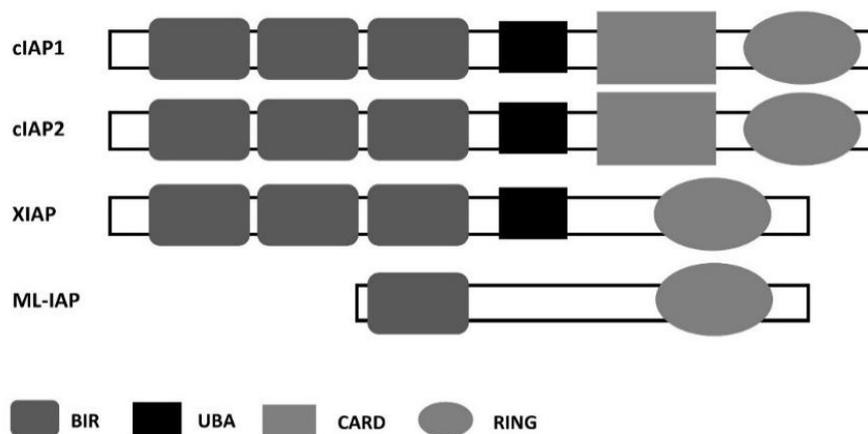


Abb. 9: Struktur der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) (modifiziert nach 25)

XIAP = *X chromosome linked IAP*

cIAP = *cellular IAP*

ML-IAP = *Melanoma IAP*

BIR = *baculoviral IAP repeat*

UBA = *ubiquitin-associated domain*

CARD = *caspase recruitment domain*

RING = *Really Interesting New Gene finger domain*

IAPs sind eine wichtige Gruppe anti-apoptotischer Moleküle, die in Tumorzellen zur Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie beitragen. Alle enthalten eine oder mehrere *baculoviral IAP Repeat*(BIR)-Domänen. *X chromosome linked IAP* (XIAP), *cellular IAP1/2* (cIAP1/2) und *Melanoma IAP* (ML-IAP) besitzen eine carboxy-terminale *Really Interesting New Gene* (RING)-Domäne, die als Ubiquitinligase fungiert (24) [Abb.9 nach (25)]. XIAP inhibiert Caspase 3, 7 und 9 durch direkte Bindung (26). Dabei spielt die Verbindungsregion zwischen BIR1 und BIR2 für die Inhibition von Caspase 3 und 7 eine wichtige Rolle (27) und die BIR3-Domäne für die Inhibition von Caspase 9 (28). XIAP gilt als das potenteste Mitglied der IAP-Familie und kann, anders als viele andere Inhibitoren der Apoptose wie Bcl-2, sowohl die Todes-Rezeptor als auch die mitochondrial-vermittelte Apoptoseaktivierung blockieren (29). Die anti-apoptotische Aktivität der cIAPs scheint deutlich komplexer: sie unterstützen das Überleben von Zellen durch Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg und können mittels ihrer E3-Ubiquitin-Ligase ihre eigenen Proteinlevel und die anderer IAPs und Caspasen modulieren (30). Die Ubiquitinierung von *receptor-interacting protein 1* (RIP1) führt zu einer verminderten Aktivierung von Caspase 8 (31). ML-IAP kann Caspase 3 und 9 durch die Bindung derer BIR-Region inhibieren, nicht jedoch Caspase 7 (32).

Die Proteine der IAP-Familie werden in vielen malignen Erkrankungen vermehrt exprimiert und sind häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert. In primären Myelomzellen konnte das Vorliegen einer XIAP-Überexpression (33), in Sternberg-Reed-Zellen (Hodgkin-Lymphom) einer cIAP2-Überexpression (34) und in Zellen Nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome einer XIAP- und Survivin-Überexpression (35) gezeigt werden. Die Überexpression von cIAP2 in Kolonkarzinomen ist mit einem frühem Rezidiv nach Fluoruracil-Chemotherapie (36) und die Überexpression von XIAP in Leukämiezellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit einer kürzeren Remissionsdauer und kürzeren Überlebenszeit assoziiert (37).

Bei Kindern und Jugendlichen mit einem Osteosarkom korreliert die zelluläre Livin/ML-IAP-Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben (38). Bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) vom T-Zell-Typ konnte eine Korrelation zwischen hohen XIAP-Expressionsleveln und einem schlechten Ansprechen auf die Prednison-Vorphase gezeigt werden (39). Kinder mit akuter myeloischer Leukämie und erhöhten XIAP-Expressionsleveln sprachen schlechter auf die Induktions-Chemotherapie an und bekamen häufiger Rezidive (40). In Neuroblastomzellen, dem häufigsten extrakraniellen

soliden Tumor im Kindesalter, zeigte sich die Expression von XIAP deutlich erhöht (41). Hieraus lässt sich ableiten, dass IAPs interessante Zielmoleküle für eine medikamentöse Therapie sind.

SMAC kann mit seiner amino-terminale Aminosäuresequenz (Ala-Val-Pro-Ile) BIR-Domänen von IAPs wie XIAP, cIAP1 und cIAP2 binden und somit deren anti-apoptotische Wirkung blockieren (27, 42, 43). Aufbauend auf diesem N-terminalen AVPI-Bindungsmotiv von SMAC wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher SM entwickelt, welche die Wirkung von SMAC nachahmen und die Blockade der Apoptose durch IAPs in Tumorzellen aufheben sollen. Der pro-apoptotische Effekt dieser SM wurde zunächst in erster Linie auf Hemmung der XIAP-vermittelten Blockade von Caspasen und einer so induzierten Aktivierung der Caspase-Kaskade zurückgeführt. SM heben durch Bindung die XIAP-vermittelte Blockade von Caspase 3, 7 und 9 auf. Sie besetzen die BIR3-Domäne von XIAP, sodass eine Bindung an Caspase 9 nicht mehr möglich ist (28). Das aktuell favorisierte Modell sieht jedoch die proteasomale Degradation von cIAPs gefolgt von der Modulation von TNF α , RIP1 und der NF κ B-Signalwege im Vordergrund [(44-47), Abb. 10 nach (48)]. Die SM-induzierte Degradierung von cIAP-1/-2 führt zu einer Blockierung des kanonischen und einer gleichzeitigen Aktivierung des nicht-kanonischen NF κ B-Signalwegs und dadurch zu einer Induktion der autokrinen TNF α -Sekretion. Die Beteiligung dieser Signalwege wird aktuell als entscheidend für eine synergistische Apoptose-Induktion von SM und Chemotherapie angesehen (48, 49). Es gibt jedoch Hinweise, dass dies kein allgemeingültiges Modell für alle Tumorentitäten darstellt und andere Signalwege (z.B. die XIAP-Inhibition) eine wichtige Rolle einnehmen können (50, 51).

Es kann zwischen monovalenten und bivalenten SM unterschieden werden. Bivalente SM bestehen aus zwei monovalenten Untereinheiten. Sie haben eine höhere Bindungsaffinität zu IAPs (52) und können durch eine gleichzeitige Bindung an XIAPs BIR2- und BIR3-Domäne eine stärkere Aktivierung von Caspase 3 bewirken (53).

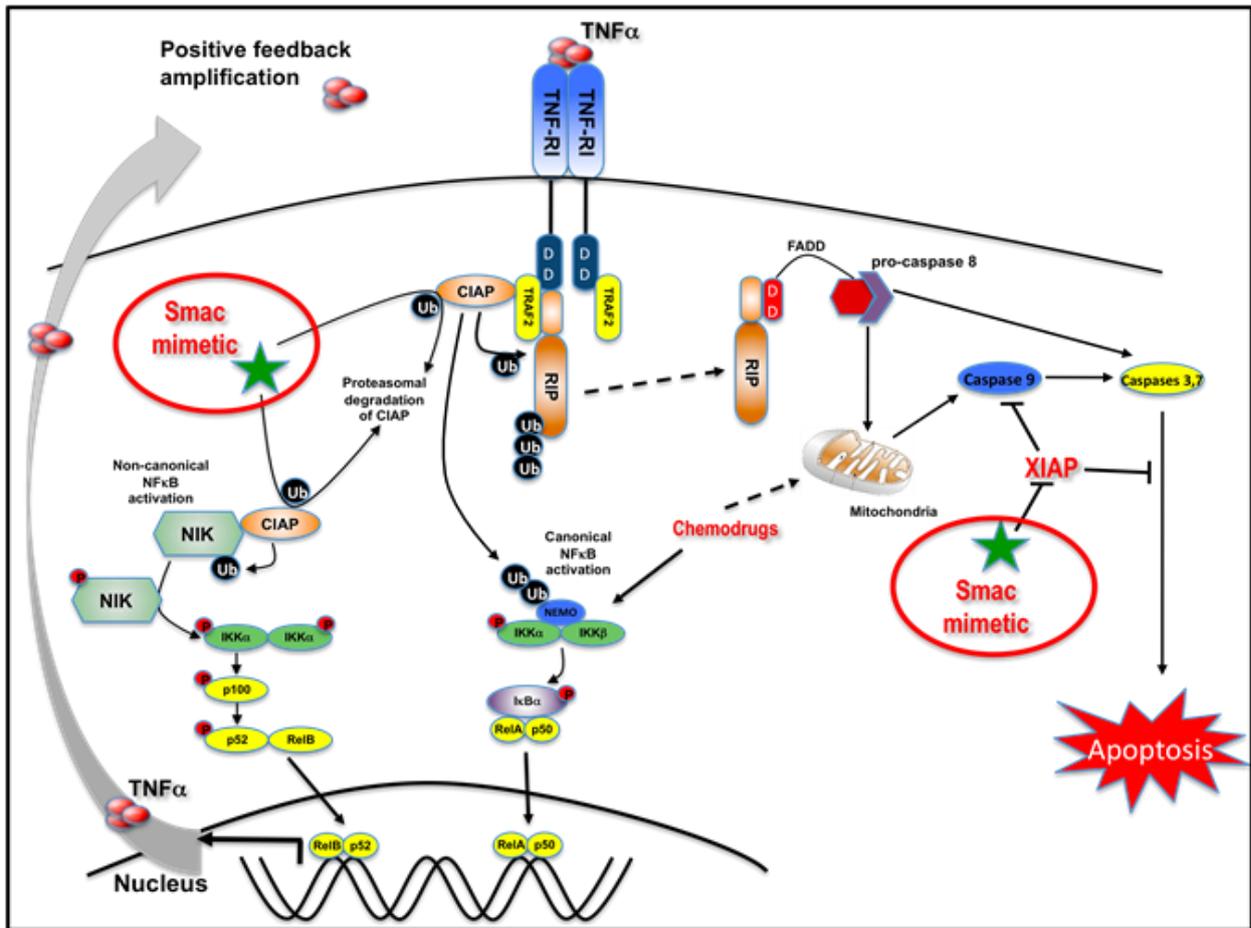


Abb. 10: Modell zum Effekt von SMAC mimetics auf die Regulation von TNF α , RIP1- und NF κ B-Signalwegen und Apoptose (modifiziert nach 48)

XIAP = X chromosome linked IAP
 cIAP = cellular IAP
 RIP1 = receptor-interacting protein 1
 SMAC = second mitochondria-derived activator of caspase

TNF- α = tumor necrosis factor α
 TNF-R1 = tumor necrosis factor receptor 1
 TRAF2 = TNF receptor-associated factor 2
 NIK = NF- κ B-inducing kinase
 NF κ B = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

In präklinischen Studien konnte eine Sensitivierung von Tumorzellen für Chemo- und Strahlentherapie durch SM gezeigt werden (Tab. 2).

Tab. 2: Auswahl präklinischer Studien mit *SMAC mimetics*

<i>SMAC mimetic</i>	Tumorentität	verstärkte Chemo-/ Strahlentherapie	Artikel
Debio 1143	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs	Strahlentherapie	(54)
SM-164	Mammakarzinomzellen	Strahlentherapie	(55)
BV6	Pankreaskarzinomzellen	Gemcitabin, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid	(56)
LBW242	Neuroblastomzellen	Doxorubicin, Vincristin	(41)

Seit mehreren Jahren wird in klinischen Phase-I/II-Studien der Effekt von SM bereits bei Malignomen des Erwachsenenalters getestet. Monovalente SM wie GDC-0917/CUDC-427 (Genentech, Inc./Curis), LCL161 (Novartis), and AT-406 (Ascenta Therapeutics) bieten dabei den Vorteil, dass sie oral verabreicht werden können. Dabei ist das SM LCL161 eine häufig eingesetzte Substanz (Tab. 3) (57). Bisher wurden keine klinischen Studien zum Effekt von SM bei pädiatrisch-onkologischen Erkrankungen initiiert.

Zusammenfassend könnten SM daher vielversprechende Kandidaten für eine Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Chemo- und Strahlentherapie sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgenden Hypothesen geprüft werden:

1. In Osteosarkomzellen liegt eine Überexpression von IAPs (als Zielstrukturen der SM) vor.
2. Die Therapie mit LCL161 führt zu pro-apoptotischen Effekten *in vitro* und *in vivo*.
3. Die Effekte einer Chemotherapie und/oder Strahlentherapie können durch die Kombination mit LCL161 *in vitro* und *in vivo* verstärkt werden.

Langfristig sollen diese Untersuchungen dazu beitragen, die Strahlentherapieresistenz von Osteosarkomen zu durchbrechen und die Effektivität der Chemotherapie zu steigern, um damit das Überleben von Kindern mit Osteosarkomen verbessern zu können.

