

# DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



**Zielgerichtete Therapie  
beim Mantelzell- und Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom  
– Smac (second mitochondria derived activator of caspases) Mimetics und  
die Beeinflussung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs**

Victoria Leonie Christine Hoffmann

aus Lörrach

2023

---

**Aus der Experimentellen Leukämie und Lymphom Forschung (ELLF)**  
**Arbeitsgruppe: Prof. Dr. M. Dreyling**  
**Medizinische Klinik und Poliklinik III der Universität München**  
**Direktor: Prof. Dr. Dr. M. von Bergwelt**

**Zielgerichtete Therapie beim Mantelzell-  
und Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom**  
**– Smac (second mitochondria derived activator of  
caspases) Mimetics und die Beeinflussung  
des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs**

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Victoria Leonie Christine Hoffmann

aus Lörrach

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ralf Schmidmaier PD Dr. Klaus Dornmair
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Andrea Mayer
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	20.04.2023

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

*„Zielgerichtete Therapie beim Mantelzell- und Diffus groß-zelligen B-Zell-Lymphom – Smac (second mitochondria derived activator of caspases) Mimetics und die Beeinflussung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs“*

selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.07.2023  
(Ort, Datum)

Victoria Leonie Christine Hoffmann  
(Doktorand)

*„Es ist keine Schande nicht zu wissen,  
wohl aber, nichts lernen zu wollen.“*  
Platon

# Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Non-Hodgkin-Lymphom .....	1
1.1.1 DLBCL .....	1
1.1.2 MCL .....	2
1.2 B-Lymphozyten.....	3
1.2.1 Reifung der B-Zelle .....	3
1.2.2 Der B-Zell-Rezeptor Signalweg.....	6
1.3 Lymphom-Pathogenese und der B-Zell-Rezeptorsignalweg.....	8
1.3.1 Pathomechanismus des BZR-Signalweg beim Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom .....	9
1.3.2 Pathomechanismus des BZR-Signalwegs beim MCL.....	10
1.4 Zelltod.....	11
1.4.1 Apoptose.....	12
1.4.1.1 Intrinsischer Signalweg .....	13
1.4.1.2 Extrinsischer Signalweg .....	14
1.4.1.3 Gemeinsame Endstrecke der Signalwege .....	14
1.4.1.4 Andere Zelltodarten.....	14
1.5 Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAPs) .....	15
1.5.1 IAPs in der Apoptose .....	16
1.5.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg und der Einfluss der IAPs auf diesen.....	17
1.5.3 Tumorgenese durch IAPs und Perspektiven.....	20
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1 Material.....	23
3.1.1 Zelllinien.....	23
3.1.2 Medikamente .....	24
3.1.3 Lösungen und Chemikalien.....	25

3.1.4	Antikörper.....	26
3.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	27
3.1.6	Geräte.....	28
3.1.7	Software.....	28
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Zellkulturbedingungen.....	29
3.2.1.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
3.2.2	Vi-Cell Zellzählung .....	30
3.2.3	Viabilitätsassay mittels Enzymnachweis .....	30
3.2.3.1	Methode zur quantitativen Definition eines Synergismus bei Inhibitor-kombinationen: Kombinationsindex nach Chou-Talalay .....	32
3.2.4	Western Blot .....	32
3.2.4.1	Proteinlyse .....	32
3.2.4.2	Bradford Assay.....	33
3.2.4.3	Herstellung von Gelen.....	33
3.2.4.4	Gelelektrophorese .....	34
3.2.4.5	Blotting .....	34
3.2.4.6	Belichtung der Membranen .....	34
3.2.5	Durchflusszytometrie und Zelltodanalyse.....	35
3.2.5.1	Anfärbung mittels Annexin V und 7-AAD.....	35
3.2.5.2	Erfassung des spezifischen Zelltods .....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1	Zytotoxizität der Smac Mimetics .....	37
4.1.1	Smac Mimetics induzieren IAP-Degradation.....	37
4.1.2	Smac Mimetics rufen eine dosisabhängige Zytotoxizität hervor, insbesondere im ABC-Subtyp .....	39
4.1.3	Zelltod durch Smac Mimetics ist zeitabhängig .....	40
4.2	Zelltodmechanismen unter Smac-Mimetics-Therapie.....	42
4.2.1	BV-6 führt zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose in den Zelllinien.....	42
4.2.2	Zellrettung durch Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor .....	44
4.2.3	Smac Mimetics führen zur Spaltung von Caspasen und PARP ...	45
4.3	Aktivierung des nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Smac Mimetics in allen Zelllinien .....	47
4.4	Kombinationstherapien mit Smac Mimetics .....	49

4.4.1	Ibrutinib eignet sich bei Maver-1 und Mino für die Kombinationstherapie .....	50
4.4.2	Venetoclax in Kombination mit Smac Mimetics führt zur PARP-Inaktivierung.....	51
4.4.3	Chemotherapeutika und Immuntherapie rufen in Kombination mit Smac Mimetics signifikant erhöhte Zelltodrate hervor .....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
5.1	Smac Mimetics vermitteln vor allem eine Degradation der cIAPs.....	56
5.2	Einfluss der niedermolekularen Struktur der SMs auf die Effektstärke ...	57
5.3	Wirkmechanismen der SMs in Lymphomzelllinien.....	58
5.4	Resistenzmechanismen der Zelllinien Rec-1 und Ula .....	59
5.5	SMs-induzierter Zelltod ist Apoptose-vermittelt .....	59
5.6	Induktion des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs und gleichzeitige Hemmung der cIAPs führt zu Zelltod .....	61
5.7	Kombinationstherapien zeigen Effektivität.....	62
5.7.1	SMs und Ibrutinib-vermittelter Zelltod unterscheidet sich zwischen MCL und ABC-DLBCL.....	62
5.7.2	Venetoclax und SMs zeigen sich in BCL-2-mutierten Zelllinien als besonders effektiv .....	63
5.7.3	Smac Mimetics sensitivieren für Chemotherapeutika.....	63
5.8	Ausblick .....	64
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>87</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>88</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	B-Zell-Rezeptor-Signalweg.....	7
Abb. 2:	Apoptose .....	12
Abb. 3:	IAPs.....	16
Abb. 4:	NF- $\kappa$ B-Signalweg .....	18
Abb. 5:	Western Blot zur Darstellung der IAP-Degradation nach Behandlung mit Smac Mimetics .....	38
Abb. 6:	Dosisabhängige Zytotoxizität nach Behandlung mit Smac Mimetics .....	40
Abb. 7:	Zeitabhängige Zytotoxizität nach Behandlung mit Smac Mimetics.....	41
Abb. 8:	Darstellung von Apoptose und Zelltod nach Behandlung mit Smac Mimetics .....	43
Abb. 9:	Darstellung des Zelltodverhaltens nach Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor/ RIP1-Kinase-Inhibitor .....	44
Abb. 10:	Western Blot zur Darstellung der Zelltodmechanismen nach Behandlung mit Smac Mimetics .....	46
Abb. 11:	Western Blot zur Darstellung der NF- $\kappa$ B Aktivierung nach Behandlung mit Smac Mimetics .....	48
Abb. 12:	Zelltod nach Kombinationsbehandlung mit BTK-Inhibitor und Smac Mimetics .....	51
Abb. 13:	Western Blot zur Darstellung der Zelltodmechanismen nach Behandlung mit BCL-2-Inhibitor und Smac Mimetics .....	52
Abb. 14:	Durchflusszytometrische Darstellung des Zelltods nach Kombinationsbehandlung mit BCL-2-Inhibitor und Smac Mimetics/ Chemotherapeutika und Smac Mimetics .....	55

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zelllinien .....	23
Tab. 2:	Medikamente .....	24
Tab. 3:	Lösungen und Chemikalien .....	25
Tab. 4:	Antikörper .....	26
Tab. 5:	Verbrauchsmaterialien .....	27
Tab. 6:	Geräte .....	28
Tab. 7:	Software .....	28
Tab. 8:	Zellzahlverdünnung in der Zellkultur.....	29
Tab. 9:	Zellzahlverdünnung im WST-1-Assay .....	31
Tab. 10:	Beispielhafte Darstellung eines Versuchsansatzes im WST-1-Assay .....	31
Tab. 11:	Zusammensetzung der 10 %- bzw. 12 %-Polyacrylamidgele.....	33
Tab. 12:	Anfärbung der Zellen je nach Zustand .....	36

## Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ABC	Activated B-Cell
ABT-199	Venetoclax
Ag	Antigen
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	Cytarabin
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCL	B-cell-lymphoma
BCL2A1	Bcl-2-related protein A1
BH3	BCL-2-homology domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIK	Bcl-2-interacting killer
Bim	BH3 interacting motif
BIR	Baculovirus IAP Repeat Domain
BLK	B-Lymphozyten Kinase
BLNK	B-cell linker Protein
BMF	Bcl-2-modifying factor
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BTK	Bruton's Tyrosin-Kinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Constant
CARD	Caspase-rekrutierende Domäne
CARMA	CARD containing MAGUK Protein 1
Caspase	CysteinyI-aspartate specific protease (Cysteinprotease)
CBBG	Coomassie Brilliant-Blau G250

---

CBM	CARMA1-BCL-10-MALT1
CD	Cluster of Differentiation
CI	Combination Index
clAP	cellular IAP
CIN85	Cbl-interacting protein of 85 kDa
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
D	Diversity
DD	Death domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DZ	Dunkle Zone; dark zone
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENDO G	Endonuklease G
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain containing protein
FDZ	Follikuläre dendritische Zelle
FKS	Fetales Kälberserum
FLIP	FADD-like-inhibitory protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Germinal center
GCB	Germinal center B-cell like
HCV	Hepatitis-C-Virus
HRK	HARAKIRI
HTRA2	High-temperature requirement protein A2
IAP	Inhibitoren der Apoptose-Proteine
IBM	IAP-binding motif
ICAD	Inhibitoren der Caspase-aktivierten DNase
Ig	Immunglobulin
IGHV	Immunoglobulin heavy chain variable

---

IKK	Inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B-kinase subunit
IL	Interleukin
ILP2	IAP-like protein 2
IPI	Internationaler Prognostischer Index
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
I $\kappa$ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
J	Joining
JÜR	Jahres-Überlebens-Rate
Ki-67	Kiel-67
L	Ligand
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LF	Low fluorescence
LRR	Leucine-rich repeat domain
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
LZ	Light zone
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL	Mantle cell lymphoma
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIPI	MCL Internationaler Prognose Index
ML-IAP	Melanoma IAP
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytomatosis
NACHT	Domäne in NAIP; MHC II Transkriptionsaktivator; 20-Hydroxyeicosa-tetraenoische-Säure-Synthase; Transitionsprotein 1
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NEMO	NF- $\kappa$ B-essentieller-Modulator
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells

---

NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase
NOXA	Phorbol-12-myristat-13-acetat-induziertes Protein 1
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Phosphatase-Inhibitor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase
PMBL	Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAG	Recombination-activating genes
Ras	Rat sarcoma
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
RING	Really interesting new gene
RIP1	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Protein-Kinase
SCF	SKP1/CUL1/F-box
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFK	Kinasen der Src-Familie
SM	Smac Mimetics
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOX1	SRY-Box Transcription Factor 1
Src	Sarcoma
Syk	Spleen tyrosine kinase
TAB-1	TAK-1 bindendes Protein
TAK	TGF $\beta$ -aktivierte Kinase
tBid	truncated Bid
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamin
THL	Triple-Hit Lymphom

---

TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRADD	Tumor necrosis factor receptor associated death domain
TRAF	Tumor necrosis factor receptor associated factors
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBA	Ubiquitin-assoziierte Domäne
UBC	Ubiquitin-conjugation domain
V	Variable
WB	Western Blot
WST	Water-soluble-Tetrazolium
XIAP	X chromosome-linked IAP
zVAD	N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)-fluormethylketon (zVAD-fmk)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Non-Hodgkin-Lymphom

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind eine heterogene Gruppe, die sich weiterhin nach Zellart (B- oder T-Zelle) und nach dem Grad der Malignität (indolent oder aggressiv) einteilen lassen (Swerdlow et al., 2017). Mit über 90 % stellen die B-Zell-NHL den weitaus größeren Anteil, wobei vermutet wird, dass sich dies auf die besondere Entwicklung der B-Zellen zurückführen lässt (Küppers, 2005).