Tab. 3: Klinische Studien mit LCL161 nach ClinicalTrials.gov (Stand 05/2017)

Kombination	Tumorentität	Dosis	Phase I/II	Ergebnis	Studie
+ Paclitaxel	Solide Tumoren bei japanischen Patienten	1/Woche: Steigerung	Phase I	Rekrutierung abgeschlossen	NCT01968915
+ Pacitaxel	Solide Tumoren	1/Woche: Steigerung	Phase I	Rekrutierung abgeschlossen	NCT01240655
keine	Myelofibrose	1/Woche: 1500 mg per os	Phase II	Rekrutierung bis 12/2017	NCT02098161
+/- Cyclophosphamid	Multiples Myelom	Keine Angaben	Phase II	Rekrutierung bis 03/2016	NCT01955434
+ Paclitaxel	Solide Tumoren	1/Woche: Steigerung	Phase I	Rekrutierung abgeschlossen	NCT01240655
keine	Solide Tumoren	1/Woche: Tablette vs. Suspension, 2/Tag an vier Tagen/Woche	Phase I	Rekrutierung abgeschlossen	NCT01098838
+ Gemcitabin + Paclitaxel	Metastasierte Pankreastumoren	1/Woche: 600, 1200, 1800 mg per os	Phase I	Rekrutierung offen	NCT01934634
+ Paclitaxel	Mamma-Karzinom	1/Woche, 1800 mg per os	Phase II	Rekrutierung abgeschlossen	NCT01617668
+ Topotecan	kleinzelliges Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom	1/Woche, max. 1200 mg per os	Phase I/II	Rekrutierung offen	NCT02649673
+ PDR001 (Anti-PD1 antibody)	Multiples Myelom	keine Angaben	Phase I	noch keine Rekrutierung	NCT03111992
+ PDR001	Kolonkarzinom Mammakarzinom Bronchialkarzinom	keine Angaben	Phase I	Rekrutierung offen	NCT02890069

2. Methodik

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
complete Mini (10x)	Roche, Rotkreuz, Risch, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco life technologies, Carlsbad, CA, USA
Glycerin (Glycerol)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (fettarm)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
nonyl phenoxypropylpolyethoxyethanol (NP-40), Tergitol®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco life technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS-Dulbecco (1x, 10x)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin
Phosphatase Inhibitoren (100x)	Serva, Heidelberg
Propidiumiodid (PI)	Gibco life technologies, Carlsbad, CA, USA
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
SDS (Roti®-Stock 20%)	Roth, Karlsruhe
TEMED (99%)	Roth, Karlsruhe
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	PromoKine, Heidelberg
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,25%)	Gibco life technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2. Kits und Standards

Annexin V FITC Assay	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel AG, Oensingen
peqGOLD, Proteinmarker VI	PeqLab, Erlangen
Pierce BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Oligo(dT)20 Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
dNTP Mix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bestrahlungsgerät (Typ OB 29/9203-10, Radionuklid Cs-137)	Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA
Brutschrank Cytoperm™ 2 CO2 Gassed Incubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ChemiDoc MP	BioRad, Hercules, CA, USA
Epoch Microplate Spectrophotometer	BioTek, Winooski, USA
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
FACSCalibur®	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage Kern ABS	Kern, Schifferstadt
Heizblock ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer RH basic	IKA, Staufen
Mini-PROTEAN® Tetra cell	BD Falcon, Heidelberg
NanoDrop 3300 Fluorospectrometer	NanoDrop products, Wilmington, DE, USA
Nitrozellulose-Membran Trans-Blot® Transfer Medium (0,45 µm)	BioRad, Hercules, CA, USA
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument, Garbsen
Short Plates	BioRad, Hercules, CA, USA
Spacer Plates With 1.0 mm Integrated Spacers	BioRad, Hercules, CA, USA
Sterilbank Heraeus Laminair	Holten
StepOnePlus™ System	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Transblot Turbo	BioRad, Hercules, CA, USA
Zellkulturartikel	BD Falcon, Heidelberg
Zellzählkammer Neubauer	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Zentrifuge Hettich Rotanta 460R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg

2.4. Puffer und Lösungen

Annexin V/PI-Lösung (pro 24 well)	100 µl Annexinbindungspuffer 2,5 µl Annexin V 4 µl Propidiumiodid (50 µg/ml)
Laemmli-Probenpuffer (5x)	60 mM Tris-HCl (pH 6,8) 10 % SDS 50 % Glycerol 10 % Mercaptoethanol 1,5 % Bromphenolblau
1x PBST	100 ml 10x PBS (1 % Tween) ad 1 l Aqua dest.
Ripa-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 7.6 150 mM NaCl 1 % NP-40 1 % sodium deoxycholate 0,1 % SDS
Sammelgelpuffer	pH 6,8 0,5 M Tris 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,01 % SDS
Towbin-Transferpuffer	25 mM Tris base 192 mM Glycin 20 % Methanol
Trenngelpuffer	pH 8,8 1,5 M Tris 0,4 % SDS

2.5. Western-Blot-Antikörper

2.5.1. Primärantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
Mouse Anti-XIAP	BD Biosciences	1:1000
Goat Anti-clAP1	R&D Systems	1:500
Mouse Anti-clAP2	R&D Systems	1:250
Mouse Anti-Rip1	BD Biosciences	1:2000
Rabbit Anti-β-actin	Sigma-Aldrich	1:7500

2.5.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
Donkey Anti-goat	Jackson	1:5000
Sheep Anti-mouse	GE healthcare	1:5000
		1:2500 für clAP2
Donkey Anti-rabbit	GE healthcare	1:5000

2.6. Chemotherapeutika und LCL161

Doxorubicin	Apotheke, Charité
Methotrexat	Apotheke, Charité
Cisplatin	Apotheke, Charité
Vincristin	Apotheke, Charité
LCL161	Novartis, Basel, Schweiz

2.7. Inhibitoren

Humira (Adalimumab)	AbbVie, North Chicago, Illinois, USA
Necrostatin-1	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Kanada
PBS-1086	Profectus BioSciences Inc., Tarrytown, NY, USA

2.8. siRNAs, Antisense-Oligonukleotide und Transfektionsreagenz

2.8.1. siRNAs und Antisense-Oligonukleotide

Ziel-RNA	Name	Firma	Sequenz/Strukturformel
cIAP1	ON-TARGETplus SMARTpool, Human BIRC2 (cIAP1)	GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA	J-004390-12: UCGCAAUGAUGAUGUCAAA
			J-004390-13: GAAUGAAAGGCCAAGAGUU
			J-004390-14: GAAUGCUGCGGCCAACAU
			J-004390-15: UAUAGGACCUGGAGAUAGG
RIPK1	ON-TARGETplus SMARTpool, Human RIPK1	GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA	J-004445-07: CCACUAGUCUGACGGAUAA
			J-004445-08: UGAAUGACGUCAACGCAA
			J-004445-09: GCACAAAUACGAACUUCAA
			J-004445-10: GAUGAAAUCCAGUGACUUC
Non-targeting	ON-TARGETplus Non-targeting Pool, D-001810-10-05	GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA	
XIAP	AEG 35156	Aegera Therapeutics, Montreal, Québec, Kanada	$C_{188}H_{225}N_{65}O_{104}S_{18}P_{18}Na_{18}$
Non-targeting	AEG 35187	Aegera Therapeutics, Montreal, Québec, Kanada	

2.8.2. Transfektionsreagenz

Oligofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
---------------------	--

2.9. Taqman-Sonden

XIAP	Hs01597783_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt
clAP1	Hs00169407_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt
Rip	Hs 01112284_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt
GAPDH	Hs 99999905_m1	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.10. Zellen und Zelllinien

Die Zelllinie 143B stammt aus dem Tumor einer 13-jährigen Osteosarkompatientin. Die Zelllinie ist Thymidinkinase negativ. Die 143B-Zellen werden in RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% P/S kultiviert und 2x/Woche 1:20 mit 0,25% Trypsin-EDTA gesplittet. Die Zellen wurden freundlicherweise von der AG Integrative Medizin (Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie Saos-2 stammt aus dem Tumor einer 11-jährigen Osteosarkompatientin. Der Tumor wurde mit RTG, Methotrexat, Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid und Aramycin-C behandelt. Die Saos-2-Zellen werden in RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% P/S kultiviert und 2x/Woche 1:4 mit 0,25% Trypsin-EDTA gesplittet. Die Zellen wurden freundlicherweise von der AG Integrative Medizin (Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.11. Behandlung mit Chemo-/Radiotherapie in Kombination mit LCL161

Die Zellen werden 24 Stunden vor der Behandlung ausplattiert: die 143B-Zellen 1×10^4 Zellen pro 24 well und die Saos-2-Zellen 3×10^4 Zellen pro 24 well. Am Behandlungstag werden ein Mediumwechsel und die Applikation unterschiedlicher Chemo-, Bestrahlungs- bzw. LCL161-Dosen durchgeführt. Die Auswertung des Versuchs erfolgt 48 Stunden später mittels Durchflusszytometrie. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

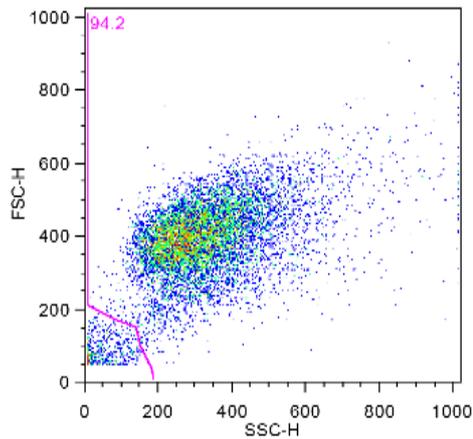
2.12. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell scan = FACS*)

Zur Vorbereitung der FACS-Messung werden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, 2 min mit 0,25 % Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend in Medium aufgenommen. Das gesamte Medium sowie das PBS werden gesammelt und 5 min mit 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in gekühltem PBS aufgenommen. Für die Annexin V/Propidiumiodid(PI) -Färbung werden die Zellen nochmals 5 min mit 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert, in Annexin V/PI-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert.

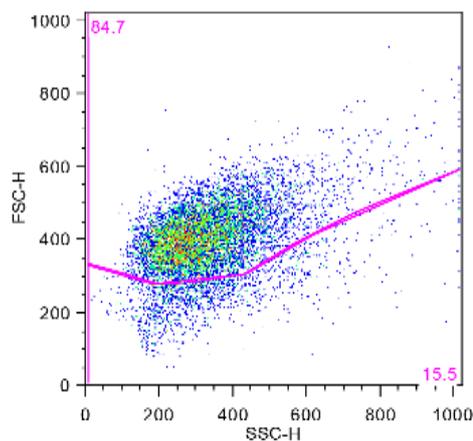
Die Messung erfolgt am FACSCalibur mit dem Programm Cellquest und die Auswertung mit FlowJo (Abb. 11). Es werden 1×10^4 Zellen gemessen. In einem ersten Schritt wird der Zelldébris ausgeschlossen (Abb. 11A). Anschließend werden eine vitale und eine apoptotische Population voneinander abgegrenzt (Abb. 11B/C). In der Auswertung der Annexin V/PI-gefärbten Zellen werden alle Annexin V-positiven Zellen als apoptotisch gewertet.

Dabei befinden sich Annexin-V-positive und Propidiumiodid-negative Zellen in einem frühen Apoptosestadium. Zu diesem Zeitpunkt wird das Phospholipid Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran exprimiert, sodass Annexin V an diese Zellen binden kann. Annexin-V- und Propidiumiodid-positiv gefärbte Zellen befinden sich in einem späteren Apoptosestadium, in dem die Membranintegrität nicht mehr besteht und die Zellmembran somit durchlässig für Propidiumiodid ist. (Abb. 11C)

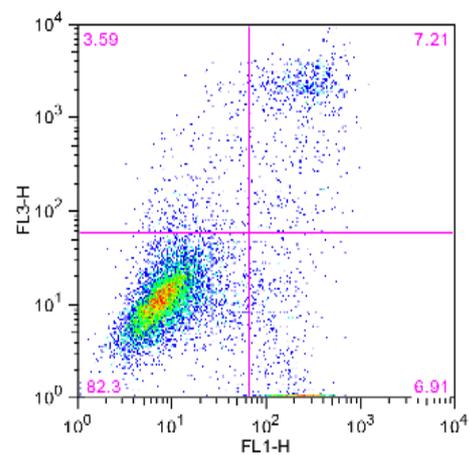
Mittels *forward scatter (FSC)* lässt sich die Größe der Zellen und mittels *sideward scatter (SSC)* die Granularität der Zellen beurteilen. Während der Apoptose nimmt die Größe der Zellen ab und die Granularität zu, sodass sich auch mittels FSC/SSC apoptotische von vitalen Zellen abgrenzen lassen. (Abb. 11B)



Ungated
150212 143b 0 M 20 L 1
Event Count: 10000



cells - débris
150212 143b 0 M 20 L 1
Event Count: 9421



cells - débris
150212 143b 0 M 20 L 1
Event Count: 9421

Abb. 11: Auswertung der Durchflusszytometrie mittels FlowJo. Exklusion des Zelldébris (A), anschließend Trennung der vitalen und apoptotischen Population mittels FSC/SSC (B) oder Trennung der vitalen und apoptotischen Population mittels AnnexinV/PI-Färbung (C)

FSC/SSC = forward scatter/sideward scatter
PI = Propidiumiodid

2.13. Proteinextraktion mittels RIPA-Puffer

Das Zellpellet wird in 50-80 µl RIPA-Puffer gelöst, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min mit 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält das Proteinextrakt.

2.14. Protein-Bestimmung mittels Pierce BCA Protein Assay kit

Zunächst wird eine BSA-Verdünnungsreihe angefertigt. Diese Standardreihe wird zur Kalibrierung des Geräts benötigt. 10 µl einer Probe werden mit 200 µl BCA Working Reagent (1 ml Reagent A + 200 µl Reagent B) 30 min bei 37°C inkubiert. Die zu messenden Proteinextrakte werden 1:5 verdünnt. Die Messung erfolgt bei 562 nm mit einem Epoch Microplate Spectrophotometer und dem Programm Gen5.

2.15. Western Blot

2.15.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

Tab. 4: Gelzusammensetzung für die Gelelektrophorese

Für 6 Gele	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
Aqua dest.	9,5 ml	9,2 ml
Acrylamid (30%)	10,8 ml	2 ml
Trenngelpuffer	6,8 ml	
Sammelgelpuffer		3,75 ml
APS	108 µl	60 µl APS
TEMED	24 µl	30 µl APS

Zunächst wird das Trenngel bis auf die Höhe von 4/5 in die abgedichtete *spacer-plate-short-plate*-Kombination gegossen und mit Isopropanol bedeckt. Sobald die Polymerisation abgeschlossen ist, wird das Isopropanol abgegossen, der verbleibende Platz zwischen den Glasplatten mit dem Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm eingeführt. Die Gele werden in der Elektrophoresekammer platziert und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. 20 µg Protein (bzw. 40 µg für cIAP2) werden auf 10 µl mit aqua dest. aufgefüllt. Den Proben wird Laemmli-Probenpuffer hinzugefügt und das Gemisch 5 min bei 90°C inkubiert. Nach Befüllung der Taschen mit Proteinleiter und Proben werden die Gele mit 100 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel laufen gelassen.

2.15.2. *Semi-dry-blot*

Filterpapiere und Nitrozellulose-Membranen werden 5 min in Towbin-Transferpuffer eingelegt, die Gele vom Sammelgelanteil befreit und kurz in Transferpuffer gewaschen. Der *semi-dry-blot* wird wie in Abb. 12 dargestellt aufgebaut und 30 min bei 25 V im Transblot Turbo geblottet. Die Qualität des *blots* wurde mittels Ponceau-Färbung kontrolliert.

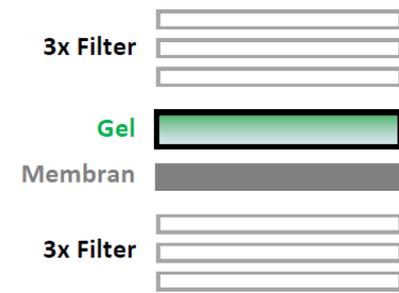


Abb. 12: Aufbau des *Semi-dry-blots*

2.15.3. Antikörper-vermittelter Proteinnachweis

Die Membranen werden für 1 h in Roti-Block (bzw. 5% Milch in PBST für cIAP2) geblockt, über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert, dreimal 5 min in PBST gewaschen, 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und nochmals in PBST gewaschen. Die Membranen werden in einer Folie 30 sec mit 200 µl Super Signal West Dura Extended Duration Substrate inkubiert und anschließend Bilder mit einem ChemiDoc MP und ImageLab aufgenommen.