Die NHL sind in Europa die häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen (Sant et al., 2014) und rangieren mit einer Inzidenz von 11,4/100.000 bei Frauen beziehungsweise 16,6/100.000 bei Männern im Jahr 2018 auf respektive Platz Nr. 7 und Nr. 6 der Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Es erkrankten in Deutschland laut Robert Koch-Institut im Jahr 2018 über 10.000 Männer und knapp 8.300 Frauen an einem NHL. Mit einer 10-Jahres-Überlebensrate (JÜR) von 64 % liegen die NHL im Mittelfeld (Robert Koch-Institut, 2018). Die Mortalität der NHL betrug im Jahr 2020 weltweit 2,6/100.000 Einwohner und landet damit auf Platz Nr. 11 aller Krebserkrankungen. Die Mortalität in Deutschland ähnelt zudem der weltweiten Statistik der NHL (WHO and International Agency for Research on Cancer (IRAC), 2020).

### 1.1.1 DLBCL

Das Diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) stellt mit etwa einem Drittel aller NHL die häufigste Subgruppe dar (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). Der Name leitet sich aus der histologischen Beschreibung diffus proliferierender, großer maligner Zellen ab und ist der Überbegriff einer heterogenen Gruppe, die sich in weitere Subtypen gliedern lässt (Swerdlow et al., 2017). Das mediane Erkrankungsalter beim DLBCL beträgt etwa 64 Jahre, Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen (Freedman, Jacobson, Mauch, & Jon, 2020). Das Ausmaß der Erkrankung wird über die Ann-Arbor-Klassifikation erfasst. Die prognostische Einteilung erfolgt über den International Prognostic Index (IPI). Dieser setzt sich aus dem Alter des Patienten, seinem Allgemeinzustand, dem Ann-Arbor-Stadium sowie dem extranodalen Befall und dem prätherapeutischen LDH-Level zusammen (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). Ein unabhängiger, negativ prognostischer Faktor ist außerdem das Auftreten einer



„bulky disease“, sowie der Aktivierte-B-Zell (ABC)-Subtyp (s. u.). Unabhängig von Prognose und Stadium basiert die Therapie auf dem R-CHOP-Schema (Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunomycin = Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon), welches dosis- und frequenzadaptiert primär kurativ angewandt wird (Pfreundschuh, 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich seit der Einführung von Rituximab, einem CD20-Antikörper, stark verbessert und führte in Kombination mit dem CHOP-Schema zu einer verminderten Mortalität ohne weitere schwerwiegende Nebenwirkungen (Coiffier et al., 2002). Lag die 5-JÜR Ende der 90er-Jahre in Europa noch bei 42 %, ließ sie sich bis 2008 auf über 55 % steigern (Sant et al., 2014). Die Gesamt-Heilungsrate der DLBCL in Deutschland liegt mittlerweile zwischen 60–70 % (Lenz, Chapuy, Bertram et al., 2021). Nichtsdestotrotz bleibt das DLBCL ein überaus aggressives Lymphom.

### 1.1.2 MCL

Das Mantelzelllymphom (MCL) macht etwa 6–8 % der NHL aus und hat eine Inzidenz von etwa 0,5/100.000 Einwohner. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei über 70 Jahren. Männer sind deutlich häufiger vom MCL betroffen (Cortelazzo, Ponzoni, Ferreri, & Dreyling, 2020). Pathohistologisch wird es den indolenten Lymphomen zugeordnet, hat jedoch einen aggressiven klinischen Verlauf mit einer medianen Überlebenszeit von 3–5 Jahren ((Armitage, 1997), (Herrmann et al., 2009), (Dreyling, Buske, Cairoli et al., 2021)). Inzwischen werden in der WHO-Klassifikation zwei verschiedene Subtypen unterschieden: das klassische, nodale MCL, welches einen eher aggressiven Verlauf zeigt und das nicht-nodale, leukämische MCL mit einem eher indolenten Verlauf (Swerdlow et al., 2017).

Die Stadieneinteilung erfolgt auch hier anhand der Ann-Arbor-Klassifikation. Der Prognose-Index für das MCL (Mantle Cell International Prognostic Index = MIPI) beinhaltet als Risikofaktoren das Alter der Patienten, den Allgemeinzustand, das prätherapeutische LDH-Level sowie die Leukozyten-Zahl und – im Rahmen des „Biologic MIPI“ – den Proliferationsmarker Ki-67 (Hoster et al., 2008). Bei einer medianen Überlebenszeit von maximal fünf Jahren nach Diagnose erfolgt die Chemotherapie mit dem Ziel der Verlängerung der Überlebenszeit beziehungsweise in palliativer Absicht. Je nach Allgemeinzustand und Alter der Patienten werden sehr unterschiedliche Therapiestrategien verfolgt. Diese rangieren von „watch & wait“-Strategien bis hin zur aggressiven Chemotherapie mit Stammzelltransplantation. Der Ein-

schluss in Therapiestudien wird empfohlen (Dreyling, Buske, Cairoli et al., 2021). Vor allem im Frührezidiv ist der Einsatz von zielgerichteten Medikamenten, wie beispielsweise Ibrutinib, die auf den B-Zell-Rezeptor(BZR)-Signalweg Einfluss nehmen, gebräuchlich (M. Dreyling, Schnaiter, Schmidt, & Hoster, 2016). Doch auch wenn die Anwendung dieser „small molecules“ den Weg in die richtige Richtung weist, besteht Bedarf an gezielteren Therapien aufgrund der weiterhin schlechten Prognose (Schieber, Gordon, & Karmali, 2018).

## 1.2 B-Lymphozyten

Der B-Lymphozyt ist die Ursprungszelle der malignen B-Zell-Lymphome und ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Er übernimmt Funktionen in der Erkennung und Markierung von körperfremden Antigenen sowie der Bildung von Antikörpern. Der Name „Gedächtniszelle“ lässt dabei anklingen, welchen Wert diese Zelle für unser Immunsystem über den Lauf unseres Lebens hat. Zum besseren Verständnis der Pathogenese der B-Zell-NHL ist im Folgenden die physiologische Entwicklung, ihre Aktivierung und der BZR-Signalweg der B-Zelle dargestellt.

### 1.2.1 Reifung der B-Zelle

Die B-Zelle entsteht im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Im Rahmen der Lymphopoese durchlaufen die lymphatischen Vorläuferzellen mehrere Entwicklungsstufen und Selektionsprozesse, von der frühen und späten Pro-B-Zelle über die große und kleine Prä-B-Zelle bis hin zur unreifen B-Zelle. Die unreife Zelle wandert dann in sekundäre lymphatische Organe aus und kann dort reifen.

Zur Ausbildung eines B-Lymphozyten ist ein funktionsfähiger B-Zell-Antigen-Rezeptor (BZR) nötig (Lam, Kühn, & Rajewsky, 1997; Turner et al., 1995). Dieser besteht unter anderem aus einem Immunglobulin(Ig)-Molekül, welches sich aus zwei identischen schweren (Ig-Heavy) und leichten (Ig-Light) Polypeptidketten zusammensetzt. Beide enthalten sowohl konstante (C) als auch variable Domänen (V). Die variable Domäne ist für die Antigenpezifität eines Immunglobulins wichtig (Hozumi & Tonegawa, 1976). Hierfür durchläuft die B-Zelle zwei wichtige Checkpoints: den prä-BZR und den BZR.

In der Entwicklung der B-Zelle erfolgt der Prozess der somatischen Rekombination, welcher eine Vielfalt von etwa  $10^{11}$  (100.000.000.000) verschiedenen Antigenrezept-

toren ermöglicht (Murphy & Weaver, 2018). Für die schweren Ketten werden die verschiedenen Gensegmente D (diversity), J (joining), C (constant) und V (variable) durch die Gene RAG-1 und -2 in unterschiedlichen Konstellationen zufällig miteinander rekombiniert (somatische Rekombination; McBlane et al., 1995; Oettinger, Schatz, Gorka, & Baltimore, 1990). Gleiches gilt für die leichten Ketten, jedoch ohne die D-Gensegmente. Im Entwicklungsstadium der Pro-B-Zelle wird geprüft, ob eine funktionsfähige schwere Kette für die Immunglobulin-Bildung vorliegt. Im sogenannten Prä-B-Zell-Rezeptor wird die entstandene schwere Kette (auch  $\mu$ -Kette genannt) an der Oberfläche exprimiert. Das erfolgreiche Erreichen dieses ersten Checkpoints wird „produktive Umlagerung“ genannt und sichert das Überleben der Zelle. Anschließend erfolgt der Übergang von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle (Loffert, Schaal, Ehlich, & Hardy, 1994; Rajewsky, 1996).

Nach weiteren Schritten entsteht die noch unreife B-Zelle mit unreifem B-Zell-Rezeptor, einem membranständigen IgM-Rezeptor. Dieser stellt den zweiten Checkpoint dar (Rajewsky, 1996). Bevor die unreifen B-Zellen auswandern dürfen, selektioniert das Immunsystem im Knochenmark autoreaktive B-Zellen aus (negative Selektion), indem es ihnen Autoantigene präsentiert. Zellen, die darauf reagieren, leiten die Apoptose ein oder verändern die Zusammensetzung ihrer Leichtketten am Rezeptor (Rezeptoreditierung). So soll verhindert werden, dass sich autoimmune Zellen im Körper ausbreiten und zu Autoimmunkrankheiten führen (Yurasov & Nussenzweig, 2007). Anschließend erfolgt die Ausschleusung der selbsttoleranten B-Zellen aus dem Knochenmark in die sekundären lymphatischen Organe. Pro Tag sind dies beim Erwachsenen etwa 5–10 % der Gesamtpopulation der B-Lymphozyten (Murphy & Weaver, 2018). Die unreifen/transitionalen Zellen siedeln sich nun in der Milz an, um zu überleben und zu reifen (Loder et al., 1999). Hierfür benötigen sie überlebenswichtige Signale ihres BZR sowie ihres B-Zell-aktivierenden Faktor-(BAFF)-Rezeptors (Loder et al., 1999; Mackay & Browning, 2002; Yan et al., 2001). Bei Vorliegen der Signale durchläuft die Zelle mehrere transitionale Stadien. Zuerst entsteht die T1-Zelle im primären Follikel. Wenn sie aufgrund der äußeren Signale beginnt, CD21 zu exprimieren, geht sie in das T2-Stadium über. Bei Erhalt weiterer stimulierender Signale exprimiert sie anschließend auch IgD auf ihrer Zelloberfläche. Eine reife, naive B-Zelle ( $\text{IgM}^+\text{IgD}^+$ ) ist entstanden (Loder et al., 1999).

Die B-Zell-Aktivierung der naiven B-Zelle findet in den sekundären lymphatischen Organen statt. Dazu gehören die Milz, Lymphknoten, Tonsillen sowie die Peyers-Plaques und MALT. Hier siedeln sich die IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen in Follikeln an. Bei Kopplung eines nativen Antigens an den B-Zell-Rezeptor wird die B-Zelle aktiviert. Moduliert wird die Kopplung über den Co-Rezeptor bestehend aus CD 19, 21 und 81. Das Antigen wird zunächst signalvermittelt endozytotisch aufgenommen, prozessiert und die Fragmente an MHC-II präsentiert, woraufhin eine T-Helferzelle bindet. Die Interaktion der beiden Zellen führt zur Expressierung verschiedener Rezeptoren und Liganden an den jeweiligen Zelloberflächen, unter anderem der CD40L auf der T- und CD40 auf der B-Zelle (Murphy & Weaver, 2018).

Im Rahmen der Antigenkopplung und B-Zell-Aktivierung kommt es zur Bildung eines Keimzentrums (GC). Histomorphologisch wird eine dunkle Zone (DZ) mit proliferierenden B-Zellen von einer hellen Zone (LZ) unterschieden, die vor allem B-Zellen, follikuläre dendritische Zellen (FDZ) und T-Helfer-Zellen enthält und hier die Antigenexposition und damit die Aktivierung sowie die Selektion der B-Zellen ermöglicht. Das Keimzentrum ist von der Mantelzone umgeben, die Mantel-Zellen enthält, welche reife, naive B-Zellen darstellen. Die B-Zell-Aktivierung führt zur Proliferationsinduktion und zur klonalen Expansion und findet in der dunklen Zone statt (Maclennan, 1994; Victora & Nussenzweig, 2012; Victora et al., 2010). Hier erfolgt außerdem der wichtige Prozess der somatischen Hypermutation. Durch eine hohe Anzahl an Mutationen in den variablen Gensegmenten des Immunglobulins während der Replikation der GCB kann eine Steigerung der Affinität für bestimmte Antigene erreicht werden. Es kann aber auch zum Einbau eines Stopp-Codons und zur Apoptose der Zelle führen (Küppers, Zhao, Hansmann, & Rajewsky, 1993). Die Mutationsrate beträgt dabei  $10^3$  pro Basenpaar und ist damit  $10^6$ -mal so hoch wie bei der normalen somatischen Mutation (Mckean et al., 1984; Victora & Nussenzweig, 2012). Für die B-Zellen, die ihre Affinität für die präsentierten Antigene steigern können, wird in der hellen Zone positiv selektioniert (Affinitätsreifung) (Rajewsky, 1996). In Interaktion mit T-Helfer-Zellen und follikulären dendritischen Zellen wird – je nach Interleukin(IL)-Ausschüttung der T-Zelle – anschließend ein spezifischer Ig-Klassenwechsel erreicht. Die B-Zelle kann sich nachfolgend zur Gedächtniszelle oder zur Antikörpersezernierenden Plasmazelle entwickeln (Küppers, 2005).