2.16. Transfektion von siRNAs und Antisense-Oligonukleotiden

Der *knock down* in Saos-2-Zellen wird mittels des lipid-basierten Transfektionssystems Oligofectamine 2000 durchgeführt. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit einer siRNA-Endkonzentration von 200 nM. Im letzten Schritt wird das serumfreie Medium nach 5 h nicht durch Medium mit höherprozentigem FKS ergänzt, sondern durch RPMI 1640 mit 10 % FKS und 1 % P/S ersetzt.

2.17. RNA-Extraktion

Die RNA-Extrakte werden nach Angaben der Hersteller mit dem NucleoSpin® RNA kit gewonnen und die Konzentration per NanoDrop 3300 Fluorospectrometer gemessen.

2.18. Reverse Transkription

Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgt mittels der SuperScript® III Reverse Transcriptase sowie Oligo-dT-Primern und einem dNTP Mix bestehend aus vier Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Der Ansatz wird in Tab. 5/6 beschrieben im Eppendorf Mastercycler durchgeführt.

Tab. 5: Pipettierschema für die Reverse Transkription

	Volumen (μ l) pro Probe
RNA	Entsprechend 1 μ g
dNTP Mix (10 mM)	1
Oligo-(dT)20 (50 μ M)	1
Aqua dest.	Ad 12 μ l

	Volumen (μ l) pro Probe
Mastermix	
5xPuffer	4
DTT (0,1M)	1
SuperScript® III Reverse Transcriptase (200U/ μ l)	1
Gesamtvolumen	6

Tab. 6: Temperaturverlauf für die Reverse Transkription

65 °C	5 min
Auf Eis	1 min
Zentrifugieren und Mastermix dazu	
50 °C	60 min
70 °C	15 min
4 °C	Lagerung

2.19. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

Für die Real-time PCR werden Taqman-Sonden und TaqMan® Gene Expression Master Mix benutzt. Der Ansatz wird wie in Tab. 7/8 beschrieben im StepOnePlus™ System und mit Hilfe der StepOne™ Software durchgeführt.

Tab. 7: Pipettierschema für die Real-time PCR

	Volumen (µl) pro Probe
Aqua dest.	5,75
Assay (20x)	0,75
Mastermix	7,5
cDNA	1
Gesamtvolumen	15

Tab. 8: Temperaturverlauf für die Real-time-PCR

		StepOnePlus			
Ramp					
Speed:	50°C	2 min	Hold		
Fast	95°C	10 min	Hold		
	95°C	15 sec			
	60°C	1 min	40 cycles	Messung	

2.20. Mausversuche

Die Mausversuche wurden mit weiblichen NOD/SCID/IL2rg-Mäusen durchgeführt. Diesen wurden jeweils $1 \cdot 10^7$ Saos-2-Zellen subkutan appliziert (Tag 1). Es gab 4 Gruppe à 7 Tieren: NaCl (Kontrollgruppe), LCL161, Doxorubicin, Doxorubicin + LCL161. Die Gabe von LCL161 erfolgte dreimal wöchentlich über 2 Wochen per os. Die Gabe von Doxorubicin erfolgte einmal wöchentlich intraperitoneal über 2 Wochen.

Die Versuche wurden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes von der *Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH* durchgeführt, nachdem sie vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt worden waren. Die Versuche wurden in Kooperation mit der AG Integrative Medizin (Charité) geplant.

2.21. Statistische Auswertung

Die Auswertung der quantitativen Realtime-PCR erfolgt mittels delta-delta-CT-Methode und T-Test für ungepaarte Stichproben.

Um festzustellen, ob es sich bei den Effekten der Kombination von LCL161 und Chemotherapie, um synergistische Effekte handelt werden *combination indices* (CI) nach der Chou-Talalay-Methode berechnet (58). Dabei bedeutet $CI < 1$ einen synergistischen, $CI = 1$ einen additiven und $CI > 1$ einen antagonistischen Effekt. Die CIs werden nach folgender Formel berechnet: $CI = (d1/D1) + (d2/D2)$, dabei stellen D1 und D2 die erforderliche Konzentration von Substanz 1 und 2 dar, um 50 % Effekt zu erzielen und d1 und d2 die erforderlichen Konzentrationen von Substanz 1 und 2 dar, um 50 % Effekt in Kombination zu erzielen. Die Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC50) erfolgt mittels GraphPad Prism in folgenden Schritten: *Transform* ($x=\log(x)$), *Normalize*, *Nonlin Fit (variable slope)*.

Aufgrund der geringen Apoptose-Induktion durch die Strahlentherapie allein konnten für die Kombination aus LCL161 und Strahlentherapie keine *combination indices* (CI) nach der Chou-Talalay-Methode berechnet werden. Die Auswertung erfolgte mittels T-Test für ungepaarte Stichproben wie folgt: $(R + LCL) - LCL_{0 Gy}$ im Vergleich zu $R_{0 \mu M LCL} - Grundapoptose$. Dabei stellt $R + LCL$ den Effekt von Bestrahlung in Kombination mit LCL161, $LCL_{0 Gy}$ den Effekt von LCL161 allein und $R_{0 \mu M LCL}$ den Effekt der Bestrahlung allein dar.

Die Auswertung der Mausversuche, Inhibitor- und *knockdown*-Experimente wurde mittels T-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Überexpression von *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) in Osteosarkomzellen

Der erste Schritt, um einzuschätzen, ob *SMAC mimetics* (SM) potentiell wirksame Medikamente für Osteosarkome sein könnten, war der Nachweis der Expression von IAPs in Osteosarkomzellen. Dafür konnte auf gefärbte Tumorbiopsieschnitte von Osteosarkompatienten des Instituts für Pathologie der Charité zurückgegriffen und eine deutliche Expression von XIAP festgestellt werden (Abb. 13A). Darüber hinaus konnte mittels *Western Blot* die Überexpression von XIAP in 143B-Zellen im Vergleich zu Kontrollzelllinien (Osteoblasten, pulmonale Fibroblasten) gezeigt werden (Abb. 13B). Daraus lässt sich ableiten, dass sich SM bei Osteosarkomzellen als wirksam erweisen könnten.

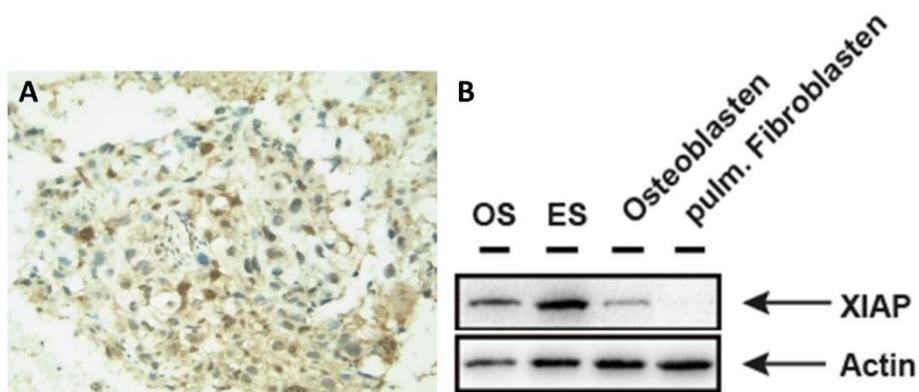


Abb. 13: Überexpression von XIAP in Osteosarkomzellen: Immunhistochemischer Nachweis von XIAP in der Tumorbiopsie eines Osteosarkoms (A) und Überexpression von XIAP in einer Osteosarkomzelllinie (OS, 143B-Zellen) im Vergleich zu Kontrollzelllinien (Osteoblasten, pulmonale Fibroblasten) (B)

XIAP = X chromosome linked IAP
IAP = inhibitor of apoptosis protein
ES = Ewingsarkomzelllinie C433

3.2. Der Effekt von *SMAC mimetic* LCL161 auf 143B- und Saos-2-Zellen

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Behandlung mit dem SM LCL161 in 143B- und Saos-2-Zellen zu pro-apoptotische Effekten führt. Die Titrationsreihen zeigten für beide Zelllinien erst im hohen μM -Bereich eine relevante Apoptose-Induktion (Abb. 14). Dementsprechend kann von einer SM-Resistenz von Osteosarkomzellen ähnlich wie bei ALL- und Neuroblastomzellen ausgegangen werden (39, 41).

Zudem konnten möglichen Konzentrationen für eine Kombination mit Strahlen-/ Chemotherapie festgelegt werden. Diese wurden in einem Bereich von 5-10 % Eigeneffekt ausgewählt.

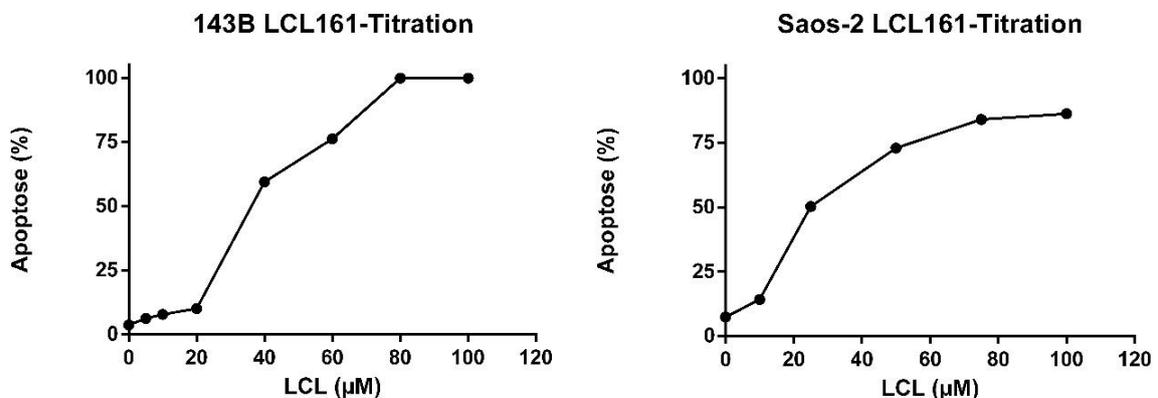


Abb. 14: Effekt von *SMAC mimetic* LCL161 auf 143B- und Saos-2-Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.

3.3. Effekte von *SMAC mimetic* LCL161 in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie in Osteosarkomzellen *in vitro*

3.3.1. Effekte von *SMAC mimetic* LCL161 in Kombination mit Strahlentherapie in Osteosarkomzellen *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das SM LCL161 bei den Osteosarkomzelllinien 143B und Saos-2 erst in hohen Dosen zu pro-apoptotischen Effekten führt, sollte nun überprüft werden, ob bei diesen Zelllinien Effekte einer Strahlentherapie durch LCL161 verstärkt werden können. Dafür wurden die Zellen zunächst mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen in Kombination mit LCL161 behandelt (Abb. 15A/B). Die Behandlung mit LCL161 erfolgte 3 h vor der Bestrahlung, mit der Idee die Blockierung der Apoptosewege schon vor der Bestrahlung zu vermindern. Hierbei zeigte sich keine relevante Apoptose-Induktion durch die Bestrahlung allein und eine nur geringe Apoptose-Induktion durch LCL161 allein. In Kombination konnte jedoch für beide Zelllinien eine signifikante Verstärkung der Strahlentherapie-Effekte durch LCL161 für alle getesteten Bestrahlungsdosen festgestellt werden (143B-Zellen: 2 Gy $p = 1,7 \times 10^{-2}$; 4 Gy $p = 2,3 \times 10^{-2}$; 6 Gy $2,1 \times 10^{-3}$; 8 Gy $p = 1,4 \times 10^{-2}$; Saos-2: 1 Gy $p = 1,9 \times 10^{-3}$; 2 Gy $p = 2,3 \times 10^{-4}$; 4 Gy $p = 2,2 \times 10^{-4}$, 6 Gy $p = 2,4 \times 10^{-4}$). Aufgrund der Ergebnisse der statistischen Auswertung kann von einer Sensitivierung von 143B- und Saos-2-Zellen für Strahlentherapie mittels LCL161 ausgegangen werden. Dabei zeigte sich für beide Zelllinien eine maximale Verstärkung bei 6 Gy, sodass weitere Versuche bei dieser Bestrahlungsdosis durchgeführt wurden.

Anschließend wurden die Effekte einer Kombinationstherapie mit unterschiedlichen LCL161-Konzentrationen (Abb. 15C/D) und zu unterschiedliche Behandlungszeitpunkten mit LCL161 (Abb. 15E) ermittelt. Dabei wurden folgende LCL161-Konzentrationen ausgewählt: 20 μM für die 143B-Zellen und 5 μM für die Saos-2-Zellen. Eine längere Exposition der OS-Zellen mit LCL161 vor Bestrahlung (24 h vs. 3 h) führte nicht zu einer relevanten Verstärkung der SM-Effekte, sodass der Zeitpunkt der Behandlung mit LCL161 bei 3 h vor Bestrahlung belassen wurde.