Es wurde mittlerweile im Mausmodell gezeigt, dass der BZR nicht nur zur Entwicklung der B-Zelle wichtig ist, sondern auch für die reife B-Zelle Signale zum Überleben

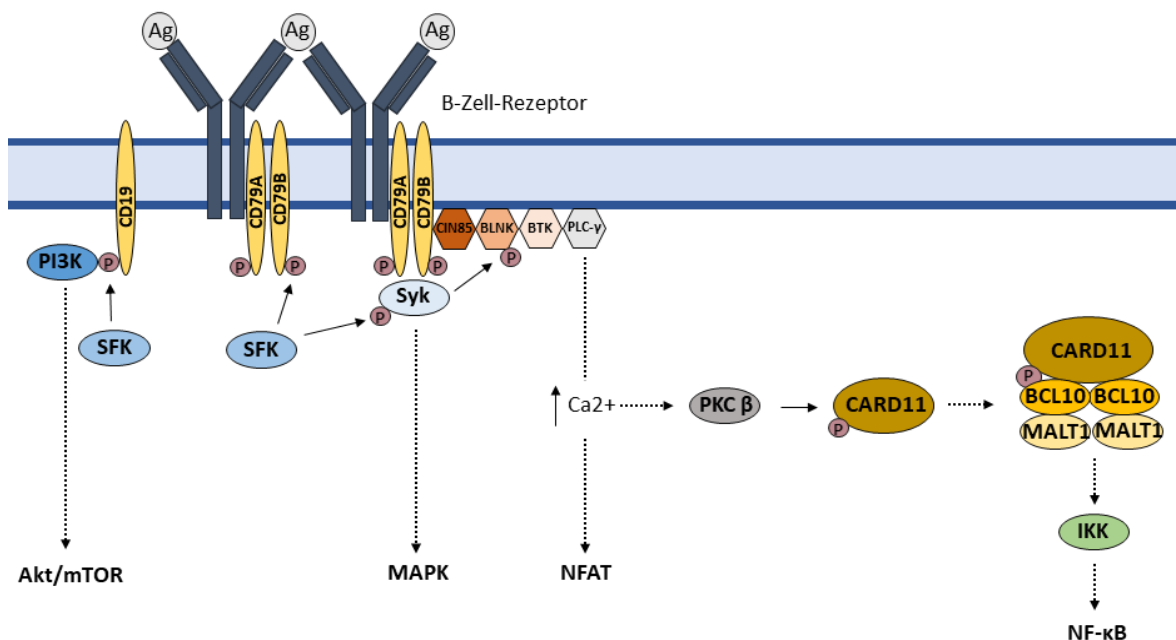
und zur Proliferation übermittelt. Ohne den BZR gingen die B-Zellen in den Versuchen nach drei bis sechs Tagen zugrunde. Im Gegensatz zu der bisher genannten B-Zell-Aktivierung handelt es sich dabei aber nicht um eine antigenvermittelte, sondern eine „tonische“ Aktivierung (Kraus, Alimzhanov, Rajewsky, & Rajewsky, 2004; Lam et al., 1997).

### 1.2.2 Der B-Zell-Rezeptor Signalweg

Ein genauere Blick auf den B-Zell-Rezeptor und seinen Signalweg ist für das Verständnis der B-Zelle und ihre Entartung notwendig und wird in einem Review von Young & Staudt aus dem Jahr 2013 dargelegt. Der B-Zell-Rezeptor besteht aus einem membrangebundenen Immunglobulin und zwei Immunglobulinketten, Ig- $\alpha$  (CD79a) und Ig- $\beta$  (CD79b). Diese Ketten besitzen zytoplasmatische Domänen mit ITAM-Sequenzmotiven, die freie Tyrosinreste haben, an die bei Aktivierung des Rezeptors gebunden werden kann (Flaswinkel, 1994; Reth, 1995). Kommt es zum Eindringen von körperfremden Organismen, bindet die naive B-Zelle ein Antigen über ihren BZR. Dies setzt auf zellulärer Ebene den angesprochenen Signalweg in Gang. Durch die Kopplung werden die Tyrosinreste der ITAMs durch Kinasen der Src-Familie (LYN; FYN und BLK) phosphoryliert (Saijo et al., 2003). Syk wird rekrutiert und durch ebendiese Kinasen sowie Autophosphorylierung aktiviert (Rowley, Burkhardt, Chao, Matsueda, & Bolen, 1995). Syk rekrutiert wiederum CIN85 und B-cell linker protein (BLNK) (Hashimoto et al., 1999; Oellerich et al., 2011). BLNK koordiniert daraufhin die Aktivierung von Bruton's Tyrosinkinase (BTK), die die Phospholipase (PL) -  $\text{C}\gamma 2$  phosphoryliert (Hashimoto et al., 1999; Watanabe et al., 2001). Über Katalyseschritte der  $\text{PLC}\gamma 2$  kommt es zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Watanabe et al., 2001). Daraufhin wird die Proteinkinase (PK)  $\text{C}\beta$  aktiv. Diese phosphoryliert wiederum viele verschiedene Substrate, unter ihnen die Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) 11, welche Teil eines wichtigen Adaptermoleküls, dem CARMA1-BCL-10-MALT1 (CBM) - Komplex, ist. Durch die Phosphorylierung dieser Domäne wird der NF- $\kappa$ B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Signalweg aktiviert (Shinohara et al., 2005; Thome, 2004). Das am Co-Rezeptor befindliche CD 19 wird ebenfalls durch LYN phosphoryliert und rekrutiert damit die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zum B-Zell-Rezeptor. Über weitere Phosphorylierungsschritte werden hierüber Akt und ebenfalls BTK aktiviert (Deane & Fruman, 2004). Letztendlich werden im Rahmen der BZR-

Aktivierung fünf verschiedene Signalwege in Gang gesetzt: MAPK, Ras, PI3K, NFAT und NF- $\kappa$ B (s. **Abb. 1**). Sie tragen zum Überleben und zur Proliferation der Zelle bei (Porto et al., 2004; Young & Staudt, 2013).