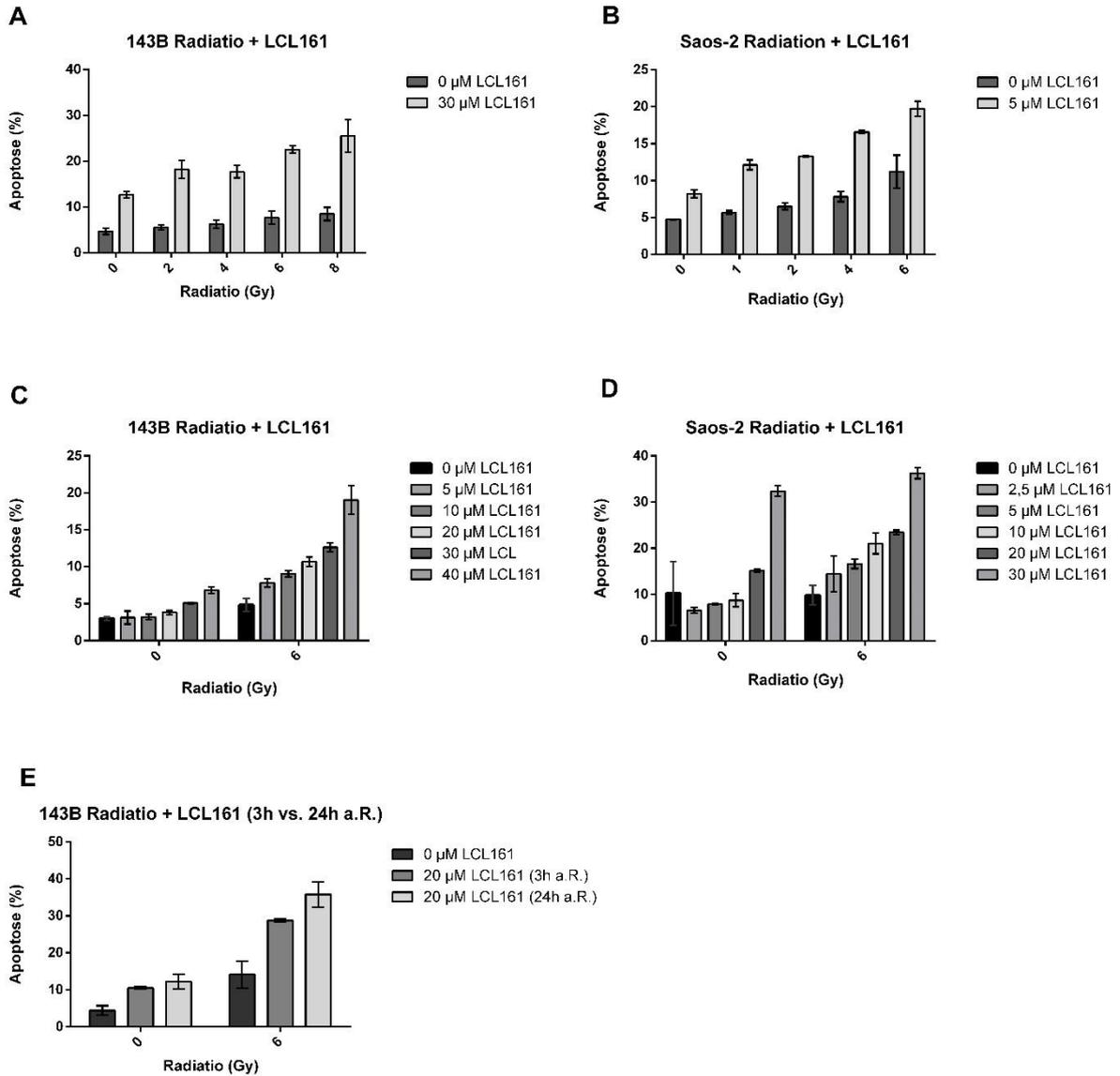


Abb. 15: Sensitivierung von 143B- und Saos-2-Zellen für Bestrahlung mittels des SMAC mimetic LCL161
 Die durchflusszytometrische Analyse wurde teils mittels Annexin V/PI (143B unterschiedliche Bestrahlungsdauer, 30 μ M LCL) teils mittels forward scatter/sideward scatter (restliche Daten) durchgeführt.
 a. R. = ante radiatio

3.3.2. Effekte von *SMAC mimetic* LCL161 in Kombination mit Chemotherapie in Osteosarkomzellen *in vitro*

In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob bei OS-Zellen auch Effekte einer Chemotherapie durch LCL161 verstärkt werden können. Dazu wurden die Effekte einer Kombination von LCL161 mit den drei Zytostatika der Standardchemotherapie Doxorubicin, Methotrexat und Cisplatin untersucht. Zudem hatte sich die Kombination von LCL161 und Vincristin in anderen Tumorentitäten, z.B. Neuroblastomzellen, als besonders effektiv erwiesen (41), sodass diese Kombination auch für OS-Zellen zusätzlich untersucht wurde.

Für die 143B-Zellen zeigte sich durch LCL161 eine Verstärkung der pro-apoptotischen Effekte von Methotrexat, Doxorubicin und Vincristin (Abb. 16). Dabei konnten für die Kombinationen von LCL161 mit Doxorubicin [*combination indice* (CI) 0,70] und Vincristin (CI 0,67) synergistische Effekte (CI < 1) nachgewiesen werden.

Für die Saos-2-Zellen zeigte sich mittels LCL161 eine deutliche Verstärkung der Effekte von Vincristin, Doxorubicin und Cisplatin (Abb. 17). Dabei konnten für diese Kombinationen von LCL161 mit Doxorubicin (CI 0,37), Vincristin (CI 0,60) und Cisplatin (CI 0,48) synergistische Effekte nachgewiesen werden.

Beide untersuchten Osteosarkomzelllinien ließen sich durch das SM LCL161 für Doxorubicin und Vincristin sensitivieren.

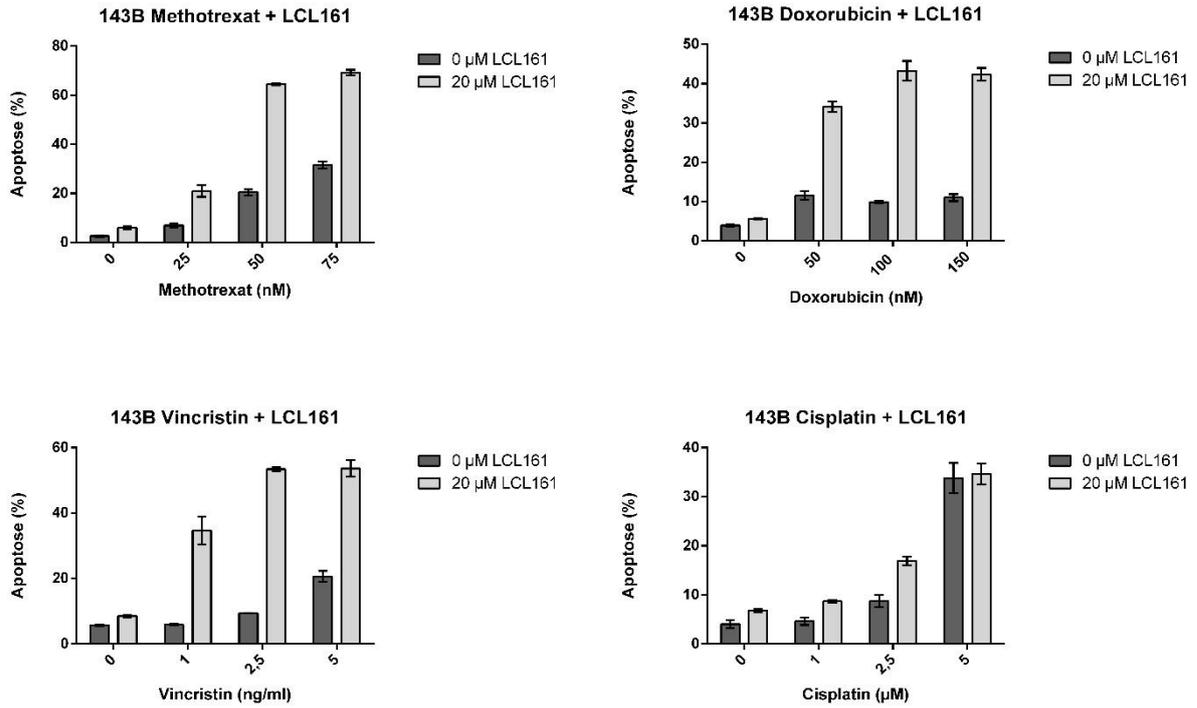


Abb. 16: Sensitivierung von 143B-Zellen für Chemotherapie mittels des *SMAC mimetic* LCL161

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.

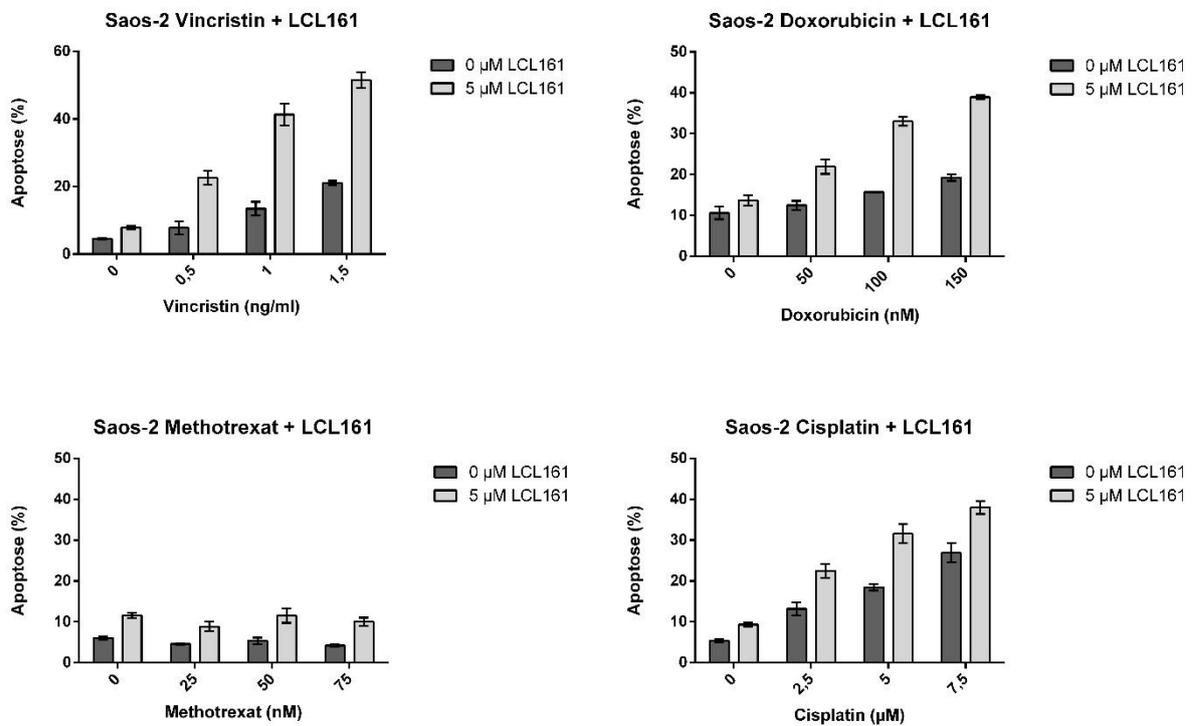


Abb. 17: Sensitivierung von Saos-2-Zellen für Chemotherapie mittels des *SMAC mimetic* LCL161

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.

3.4. Mechanismen der Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Chemo- und Strahlentherapie mittels *SMAC mimetic* LCL161

Nachdem gezeigt werden konnte, dass pro-apoptische Effekte von Chemo- und Strahlentherapie in Osteosarkomzellen mittels LCL161 verstärkt werden können, stellte sich die Frage nach den Mechanismen dieser Verstärkung. Das aktuell favorisierte Modell der Wirkungsweise von SM sieht die proteasomale Degradation von cIAPs gefolgt von der Modulation von TNF α , RIP1 und der NF κ B-Signalwege im Vordergrund, sodass wir den Einfluss dieser Signalwege untersuchten.

3.4.1. Veränderung der Proteinlevels von IAPs unter Behandlung mit Chemo-/Strahlentherapie und LCL161

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich unter Behandlung mit Chemo-/Strahlentherapie und LCL161 veränderte Proteinlevels der IAPs beobachten lassen (Abb. 18). Dabei zeigte sich sowohl in 143B- als auch in Saos-2-Zellen 24 h und 48 h nach der Behandlung mit LCL161 eine Verminderung der Proteinlevel von cIAP1 (Abb. 18A/B/C/D). Unter der Behandlung mit Vincristin konnte in Saos-2-Zellen nach 24 h und 48 h eine Verminderung der Proteinlevel von cIAP2 festgestellt werden (Abb. 18B). Eine Veränderung der Proteinexpression von XIAP konnte unter keiner der Behandlungskombinationen beobachtet werden.

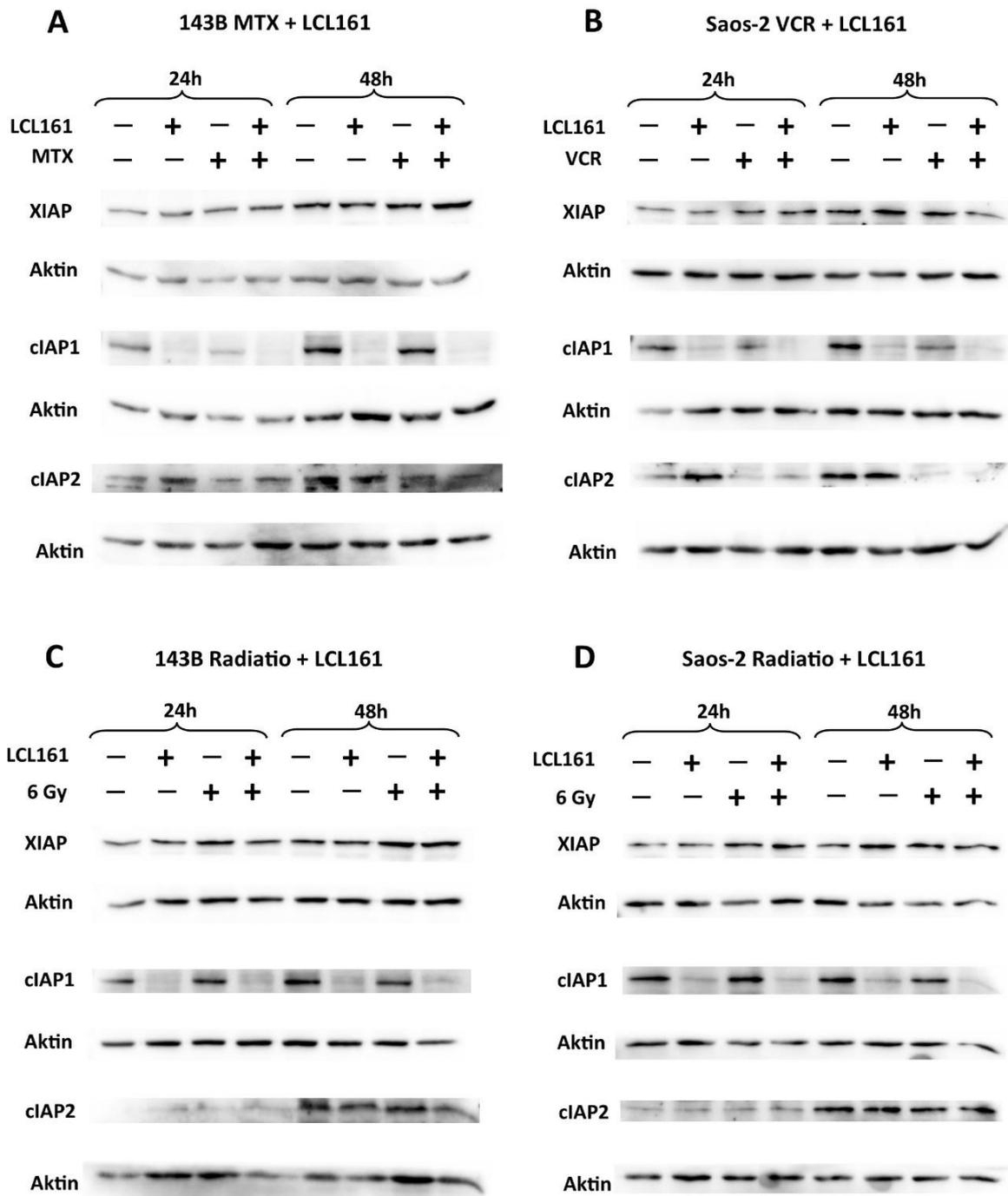


Abb. 18: Proteinlevel von *inhibitor of apoptosis proteins* in 143B- und Saos-2-Zellen ohne und mit Behandlung
 MTX = Methotrexat, VCR = Vincristin, 6 Gy = Bestrahlung mit 6 Gy

3.4.2 Der Einfluss von cIAP1 auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung proapoptotischer Effekte von Chemotherapie in Osteosarkomzellen

Aufgrund der verminderten Expression von cIAP1 unter einer Behandlung mit LCL161 sollte geprüft werden, ob sich die durch LCL161 vermittelte Verstärkung proapoptotischer Effekte der Chemotherapie durch eine Degradation von cIAP1 erklären lässt. Dafür etablierten wir einen cIAP1-*knockdown* in Saos-2-Zellen mittels einer anti-cIAP1-siRNA. Die Effektivität des *knockdowns* wurde auf RNA-Ebene (Abb. 19A; $p = 8,6 \times 10^{-6}$) und auf Proteinebene bestätigt (Abb. 19C). Anschließend wurde die Kombinationsbehandlung von LCL161 und Vincristin in Saos-2-Zellen ohne Transfektion, mit Transfektion einer scrambled siRNA und mit Transfektion der anti-cIAP1-siRNA durchgeführt. Die Effektivität des *knockdowns* wurde auch für diesen Versuch auf Proteinebene bestätigt (Abb. 19D). Die Kombination aus cIAP1-*knockdown* und Vincristin zeigte nicht den gleichen Effekt wie die Kombination aus LCL161 und Vincristin. Es zeigte sich jedoch durch den cIAP1-*knockdown* eine relevante Verstärkung der Apoptose-Induktion durch LCL161 allein ($p = 1,9 \times 10^{-4}$; Abb. 19B).

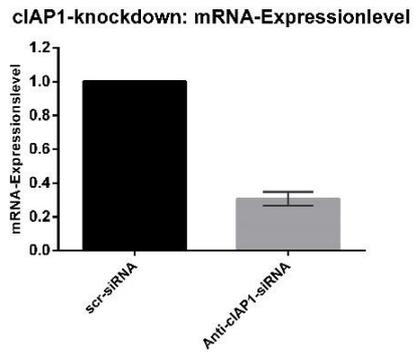
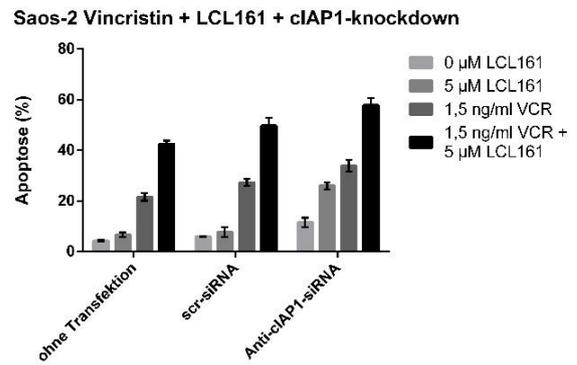
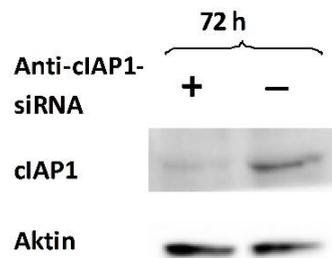
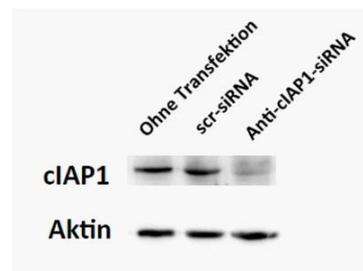
A**B****C****D**

Abb. 19: Die Etablierung des clAP1-knockdowns (A, C) und der Einfluss des clAP1-knockdowns auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung der pro-apoptischen Effekte von Vincristin in Saos-2-Zellen (B), Verifizierung des knockdown 72 h nach Transfektion/48 h nach Behandlung (D)

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.
scr-siRNA = *scrambled siRNA*, VCR = Vincristin

3.4.3. Der Einfluss von RIP1, TNF- α und der NF κ B-Signalwege auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung pro-apoptotischer Effekte von Strahlen- und Chemotherapie in Osteosarkomzellen

Um zu testen, welchen Einfluss RIP1, TNF- α und die NF κ B-Signalwege auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung pro-apoptotischer Effekte haben, wurden spezifische Inhibitoren benutzt.

Adalimumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen TNF- α . Die Wirksamkeit von Adalimumab in einer Konzentration von 50-100 μ g/ml konnte durch eine Blockade der TNF- α induzierten Apoptose gezeigt werden (Abb. 20A/B). Diese TNF- α -Blockade führte jedoch weder für eine Kombinationsbehandlung von LCL161 und Chemotherapie (Abb. 21A/B) noch für eine Kombinationsbehandlung von LCL161 und Bestrahlung (Abb. 21E/F) zu einer deutlichen Reduktion der pro-apoptotischen Effekte. Dies deutet darauf hin, dass TNF- α keine entscheidende Rolle für die LCL161 vermittelte Verstärkung pro-apoptotischer Effekte von Chemo- und Strahlentherapie spielt.

Necrostatin-1 ist ein RIP1-Inhibitor und hemmt somit den TNF- α -Rezeptor induzierten Apoptoseweg. Die Wirksamkeit von Necrostatin-1 in einer Konzentration von 5 μ M konnte ebenfalls durch eine Blockade der TNF- α induzierten Apoptose gezeigt werden (Abb. 20C). Die Hemmung des RIP1-vermittelten Apoptoseweges führte ebenfalls zu keiner Reduktion der Effekte einer Kombinationsbehandlung von LCL161 und Chemotherapie (Abb. 21C).

Zur Überprüfung der Ergebnisse von Necrostatin-1 etablierten wir einen RIP1-*knockdown* in Saos-2-Zellen mittels einer anti-RIP1-siRNA. Die Effektivität des *knockdowns* wurde auf RNA-Ebene (Abb. 22A; $p = 1,9 \times 10^{-5}$) und auf Proteinebene bestätigt (Abb. 22C). Anschließend wurde die Kombinationsbehandlung von LCL161 und Vincristin in Saos-2-Zellen ohne Transfektion, mit Transfektion einer scrambled siRNA und mit Transfektion der anti-RIP1-siRNA durchgeführt. Die Effektivität des *knockdowns* wurde auch für diesen Versuch auf Proteinebene bestätigt (Abb. 22D). Der RIP1-*knockdown* führte zu keiner Reduktion der Effekte einer Kombinationsbehandlung von LCL161 und Vincristin im Vergleich zu den Zellen, die mit der *scrambled* siRNA behandelt wurden. Dies deutet darauf hin, dass auch RIP1 keine entscheidende Rolle für die LCL161 vermittelte Verstärkung pro-apoptotischer Effekte von Zytostatika spielt.

PBS-1086 ist ein NF- κ B-Inhibitor. Durch PBS-1086 in einer Konzentration von 2,5 μ M ließen sich pro-apoptotische Effekte von TNF- α verstärken (Abb. 20D). Auch die Hemmung der NF- κ B-Signalwege führte zu keiner Veränderung der Effekte einer Kombinationsbehandlung von LCL161 und Chemotherapie (Abb. 21D).

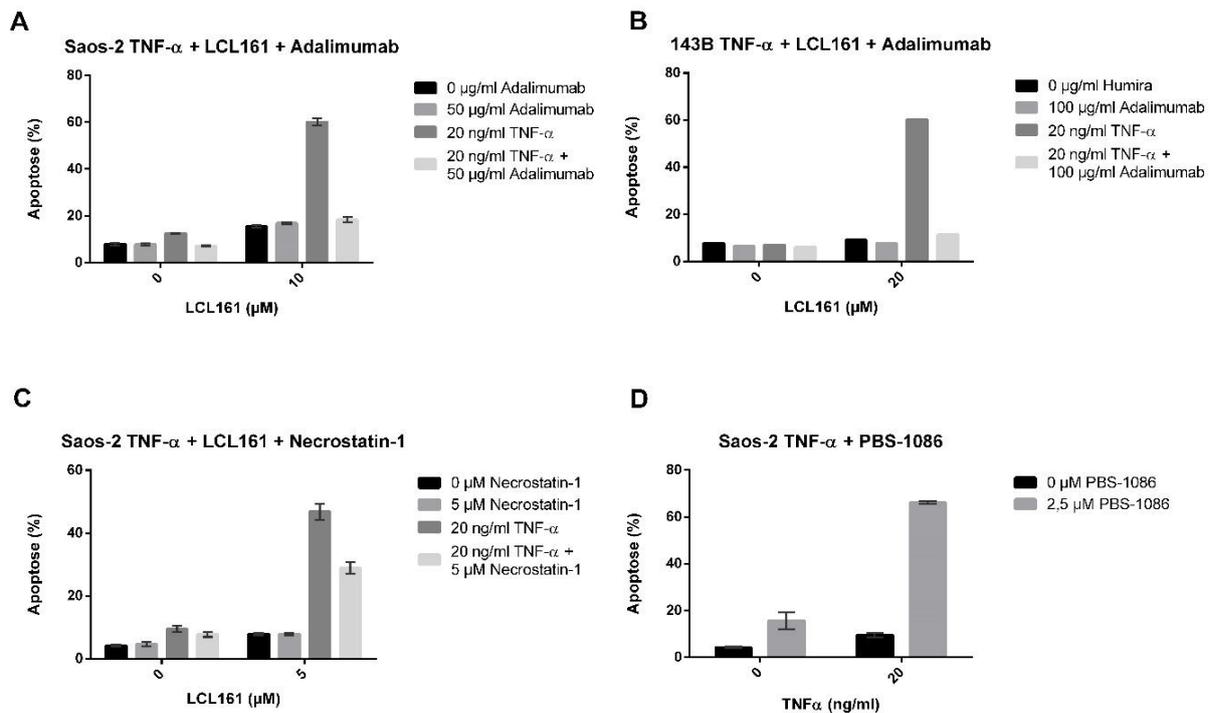


Abb. 20: Verifizierung effizienter Inhibitorkonzentrationen von Adalimumab (A/B), Necrostatin-1 (C) und PBS-1086 (D)

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.

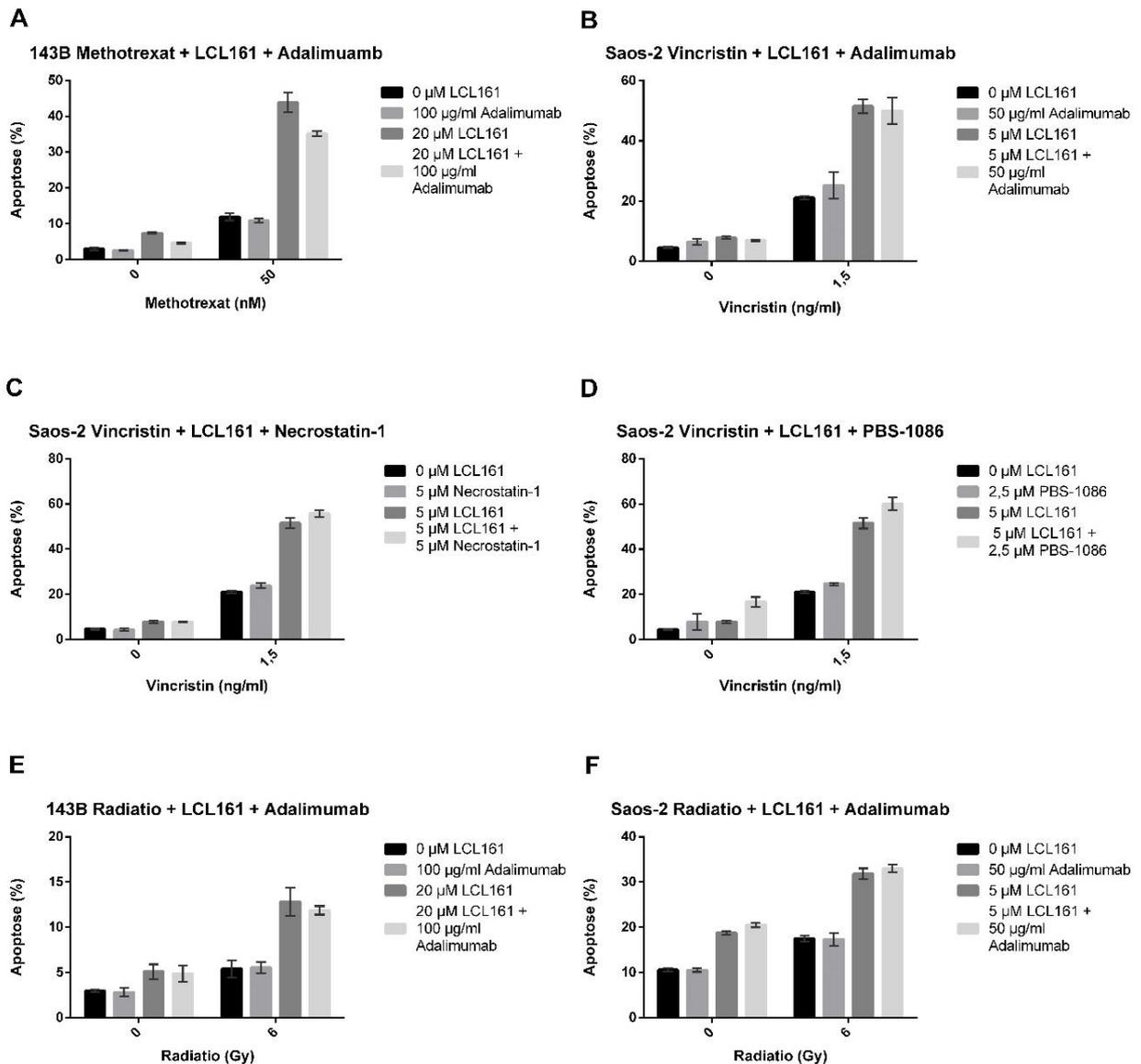


Abb. 21: Der Einfluss von Adalimumab (A,B, E, F), Necrostatin-1 (C) und PBS-1086 (D) auf die Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Chemo- und Strahlentherapie mittels des *SMAC mimetic* LCL161

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.