Im Rahmen der „tonischen“ (nicht antigenvermittelten) Aktivierung wird vermutet, dass der PI3K-Signalweg eine wichtige Rolle spielt. In Versuchen wurden Mäuse gezüchtet, deren B-Zellen keinen funktionsfähigen BZR ausbilden konnten. Deren Überleben konnte jedoch durch konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalweges gesichert werden. Im Gegensatz dazu hatte die konstitutive Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-, des MAPK- oder des RAS-Signalweges nicht diesen Effekt (Srinivasan et al., 2009).



### Abb. 1: B-Zell-Rezeptor-Signalweg

In der Abbildung wird der B-Zell-Rezeptor-Signalweg dargestellt. Bei Bindung eines Antigens (Ag) an den B-Zell-Rezeptor (BZR) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztendlich fünf verschiedene Signalwege auslöst. Die an den BZR gebundenen Immunglobulinketten CD 79A und B werden durch Kinasen der Src-Familie (SFK) phosphoryliert, was zur Rekrutierung sowie (Auto-) Phosphorylierung der spleen's tyrosine kinase (Syk) führt. Über diese resultiert die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges. Weiterhin resultiert die Aktivierung von Syk in der Bindung von CIN85 sowie BLNK, welche wiederum die Bruton's Tyrosinkinase (BTK) aktivieren. Über Katalyseschritte von Phospholipase C  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) kommt es zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Ca<sup>2+</sup>), die wiederum die Aktivierung von NFAT und der Proteinkinase C  $\beta$  (PKC  $\beta$ ) auslöst. PKC  $\beta$  phosphoryliert CARD11, woraufhin sich der CARD11-BCL10-MALT1(CBM)-Komplex bildet, der über Phosphorylierungsschritte IKK aktiviert und damit den NF- $\kappa$ B-Signalweg in Gang setzt. Zudem wird über die SFKs auch der Co-Rezeptor CD19 phosphoryliert. PI3K wird rekrutiert und induziert Akt und mTOR. Dieser Signalweg trägt außerdem zur tonischen B-Zell-Aktivierung bei.

BCL10 (B-cell-lymphoma), BLNK (B-cell linker Protein), CARD11 (Caspase-rekrutierende Domäne), CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa), IKK (Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$  B-kinase subunit), MALT1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein), MAPK (Mitogen-activated

protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), NF- $\kappa$ B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase).

Abbildung adaptiert aus Targeting pathological B-cell-receptor signalling in lymphoid malignancies, Young & Staudt (2013).

### 1.3 Lymphom-Pathogenese und der B-Zell-Rezeptorsignalweg

Histologische, immunphänotypische sowie genetische Analysen der B-Zell-NHL haben bewirkt, dass man sie verschiedenen Stufen im Reifungs- und Aktivierungsprozess der B-Zelle zuordnen kann. Es hat sich dabei gezeigt, dass die meisten B-Zell-NHL sich in Stadien der Keimzentrumsentwicklung oder danach befinden. Dies lässt darauf schließen, dass die im Keimzentrum stattfindenden Reaktionen wie klonale Expansion, somatische Hypermutation und der Ig-Klassenwechsel eine große Rolle für die Pathogenese von Lymphomen spielen (Küppers, Klein, Hansmann, & Rajewsky, 1999; Nussenzweig & Nussenzweig, 2010; Shaffer, Rosenwald, & Staudt, 2002). Eine Ausnahme stellt hierbei beispielsweise das Mantelzelllymphom dar, da Untersuchungen der definierenden Translokation t(11;14) gezeigt haben, dass diese vermutlich schon während der frühen somatischen Rekombination im Knochenmark stattfindet (Welzel et al., 2001).

Viele B-Zell-NHL, darunter auch das Mantelzell- und das Diffus großzellige B-Zell-Lymphom exprimieren konstitutiv den BZR (Küppers, 2005). Hierbei werden verschiedene Mechanismen als ursächlich angesehen: Aktivierung der B-Zelle durch Antigene (z. B. bei Hepatitis-C-Virus-assoziierten B-NHL, (Marcucci & Mele, 2011; Quinn et al., 2001)), chronische Aktivierung (z. B. beim ABC-Subtyp des DLBCL, (Davis et al., 2010)) sowie eine Art der tonischen Aktivierung (z. B. beim Burkitt-Lymphom, (Rui, Schmitz, Ceribelli, & Staudt, 2011)) (Valla, Flowers, & Koff, 2019; Young, Phelan, Wilson, Staudt, & Branch, 2020; Young & Staudt, 2013). Viele B-Zell-Lymphome nutzen für ihren B-Zell-Rezeptor konstante Regionen des „naiven“ IgM, obwohl sie differenziert genug sind, um ein IgG auszubilden (Rui et al., 2011). Young & Staudt (2013) postulieren, dass sich dies möglicherweise damit erklären lässt, dass die Signale des IgM-Rezeptors für die Proliferation und das Überleben der Zelle sorgen und die des IgG-Rezeptors im Gegensatz dazu die weitere Differenzierung der B-Zelle voranbringen würde. Es soll nun ein noch genauerer Blick auf die Pathomechanismen der beiden oben genannten Lymphomtypen geworfen werden.