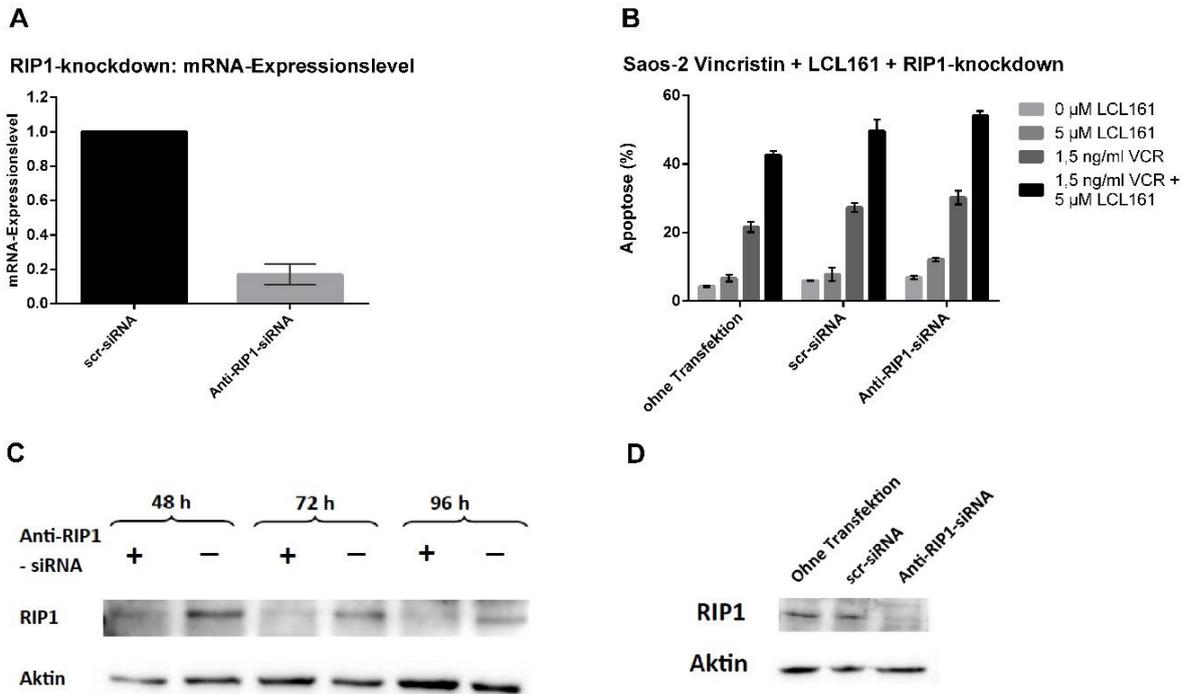


Abb. 22: Etablierung des RIP1-knockdowns (A, C) und der Einfluss des RIP1-knockdowns auf die durch LCL161 vermittelte Verstärkung der pro-apoptischen Effekte von Vincristin in Saos-2-Zellen (B), Verifizierung des knockdown 72 h nach Transfektion/48 h nach Behandlung (D)

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mittels forward scatter/sideward scatter durchgeführt.
scr-siRNA = *scrambled siRNA*, VCR = Vincristin

3.5. Vergleichbarkeit der durchflusszytometrischen Analysen mittels *forward scatter/sideward scatter* und mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung zum Nachweis der Apoptose-Induktion

Um die im Verlauf benutzten durchflusszytometrischen Analysen mittels *forward scatter/sideward scatter* (FSC/SSC) zu begründen, wurde zunächst eine Vergleichbarkeit dieser Methode zu der Analyse mittels AnnexinV/Propidiumiodid(PI)-Färbung geprüft. Zwei OS-Zelllinien (143B- und Saos-2-Zellen) wurden mit zwei verschiedenen Zytostatika (Methotrexat und Vincristin) in An-/Abwesenheit von SM LCL161 behandelt. Die Apoptose-Induktion wurde sowohl mittels AnnexinV/PI als auch mittels FSC/SSC bestimmt. (Abb. 23). Zwischen diesen beiden Methoden konnten für beide Zelllinien (143B und Saos-2) keine relevanten Unterschiede festgestellt werden, sodass in der Folge die Bestimmung der Apoptose-Induktion in der Regel mittels FSC/SSC durchgeführt wurde (die jeweilige Methode wurde in der Abbildung angegeben).

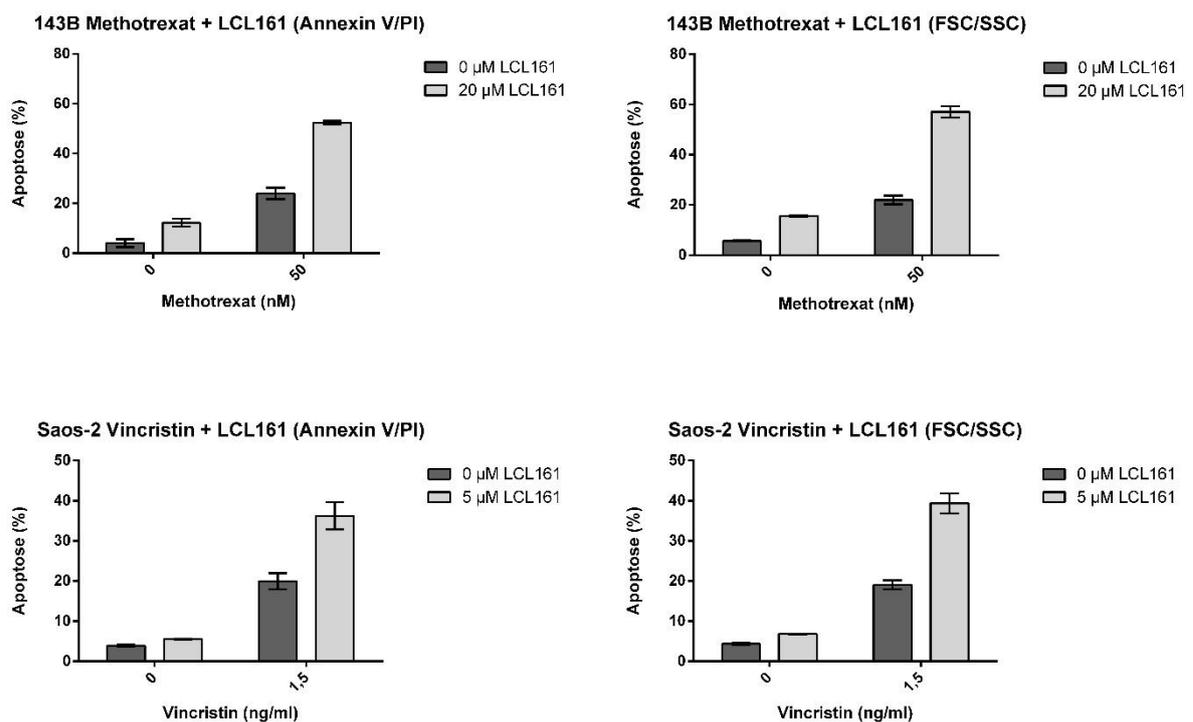


Abb. 23: Durchflusszytometrische Auswertung mittels *forward scatter/sideward scatter* (FSC/SSC) und AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung

3.6. Pro-apoptotische Effekte von LCL161 auf Osteosarkomzellen *in vivo*

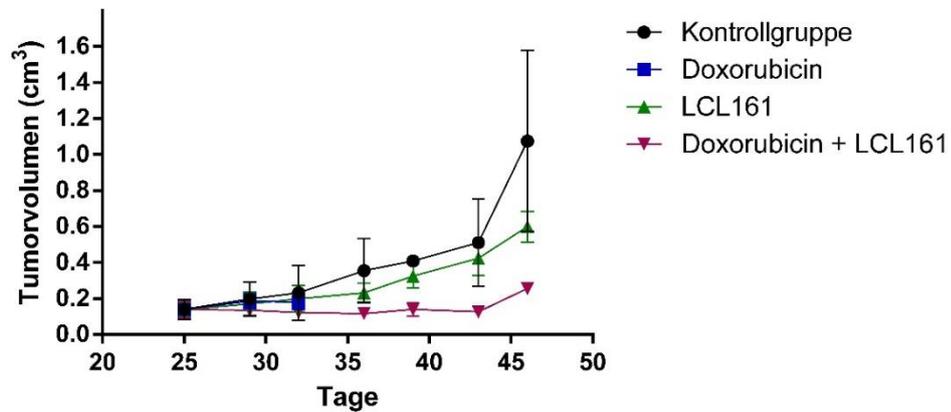
Nachdem festgestellt werden konnte, dass sich in Osteosarkomzelllinien *in vitro* pro-apoptotische Effekte von Chemotherapie durch das SM LCL161 verstärken lassen, sollte geprüft werden, ob sich diese synergistischen Effekte auch *in vivo* zeigen lassen. Dafür wurden NOD/SCID/IL2rg-Mäusen subkutan Saos-2-Zellen injiziert und jeweils mit Doxorubicin, LCL161 oder der Kombination behandelt. Im ersten Mausversuch (Abb. 24A) überlebte keine der mit Doxorubicin behandelte Mäuse den Tag 32. Von den mit Doxorubicin und LCL161 behandelten Mäusen erreichte nur eine von sieben Mäusen den Endpunkt (Tag 46). Diese wies jedoch am Tag 46 ein deutlich geringeres Tumolvolumen als die Kontrollgruppe auf. In der mit LCL161 allein behandelten Gruppe konnte am Endpunkt ein signifikant geringeres Tumolvolumen ($p = 3,0 \times 10^{-2}$) als in der Kontrollgruppe beobachtet werden.

In einem zweiten Versuch (Abb. 24B) kam es trotz Dosisreduktion von Doxorubicin bis zum Endpunkt erneut zu kompletten Ausfällen der mit Doxorubicin und Doxorubicin/LCL161 behandelten Gruppen. Am Tag 34 zeigten sich jedoch bereits signifikante Unterschiede der Tumorumfänge im Vergleich zu der Kontrollgruppe: Doxorubicin ($p = 4,6 \times 10^{-3}$), LCL161 ($p = 1,0 \times 10^{-2}$), Doxorubicin + LCL161 ($p = 9,1 \times 10^{-4}$). Zudem konnte am Endpunkt ein signifikant geringeres Tumolvolumen ($p = 9,4 \times 10^{-4}$) in der mit LCL161 behandelten Gruppe als in der Kontrollgruppe beobachtet werden.

In beiden Versuchen zeigte sich durch die Behandlung mit dem SM LCL161 allein eine deutliche Reduktion des Tumorumfanges. Synergistische Effekte von LCL161 und Doxorubicin ließen sich *in vivo* aufgrund der unerwarteten Doxorubicin-Toxizität anhand der durchgeführten Experimente nicht sicher demonstrieren.

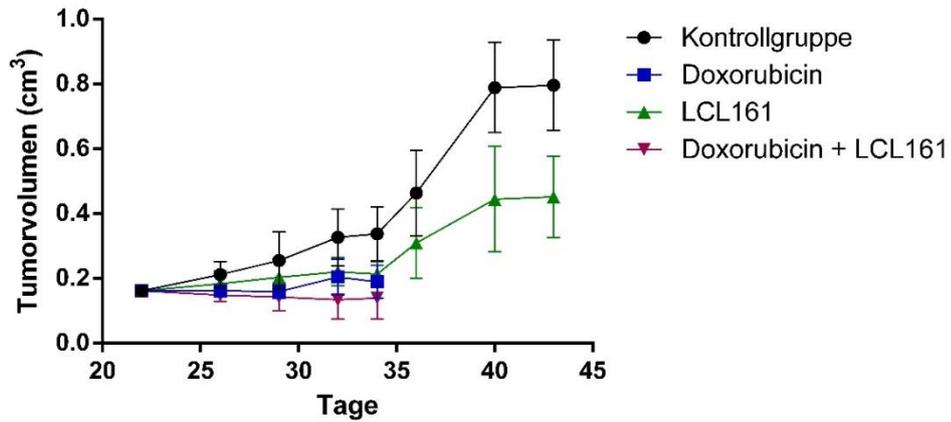
A

Mausversuch mit Saos-2: Doxorubicin + LCL161



B

Mausversuch mit Saos-2: Doxorubicin + LCL161



C

Ausschnitt aus B

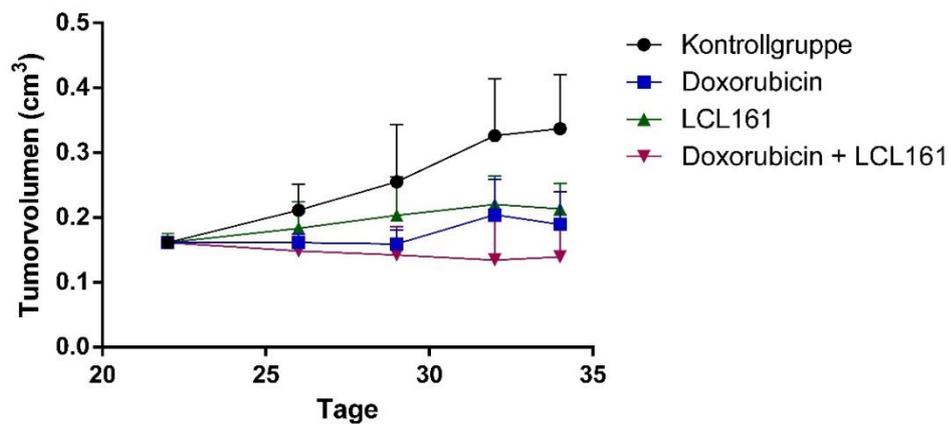


Abb. 24: Effekte von SMAC mimetic LCL161 allein und in Kombination mit Doxorubicin in Saos-2-Zellen *in vivo*
 p-Werte (im Vergleich zur Kontrollgruppe) A) Tag 46: LCL161 $3,0 \times 10^{-2}$, B) Tag 34: Doxorubicin $4,6 \times 10^{-3}$, LCL161 $1,0 \times 10^{-2}$,
 Doxorubicin + LCL161 $9,1 \times 10^{-4}$, Tag 43: LCL161 $9,4 \times 10^{-4}$

4. Diskussion

Osteosarkome sind die häufigsten malignen Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter. In der Altersgruppe zwischen 15 und 19 Jahren machen sie über 5 % der malignen Erkrankungen aus (6). Im Rahmen der COSS- /EURAMOS-Studien behandelte Kinder mit nicht-metastasierten Osteosarkomen im Bereich der Extremitäten haben durch die eingesetzte neoadjuvante Polychemotherapie, Lokalthherapie (in der Regel die chirurgische Tumoresektion) und adjuvante Polychemotherapie eine Heilungschance von 60 bis 70 %. Bei metastasierten Tumoren, makroskopisch inkompletter chirurgischer Resektion oder Rezidiven ist die Prognose jedoch nach wie vor sehr schlecht (16-32%) (18-20). Nicht zuletzt die hohe Strahlenresistenz von Osteosarkomen macht die erfolgreiche Behandlung von nicht komplett resezierbaren und metastasierten Tumoren nahezu unmöglich. Daher ist die Entwicklung von Strategien zur Optimierung der Effektivität der antineoplastischen Therapie dringend erforderlich.

Als eine vielversprechende neue Strategie zur Überwindung von Resistenz gegenüber antineoplastischer Therapie wurde in den letzten Jahren der Einsatz von *small molecules*, welche gegen zentrale Regulationsproteine der Apoptose gerichtet sind, beschrieben. SMAC kann *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) wie XIAP, cIAP1 und cIAP2 binden und somit deren anti-apoptotische Wirkung blockieren (27, 42, 43). Aufbauend auf dem N-terminalen AVPI-Bindungsmotiv von SMAC wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher *small molecules*, sogenannte *SMAC mimetics* (SM) entwickelt. Der pro-apoptotische Effekt dieser SM wurde sowohl auf die Hemmung der XIAP-vermittelten Blockade der Caspasen 3,7 und 9 als auch auf die proteasomale Degradation von cIAPs gefolgt von der Modulation von TNF α , RIP1 und der NF κ B-Signalwege zurückgeführt (28, 44-47).