### 1.3.1 Pathomechanismus des BZR-Signalweg beim Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom

Das Diffus großzellige B-Zell-Lymphom vereint eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Es gibt einige chromosomale Translokationen, die im Rahmen eines DLBCL auftreten können. Dazu gehören beispielsweise BCL-6 (35 % der Fälle), BCL-2-IgH (15 % der Fälle) oder MYC-IgH/L (weitere 15 %; Küppers, 2005). Wichtig zu unterscheiden sind zwei Subtypen, die Anfang des Jahrhunderts anhand ihrer Genexpression identifiziert werden konnten: der aktivierte B-Zell-Subtyp (ABC), der etwa 30 % der DLBCLs ausmacht und der Keimzentrums-B-Zell-Subtyp (GCB), der etwa 50 % der DLBCLs ausmacht (Alizadeh et al., 2000). Später wurde auch noch das primär mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL) als dritter Subtyp identifiziert (Barth, Leithäuser, Joos, Bentz, & Möller, 2002; Lenz, Wright, et al., 2008). 15–20 % der DLBCLs können außerdem keinem der Subtypen zugeordnet werden (Young et al., 2020). Es wurde von Alizadeh et al. (2000) suggeriert, dass der ABC-Subtyp mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Dies stellt bisher prognostisch einen IPI-unabhängigen Risikofaktor dar (Pfreundschuh, 2016).

Der ABC-Subtyp exprimiert Gene, die denen peripherer B-Lymphozyten ähneln, die im Blut aktiviert werden (Alizadeh et al., 2000). Das Überleben des ABC-Subtyps wird auf die konstitutive Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs zurückgeführt. Zum einen wurde dies anhand der Hochregulation der Genexpression von NF- $\kappa$ B-transkribierten Genen wie Cyclin D2, IRF4, FLIP, BCL-2, CCR7 und I $\kappa$ B $\alpha$  gezeigt, zum anderen dadurch, dass Zelllinien des ABC-Subtyps durch Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs getötet wurden (Davis, Brown, Siebenlist & Staudt, 2001). Um den Mechanismus dieser konstitutiven Aktivierung besser zu verstehen, erfolgte der Gen-Knock-down von Bestandteilen des B-Zell-Rezeptors und von „upstream“-Kinasen, vor allem BTK. Dies führte zum Zelluntergang der ABC-Zelllinien und implizierte, dass der BZR und sein Signalweg ein notwendiges Mittel sind, um diese Lymphomzellen am Leben zu halten (Davis et al., 2010). Mittlerweile konnten einige, für die chronische Aktivierung des BZR-Signalwegs ursächliche Mutationen identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem Mutationen an CARD11 (Lenz, Davis, et al., 2008) und ITAM (Davis et al., 2010).

Bereits vor über 50 Jahren wurde das erste Mal suggeriert, dass die Reaktion mit Autoantigenen in der Entstehung von malignen hämatologischen Erkrankungen eine Rolle spielt (Dameshek & Schwartz, 1959). Es wurde nun diskutiert, ob möglicher-



weise der BZR beim ABC-Subtyp durch körpereigene Antigene aktiviert wird und ob es sich beim ABC-Subtyp um ein autoreaktives Lymphom handelt (Rui et al., 2011; Young & Staudt, 2013). Manche Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Sjögren-Syndrom konnten mit dem Auftreten eines DLBCLs assoziiert werden. Eine weitere Unterscheidung der Subtypen fand damals jedoch nicht statt (Smedby et al., 2006). Nun wurde für ABC-Subtyp-Zelllinien gezeigt, dass verschiedene Autoantigene zur Aktivierung ihres BZRs beitragen, was diese Hypothese unterstützt (Turner et al., 2020). All dies dient dem besseren Verständnis des Pathomechanismus, was zu einer immer besseren und spezifischeren Therapie beitragen soll.

Der GCB-Subtyp exprimiert Gene, die – wie der Name impliziert – der Genexpression der Keimzentrumszelle ähneln (Alizadeh et al., 2000). Der Pathomechanismus des GCB-Subtyps ließ sich bisher nicht so eindeutig auf den BZR-Signalweg zurückführen. Eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde dabei ausgeschlossen (Davis et al., 2001). Es wird bisher vermutet, dass das Überleben der GCB-Zelle durch die bereits genannte tonische Aktivierung aufrechterhalten wird und damit dem Pathomechanismus des Burkitt-Lymphoms ähnelt (Valla et al., 2019; Young & Staudt, 2013). In Versuchen sprach die GCB-Zelllinie R406 gut auf einen Syk-Inhibitor an, was die Untersuchenden auf die tonische Aktivierung zurückführten (Chen et al., 2008). In einem Review von Young et al. (2013) wurde jedoch kritisch angemerkt, dass Syk auch in anderen Signalwegen eine Rolle spielt und dass die bereits zuvor genannten Gen-Knockdown-Versuche von BZR-Bestandteilen oder Signalweg-Kinasen die Zellen des GCB-Subtyps nicht töteten (Davis et al., 2010; Mócsai, Ruland, & Tybulewicz, 2010; Young & Staudt, 2013). Gleichzeitig sind Mutationen festgestellt worden, die zur Induktion des PI3K-Signalwegs führen. Dies trägt am ehesten wiederum zur tonischen Aktivierung der B-Zelle bei (Lenz, Wright, et al., 2008). Erst vor Kurzem konnte CRISPR-Cas-vermittelt gezeigt werden, dass das Überleben von GCB-Zellen von bestimmten BCR-Bestandteilen/-kinasen (CD19 & Lyn) abhängig ist (Phelan et al., 2018). Nichtsdestotrotz lässt sich der Pathomechanismus nicht eindeutig dem BZR zuordnen.

### **1.3.2 Pathomechanismus des BZR-Signalwegs beim MCL**

Das Mantelzelllymphom ist über die chromosomale t(11;14)-Translokation definiert. Diese führt typischerweise zur Überexpression von Cyclin D1. Mittlerweile haben weitere Gene wie SOX1 und IGHV Eingang in die MCL-Diagnostik gefunden

(Swerdlow et al., 2017). Das Lymphom wird zu den reifen B-Zell-NHL gezählt und befindet sich im Reifungsprozess auf Höhe der CD5+ reifen, naiven Mantelzellen (Küppers, 2005). Anhand der IGHV-Mutation wird jedoch mittlerweile zwischen naiven MCL-Zelltypen und „keimzentrums-erfahrenen“ MCL-Zelltypen unterschieden (Queirós et al., 2018).

Auch im Falle des MCLs ist die Ätiologie des Pathomechanismus nicht geklärt. Die Rolle des BZR-Signalwegs wird im Folgenden diskutiert. Valla et al. (2019) ordnen in einem Review den Pathomechanismus der tonischen Aktivierung des BZR zu. Sie begründen dies mit Studien, die die Wichtigkeit der konstitutiven Aktivierung der Kinase Akt und damit der Enthemmung des PI3K-Signalwegs auf das Überleben von MCL-Zellen zeigen (Col et al., 2008; Rudelius et al., 2006; Valla et al., 2019). 2014 untersuchten Rahal et al. MCL-Zelllinien auf ihre Sensitivität bezüglich BTK-Inhibitoren und fanden dabei, dass sensible Zelllinien eine chronische, BZR-vermittelte, klassische NF- $\kappa$ B-Aktivierung hatten und Zelllinien, die nicht auf den Inhibitor ansprachen, den alternativen Weg als Überlebens-Signalweg nutzten (Rahal et al., 2014). Saba et al. konnten mittels genetischer Analysen zwar bestätigen, dass der BZR-vermittelte, klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg für das Überleben der MCL-Zellen notwendig ist und eine höhere BZR-Expression sogar mit einem schlechteren Ansprechen auf die zytotoxische Therapie einhergeht, jedoch nicht die vormals erklärte Resistenz durch Nutzung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Saba et al., 2016). Diese Entdeckungen suggerieren insgesamt eher eine chronische Aktivierung des BZR, ähnlich dem ABC-Subtyp.

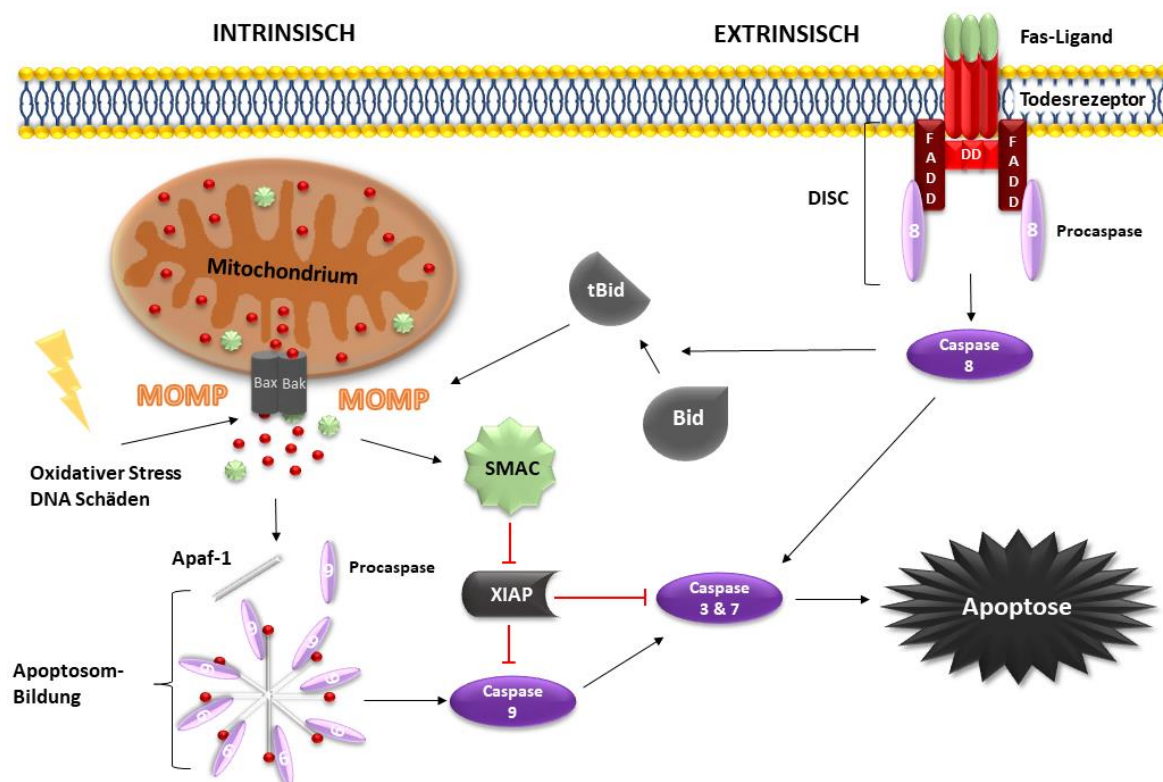
## 1.4 Zelltod

Der Zelltod ist ein wichtiger Mechanismus innerhalb des menschlichen Organismus. Typischerweise tritt er als programmierter Zelltod und somit meist als Apoptose auf, kann aber auch beispielsweise als Nekrose oder Autophagie eintreten. Es gibt mannigfaltige Gründe für einen Zelltod: äußere Einflüsse, Infektionen der Zelle, DNA-Schäden oder einfach die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Problematisch wird es, wenn die Regulationsmechanismen, die im richtigen Moment zum Zelltod führen sollen, außer Kraft gesetzt werden.

### 1.4.1 Apoptose

Die Apoptose wurde vor etwa einem halben Jahrhundert als erste Form des programmierten Zelltods beschrieben. Sie geschieht zumeist als Absterben weniger Zellen in einem sonst gesunden, multizellulären Organismus. Gründe für Apoptose können Zellzahlkontrolle, Gewebeerneuerung, Entfernung potenziell (z. B. auch autoreaktiver) schädlicher Zellen durch unser Immunsystem und die Elimination entarteter Zellen sein. Sie ist sowohl im Rahmen des Wachstums, aber auch für den Schutz unseres Organismus essenziell (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972).

Man unterscheidet hierbei einen intrinsischen sowie einen extrinsischen Signalweg mit dem gleichen Endziel. Die Zelle wird zerstört und in apoptotische Fragmente zerlegt. Diese werden anschließend von umgebenden Zellen phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose geschieht der Zelluntergang kontrolliert und meist ohne Entzündungsreaktion (s. **Abb. 2**; Heinrich, Koch, & Brix, 2014).



**Abb. 2: Apoptose**

In der Abbildung sind sowohl die intrinsische sowie die extrinsische Apoptose dargestellt. Die intrinsische Apoptose wird über zellinterne Stressmechanismen induziert. Ausgelöst durch die proapoptischen, porenformenden Effektorproteine der Bcl-2-Familie Bax und Bak kommt es zur erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP) und zum Freiwerden von diversen proapoptotischen Enzymen, darunter Cytochrom C und Smac (second mitochondria-derived activator of caspases). Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) ein Apoptosom, welches die inaktivierte Form der Caspase (Cysteiny-l-aspartate specific protease) 9 enthält. Aus