Durch SM konnte in multiplen präklinischen Studien bereits eine Sensitivierung von Tumorzellen für Chemo- und Strahlentherapie gezeigt werden (41, 54-56, 59). Auch in klinischen Phase-I/II-Studien wurde der Effekt von SM bereits bei Malignomen des Erwachsenenalters getestet, ohne dass sich eine relevante Toxizität zeigte (57).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in Osteosarkomzellen eine Überexpression von IAPs (als Zielstrukturen der SM) vorliegt, die Behandlung mit dem SM LCL161 zu pro-apoptotischen Effekten *in vitro* und *in vivo* führt und ob Effekte einer Chemo- oder Strahlentherapie durch eine Kombination mit LCL161 *in vitro* und *in vivo* verstärkt werden können.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass in Osteosarkomzellen eine Überexpression von XIAP vorliegt. XIAP gilt als das potenteste Mitglied der IAP-Familie. Es kann Caspase 3, 7 und 9 durch direkte Bindung inhibieren (26) und somit sowohl die Todes-Rezeptor als auch die mitochondrial-vermittelte Apoptoseaktivierung blockieren (29). Die starke Überexpression von XIAP als Zielstruktur von SM war ein Anhalt, dass SM in Osteosarkomzellen pro-apoptotische Effekte erzielen können.

Die alleinige Behandlung von Osteosarkomzellen mit dem SM LCL161 führte erst bei hohen mikromolaren Dosen zu relevanten apoptotischen Effekten, sodass ähnlich wie bei ALL-Zellen (Nalm-6, Loucy) (40) und Neuroblastomzellen (C1300, Kelly, NXS2, SK-N-SH) von einer SM-Resistenz ausgegangen werden kann (39, 41). Es können SM-resistente von SM-sensiblen Zelllinien wie den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und OVCAR-4 (44, 47), den Nicht-kleinzellige-Bronchialkarzinomzelllinien HCC44, HCC461 und A2058, der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (45, 48), sowie der Rhabdomyosarkomzelllinie Kym-1 (47) unterschieden werden.

In Zellen, in denen sich durch eine Behandlung mit einem SM allein keine relevanten apoptotischen Effekte erzielen ließen, z.B. SM-resistente Neuroblastomzellen, konnten jedoch Effekte von Zytostatika durch SM verstärkt werden (41). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich in SM-resistenten Osteosarkomzellen sowohl pro-apoptotische Effekte von Strahlentherapie als auch von Chemotherapie durch das SM LCL161 verstärken lassen. Beide Osteosarkomzelllinien ließen sich durch LCL161 sowohl für Strahlentherapie, als auch für Vincristin und Doxorubicin sensitivieren. SM können dementsprechend die Resistenz von Osteosarkomzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie durchbrechen.

Nachdem demonstriert werden konnte, dass pro-apoptotische Effekte von Chemo- und Strahlentherapie in Osteosarkomzellen mittels LCL161 verstärkt werden können, stellte sich die Frage nach den Mechanismen dieser Verstärkung. Das aktuell favorisierte Modell der Wirkungsweise von SM sieht die proteasomale Degradation von cIAPs gefolgt von der Modulation von TNF α , RIP1 und der NF κ B-Signalwege im Vordergrund, sodass wir den Einfluss dieser Signalwege untersuchten (44-47).

In beiden Osteosarkomzelllinien zeigte sich nach einer Behandlung mit LCL161 eine verminderte Proteinexpression von cIAP1. Auch in Neuroblastomzellen und Ovarialkarzinomzellen kam es nach der Behandlung mit dem SM LBW242 zu einer

verminderten Proteinexpression von cIAP1 (41, 47). In SM-sensiblen Mammakarzinom- und Bronchialkarzinomzellen kam es nach Behandlung mit einem SM sowohl zu einer verminderten Proteinexpression von cIAP1 als auch von cIAP2 (46, 48). Nach aktuellem Wissenstand scheint diese verminderte Proteinexpression von cIAP1 durch einen proteasomalen Abbau bedingt zu sein, da sie sich durch die zusätzliche Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 verhindern ließ (44, 46, 47).

Aufgrund der verminderten Expression von cIAP1 unter einer Behandlung mit LCL161 sollte geprüft werden, ob sich in Osteosarkomzellen die LCL161 vermittelte Verstärkung pro-apoptotischer Effekte von Chemotherapie durch eine Degradation von cIAP1 erklären lässt und sich somit durch einen cIAP1-*knockdown* die Effekte von SM nachahmen lassen. Unter einer Kombinationsbehandlung aus cIAP1-*knockdown* und Vincristin ließ sich nicht der gleiche Effekt wie unter der Kombination aus LCL161 und Vincristin beobachten. Es zeigte sich jedoch durch den cIAP1-*knockdown* eine relevante Verstärkung der Apoptose-Induktion durch LCL161 allein. In SM-sensiblen ALL-Zellen konnten mit einer Kombination von cIAP1-*knockdown* und Chemotherapie ähnliche Effekte wie mit einer Kombinationsbehandlung von SM und Chemotherapie erreicht werden (51). In SM-sensiblen Ovarialkarzinomzellen hatte ein cIAP1-*knockdown* zusammen mit einer TNF α -Behandlung einen vergleichbaren Effekt wie die Behandlung mit LBW242 allein (44). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in SM-resistenten Osteosarkomzellen im Gegensatz zu SM-sensiblen Zellen die Sensitivierung für Chemotherapie durch SM nicht relevant auf der Degradation von cIAP1 beruht.

Des Weiteren konnten in SM-resistenten Osteosarkomzellen weder durch eine TNF α -Blockade, noch durch Hemmung von RIP1 oder NF κ B-Signalwegen Auswirkungen auf die Effekte von LCL161 allein oder die Kombination von LCL161 mit Chemo- oder Strahlentherapie beobachtet werden.

In SM-sensiblen Ovarialkarzinomzellen konnte die SM-vermittelte Apoptose-Induktion durch den TNF α -Inhibitor Etanercept gehemmt werden (44). In weiteren SM-sensiblen Zellen (Bronchialkarzinom-, Mammakarzinom-, Melanomzellen) konnte die SM-vermittelte Apoptose-Induktion ebenfalls sowohl durch einen TNF α -neutralisierender Antikörper als auch durch einen TNFR1- oder TNF α -*knockdown* gehemmt werden. Darüber hinaus ließ sich in diesen Zellen die SM-vermittelte Apoptose-Induktion durch

einen RIPK1-*knockdown* verhindern. Zudem zeigte sich, dass SM-sensible Zellen im Gegensatz zu SM-resistenten Zellen TNF α sezernierten (45).

In SM-sensiblen Bronchialkarzinomzellen und ALL-Zellen konnte gezeigt, dass die Effekte einer Kombinationstherapie von SM und Chemotherapie teilweise TNF α und/oder RIP1 abhängig sind. Zudem führte die Kombinationsbehandlung von SM und Chemotherapie zu einer potenzierten autokrinen TNF α -Ausschüttung im Vergleich zu einer SM- oder Chemotherapiebehandlung allein und zur Formierung des RIP1/FADD/Caspase-8-Komplexes (48, 51). Die Inaktivierung von Caspase 8, jedoch nicht von Caspase 9, konnte eine SM-vermittelte Apoptose-Induktion verhindern, sodass in SM-sensiblen Zellen von einer TNF-R1 und Ripoptosom vermittelten Induktion des extrinsischen Apoptoseweges durch SM ausgegangen werden kann (46, 47).

In SM-resistenten Neuroblastomzellen führte eine TNF α -Blockade mittels eines TNF α -neutralisierender Antikörpers nicht zu verminderten Effekten einer Kombinationsbehandlung von Chemotherapie und SM. In SM-resistenten Bronchialkarzinomzellen konnten die Effekte einer Kombinationsbehandlung von Chemotherapie und SM nicht durch einen TNF-R1-, Caspase-8- oder RIP1-*knockdown* gehemmt werden (50). Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit einem SM allein (LCL161) und Ko-Stimulation mit TNF α in SM-resistenten Osteosarkomzellen im Gegensatz zu SM-resistenten Neuroblastomzellen (41) zu einer relevanten Apoptose-Induktion führte. In weiteren Zelllinien, in denen durch SM allein nur gering, jedoch durch eine Ko-Stimulation mit TNF α eine relevante Apoptose-Induktion erreicht werden konnte, führten, wenn exogenes TNF α hinzugefügt wurde, die gleichen Mechanismen (Caspase-8-, TNFR1- und RIP1-abhängig) zur Apoptose-Induktion (45, 47). Anders als Neuroblastomzellen lassen sich also Osteosarkomzellen durch SM für TNF α sensitivieren. Die SM-vermittelte Sensitivierung für Chemotherapie erfolgte jedoch in Osteosarkomzellen (wie in Neuroblastomzellen) unabhängig von TNF α und/oder RIP1.

Auch Effekte von SM auf die NF- κ B-Signalwege konnten in anderen Zelllinien gezeigt werden. In SM-sensiblen und SM-resistenten Zelllinien kam es durch die Behandlung mit SM sowohl zu einer Induktion des kanonischen (vermehrte RIP1-Bindung an TNF-R1, I κ B- und p65-Phosphorylierung) als auch den nicht-kanonischen NF κ B-Signalweges (NIK-Stabilisierung und p100-Bildung), wobei sich die Aktivierung der NF κ B-Signalwege auch durch einen cIAP-*knockdown* erreichen ließ. Dabei führte die NF κ B-Aktivierung in SM-

sensiblen Zellen zu einer Induktion der autokrinen TNF α -Sekretion, welche wiederum zur Apoptose-Induktion dieser Zellen notwendig schien (46, 47). Daraus lässt sich schließen, dass es zwar sowohl in SM-sensiblen als auch SM-resistenten Zellen durch SM zu einer cIAP1-vermittelten Aktivierung von NF κ B-Signalwegen kommt, diese jedoch nur in SM-sensiblen Zellen zu einer erhöhten autokrinen TNF α -Sekretion und anschließenden relevanten Apoptose-Induktion führt.

Auch *in vivo* ließen sich in SM-sensiblen Zellen durch eine Behandlung mit SM erhöhte TNF α -Spiegel induzieren. Eine Behandlung mit einem TNF α -neutralisierenden Antikörper konnte jedoch die SM-vermittelte Tumorreduktion nur teilweise blockieren (48). Auch in einem Mausmodell mit *in vitro* SM-resistenten Zellen konnte eine durch die Behandlung mit einem SM allein eine Tumorzellreduktion beobachtet werden. Eine verstärkte Tumorzellreduktion ließ sich durch eine Kombinationsbehandlung von SM mit Chemotherapie erreichen. Auch dieser Effekt einer Kombinationsbehandlung ließ sich partiell durch die zusätzliche Behandlung mit einem TNF α -neutralisierenden Antikörper blockieren (48). Die Möglichkeit von Tumorzellen SM-vermittelt vermehrt TNF α zu sezernieren könnte *in vivo* deutlich weniger relevant sein als *in vitro*, da die Tumorumgebung reaktiv vermehrt TNF α produziert und die Tumorzellen dementsprechend mit ausreichend exogenem TNF α in Kontakt sind (49). Diese Hypothese ließ sich auch durch die im Rahmen dieser Arbeit mit SM-resistenten Osteosarkomzellen durchgeführten Mausversuche stützen, in denen sich durch die Behandlung mit dem SM LCL161 allein eine deutliche Reduktion des Tumorumfanges zeigte. Synergistische Effekte von LCL161 und Doxorubicin ließen sich *in vivo* aufgrund der unerwarteten Doxorubicin-Toxizität in dem verwendeten Mausmodell anhand der durchgeführten Experimente nicht sicher demonstrieren.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch eine XIAP-Inhibition eine wichtige Rolle in der Wirkungsweise von SM einnimmt. In SM-resistenten Bronchialkarzinomzellen ließ sich durch einen XIAP-*knockdown* der Effekt eines SM in Kombination mit Chemotherapie nachahmen (50) und SM-resistente Kolonkarzinomzellen ließen sich durch einen XIAP-*knockdown* ähnlich wie mit einem SM für Bestrahlung sensitivieren (59). Eine Veränderung des Proteinlevels von XIAP konnte in Osteosarkomzellen jedoch unter keiner der Behandlungskombinationen beobachtet werden. Dies zeigte sich in multiplen Tumorentitäten, in denen eine Behandlung mit SM geprüft wurde, z.B. kam es in Neuroblastom-, Ovarialkarzinom-, Mammakarzinom- und Rhabdomyosarkomzellen

unter der Behandlung mit SM zu keiner Verminderung des XIAP-Proteinlevels (41, 44, 46, 47). Daraus lässt sich schließen, dass XIAP-vermittelte pro-apoptotische Effekte von SM nicht durch eine Degradation, sondern durch eine Inhibition von XIAP bedingt sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass den Effekten von SM und der Verstärkung von Chemotherapie-Effekten durch SM unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen können. Dabei lassen sich *in vitro* die Mechanismen SM-resistenter von SM-sensiblen Zellen unterscheiden. In SM-sensiblen Zellen scheinen die Effekte von SM sowohl auf einer TNF-R1 und Ripoptosom vermittelten Induktion des extrinsischen Apoptoseweges, als auch auf einer cIAP1-vermittelten Aktivierung von NFκB-Signalwegen und einer daraus resultierenden vermehrten autokrinen TNFα-Sekretion zu beruhen. Die SM vermittelte Induktion einer verminderten Expression von cIAP1 und cIAP2 in SM-sensiblen Zellen deutet zudem auf ein Zusammenspiel beider cIAPs hin. In SM-resistenten Zellen scheint am ehesten die Regulation von XIAP eine wichtige Rolle zu spielen. Sowohl der Einfluss von einer cIAP1-vermittelten Aktivierung von NFκB-Signalwegen, als auch einer TNFα- und RIP1-abhängige Apoptose-Induktion ohne zusätzliche exogene TNFα-Stimulation ließ sich für SM-resistente Zellen nicht zeigen. Die unterschiedliche Möglichkeit von Tumorzellen, SM vermittelt vermehrt TNFα zu sezernieren, könnte *in vivo* deutlich weniger relevant sein als *in vitro*, da die Tumorzellen mit ausreichend exogenem TNFα aus der Tumorumgebung in Kontakt sind. Die Unterscheidung von SM-sensiblen und SM-resistenten Zellen scheint dementsprechend *in vivo* weniger relevant als *in vitro*.

Auch für Osteosarkomzellen lässt sich also vermuten, dass die Inhibition von XIAP ein Schlüsselmechanismus der Wirkungsweise von SM darstellt. Experimente mit dem XIAP-Antisense-Oligonukleotide AEG 35156 gestalteten sich jedoch aufgrund der hohen Grundapoptose der Zellen als sehr schwierig. Zur Überprüfung der Rolle von XIAP müsste jedoch ein XIAP-*knockdown* etabliert und beobachtet werden, ob so der Effekt eines SM in Kombination mit Chemo-/Strahlentherapie nachgeahmt werden kann. Auch eine Untersuchung von involvierten Caspasen (Caspase 8 vs. 9) könnte ergänzend durchgeführt werden, um eine Aktivierung des extrinsischen vom dem des intrinsischen Apoptoseweges zu unterscheiden. Dabei würde die Verstärkung des intrinsischen Apoptoseweges, der unabhängig von TNFα aktiviert wird, die Hypothese einer XIAP-vermittelten Wirkweise von SM unterstützen. Zusätzlich zur NFκB-Inhibitor-Testung mittels PBS-1086 könnten mittels *Western-blot*-Analysen die Aktivierung des

kanonischen (I κ B- und p65-Phosphorylierung) und des nicht-kanonischen (Umwandlung von p100 zu p52) NF κ B-Signalweges durch SM spezifischer untersucht werden. Interessant wäre zudem, ob sich durch eine exogene TNF α -Stimulation ähnliche Mechanismen (TNF-R1 und RIP1-abhängige Apoptose-Induktion) wie für SM-sensible Zellen aktivieren lassen und ob sich die SM induzierten zytotoxischen Effekte durch TNF α -Antikörper *in vivo* blockieren lassen. Darüber hinaus könnte eine erneute Durchführung eines Mausversuchs mit einer geringeren Doxorubicin-Dosis oder mit einem anderen Zytostatikum z.B. Vincristin zeigen, ob sich in Osteosarkomzellen apoptotische Effekte einer Chemotherapie auch *in vivo* mittels des SM LCL161 verstärken lassen. Der sichere und reproduzierbar nachweisbare antineoplastische Effekt von LCL161 allein und/oder in Kombination mit Chemo- und/oder Strahlentherapie im murinen Osteosarkom-Modell wäre die Voraussetzung für eine klinische Prüfung von LCL161 im Rahmen einer pädiatrischen Phase I/II Studie. Die geringe Toxizität von SM und speziell von LCL161, die sich in mehreren Phase I/II-Studien im Erwachsenenalter bereits zeigen ließ, spricht für einen möglichen Einsatz im pädiatrischen Bereich.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Behandlung mit dem SM LCL161 allein und in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie eine vielversprechende Therapieoption für Kinder und Jugendliche mit nicht-operablen bzw. metastasierten Osteosarkomen sein könnte.

5. Literaturverzeichnis

1. Jahresbericht 2016 des Deutschen Kinderkrebsregisters.
<http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/jahresberichte.html>
2. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010, Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI.
<http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Krebspraevalenz.html>
3. Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen.
https://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/index_ger.html (Stand 06.09.2017)
4. Die pädiatrische Onkologie in Deutschland.
https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/paediatrische_onkologie/index_ger.html, (Stand 06.09.2017)
5. Cooperative OsteoSarkom Studiengruppe.
<http://olgahospital-stuttgart.de/index.php?id=1062>, (Stand 06.09.2017)
6. Osteosarkom (Kurzinformation).
https://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/osteosarkom/pohpatinfoosteosarkomkurz20101215/index_ger.html, (Stand 06.09.2017)
7. Luetke A, Meyers PA, Lewis I and Juergens H. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev* 2014;40:523-32.
8. Le Vu B, de Vathaire F, Shamsaldin A, Hawkins MM, Grimaud E, Hardiman C, Diallo I, Vassal G, Bessa E, Campbell S, Panis X, Daly-Schweitzer N, Lagrange JL, Zucker JM, Eschwege F, Chavaudra J and Lemerle J. Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumours during childhood. *Int J Cancer* 1998;77:370-7.
9. Volker T, Denecke T, Steffen I, Misch D, Schonberger S, Plotkin M, Ruf J, Furth C, Stover B, Hautzel H, Henze G and Amthauer H. Positron emission tomography for staging of pediatric sarcoma patients: results of a prospective multicenter trial. *J Clin Oncol* 2007;25:5435-41.
10. Denecke T, Hundsdorfer P, Misch D, Steffen IG, Schonberger S, Furth C, Plotkin M, Ruf J, Hautzel H, Stover B, Kluge R, Bierbach U, Otto S, Beck JF, Franzius C, Henze G and Amthauer H. Assessment of histological response of paediatric bone

- sarcomas using FDG PET in comparison to morphological volume measurement and standardized MRI parameters. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1842-53.
11. Hundsdoerfer P, Albrecht M, Ruhl U, Fengler R, Kulozik AE and Henze G. Long-term outcome after polychemotherapy and intensive local radiation therapy of high-grade osteosarcoma. *Eur J Cancer* 2009;45:2447-51.
 12. Kamada T, Tsujii H, Tsuji H, Yanagi T, Mizoe JE, Miyamoto T, Kato H, Yamada S, Morita S, Yoshikawa K, Kandatsu S and Tateishi A. Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in bone and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2002;20:4466-71.
 13. Frisch S and Timmermann B. The Evolving Role of Proton Beam Therapy for Sarcomas. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2017;29:500-6.
 14. Blattmann C, Oertel S, Schulz-Ertner D, Rieken S, Haufe S, Ewerbeck V, Unterberg A, Karapanagiotou-Schenkel I, Combs SE, Nikoghosyan A, Bischof M, Jakel O, Huber P, Kulozik AE and Debus J. Non-randomized therapy trial to determine the safety and efficacy of heavy ion radiotherapy in patients with non-resectable osteosarcoma. *BMC Cancer* 2010;10:96.
 15. Whelan JS, Bielack SS, Marina N, Smeland S, Jovic G, Hook JM, Krailo M, Anninga J, Butterfass-Bahloul T, Bohling T, Calaminus G, Capra M, Deffenbaugh C, Dhooge C, Eriksson M, Flanagan AM, Gelderblom H, Goorin A, Gorlick R, Gosheger G, Grimer RJ, Hall KS, Helmke K, Hogendoorn PC, Jundt G, Kager L, Kuehne T, Lau CC, Letson GD, Meyer J, Meyers PA, Morris C, Mottl H, Nadel H, Nagarajan R, Randall RL, Schomberg P, Schwarz R, Teot LA, Sydes MR and Bernstein M. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Ann Oncol* 2015;26:407-14.
 16. Bielack SS, Smeland S, Whelan JS, Marina N, Jovic G, Hook JM, Krailo MD, Gebhardt M, Papai Z, Meyer J, Nadel H, Randall RL, Deffenbaugh C, Nagarajan R, Brennan B, Letson GD, Teot LA, Goorin A, Baumhoer D, Kager L, Werner M, Lau CC, Sundby Hall K, Gelderblom H, Meyers P, Gorlick R, Windhager R, Helmke K, Eriksson M, Hoogerbrugge PM, Schomberg P, Tunn PU, Kuhne T, Jurgens H, van den Berg H, Bohling T, Picton S, Renard M, Reichardt P, Gerss J, Butterfass-Bahloul T, Morris C, Hogendoorn PC, Seddon B, Calaminus G, Michelagnoli M, Dhooge C, Sydes MR and Bernstein M. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic

- Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* 2015;33:2279-87.
17. Marina NM, Smeland S, Bielack SS, Bernstein M, Jovic G, Krailo MD, Hook JM, Arndt C, van den Berg H, Brennan B, Brichard B, Brown KLB, Butterfass-Bahloul T, Calaminus G, Daldrup-Link HE, Eriksson M, Gebhardt MC, Gelderblom H, Gerss J, Goldsby R, Goorin A, Gorlick R, Grier HE, Hale JP, Hall KS, Harges J, Hawkins DS, Helmke K, Hogendoorn PCW, Isakoff MS, Janeway KA, Jurgens H, Kager L, Kuhne T, Lau CC, Leavey PJ, Lessnick SL, Mascarenhas L, Meyers PA, Mottl H, Nathrath M, Papai Z, Randall RL, Reichardt P, Renard M, Safwat AA, Schwartz CL, Stevens MCG, Strauss SJ, Teot L, Werner M, Sydes MR and Whelan JS. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17:1396-408.
 18. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jurgens H and Winkler K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002;20:776-90.
 19. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jurgens H, Gardner H and Bielack SS. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol* 2003;21:2011-8.
 20. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Carrle D, Friedel G, Helmke K, Kevric M, Jundt G, Kuhne T, Maas R, Schwarz R, Zoubek A and Jurgens H. Second and subsequent recurrences of osteosarcoma: presentation, treatment, and outcomes of 249 consecutive cooperative osteosarcoma study group patients. *J Clin Oncol* 2009;27:557-65.
 21. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:325-31.
 22. Adams JM and Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007;19:488-96.

23. Fulda S, Galluzzi L and Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:447-64.
24. Vaux DL and Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:287-97.
25. Fulda S and Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:109-24.
26. Eckelman BP, Salvesen GS and Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006;7:988-94.
27. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X and Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;406:855-62.
28. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y and Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001;410:112-6.
29. Holcik M and Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:550-6.
30. Varfolomeev E and Vucic D. Inhibitor of apoptosis proteins: fascinating biology leads to attractive tumor therapeutic targets. *Future Oncol* 2011;7:633-48.
31. Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ and Barker PA. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 2008;30:689-700.
32. Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS and Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000;10:1359-66.
33. Desplanques G, Giuliani N, Delsignore R, Rizzoli V, Bataille R and Barille-Nion S. Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica* 2009;94:87-93.
34. Durkop H, Hirsch B, Hahn C and Stein H. cIAP2 is highly expressed in Hodgkin-Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active caspase-3. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:132-41.
35. Krepela E, Dankova P, Moravcikova E, Krepelova A, Prochazka J, Cermak J, Schutzner J, Zatloukal P and Benkova K. Increased expression of inhibitor of

- apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol* 2009;35:1449-62.
36. Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C and Sasaki I. Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci* 2009;100:903-13.
37. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M and Reed JC. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6:1796-803.
38. Nedelcu T, Kubista B, Koller A, Sulzbacher I, Mosberger I, Arrich F, Trieb K, Kotz R and Toma CD. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:237-44.
39. Hundsdoerfer P, Dietrich I, Schmelz K, Eckert C and Henze G. XIAP expression is post-transcriptionally upregulated in childhood ALL and is associated with glucocorticoid response in T-cell ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:260-6.
40. Sung KW, Choi J, Hwang YK, Lee SJ, Kim HJ, Kim JY, Cho EJ, Yoo KH and Koo HH. Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is an independent unfavorable prognostic factor in childhood de novo acute myeloid leukemia. *J Korean Med Sci* 2009;24:605-13.
41. Eschenburg G, Eggert A, Schramm A, Lode HN and Hundsdoerfer P. Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF- α -independent apoptosis. *Cancer Res* 2012;72:2645-56.
42. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X and Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;408:1008-12.
43. Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
44. Gaither A, Porter D, Yao Y, Borawski J, Yang G, Donovan J, Sage D, Slisz J, Tran M, Straub C, Ramsey T, Iourgenko V, Huang A, Chen Y, Schlegel R, Labow M, Fawell S, Sellers WR and Zawel L. A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor- α signaling. *Cancer Res* 2007;67:11493-8.

45. Petersen SL, Wang L, Yalcin-Chin A, Li L, Peyton M, Minna J, Harran P and Wang X. Autocrine TNF α signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell* 2007;12:445-56.
46. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM and Vucic D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 2007;131:669-81.
47. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL and Silke J. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 2007;131:682-93.
48. Probst BL, Liu L, Ramesh V, Li L, Sun H, Minna JD and Wang L. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner. *Cell Death Differ* 2010;17:1645-54.
49. Gyrd-Hansen M and Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:561-74.
50. Greer RM, Peyton M, Larsen JE, Girard L, Xie Y, Gazdar AF, Harran P, Wang L, Brekken RA, Wang X and Minna JD. SMAC mimetic (JP1201) sensitizes non-small cell lung cancers to multiple chemotherapy agents in an IAP-dependent but TNF- α -independent manner. *Cancer Res* 2011;71:7640-8.
51. Loder S, Fakler M, Schoeneberger H, Cristofanon S, Leibacher J, Vanlangenakker N, Bertrand MJ, Vandenabeele P, Jeremias I, Debatin KM and Fulda S. RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization of childhood acute leukemia cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Leukemia* 2012;26:1020-9.
52. Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Lu J, Meagher JL, Yang CY, Qiu S, Tomita Y, Ueda Y, Jiang S, Krajewski K, Roller PP, Stuckey JA and Wang S. Design, synthesis, and characterization of a potent, nonpeptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP. *J Am Chem Soc* 2007;129:15279-94.
53. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM and Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem* 2007;282:30718-27.

54. Matzinger O, Viertl D, Tsoutsou P, Kadi L, Rigotti S, Zanna C, Wiedemann N, Vozenin MC, Vuagniaux G and Bourhis J. The radiosensitizing activity of the SMAC-mimetic, Debio 1143, is TNF α -mediated in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 2015;116:495-503.
55. Yang D, Zhao Y, Li AY, Wang S, Wang G and Sun Y. Smac-mimetic compound SM-164 induces radiosensitization in breast cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:189-99.
56. Stadel D, Cristofanon S, Abhari BA, Deshayes K, Zobel K, Vucic D, Debatin KM and Fulda S. Requirement of nuclear factor kappaB for Smac mimetic-mediated sensitization of pancreatic carcinoma cells for gemcitabine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2011;13:1162-70.
57. Fulda S. Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2015;21:5030-6.
58. Berenbaum MC. A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *The journal of infectious disease* 1978;
59. Hehlhans S, Oppermann J, Reichert S, Fulda S, Rodel C and Rodel F. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis. *Radiat Oncol* 2015;10:198.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie-Sophie Erdmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Sensitivierung von Osteosarkomzellen für Strahlen- und Chemotherapie durch das *SMAC mimetic* LCL161“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Danksagung

Ich danke Patrick Hundsdörfer für die intensive Betreuung der Doktorarbeit neben der fordernden klinischen Tätigkeit.

Ich danke Jutta Proba und Karin Schmelz für die alltägliche angenehme Begleitung im Labor und für die Unterstützung bei den Unwegsamkeiten der Methodik.

Ich danke der AG Integrative Medizin für die Zurverfügungstellung der Osteosarkomzelllinien und die Unterstützung bei der Planung der Mausversuche.

Ich danke Christoph Harms und Christian Hoffmann für die hochwertige Einführung in die experimentelle Forschung und eine breite Methodenvielfalt.

Ich danke Nils und dem Rest meiner Familie für die motivationale Unterstützung, die mich trotz klinischer Tätigkeit und Familiengründung bis zum Ende dieser Arbeit getragen hat.

Ich danke meiner Tochter Awa-Mai für eine schöne, unbeschwerliche Schwangerschaft, die mir erst die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat.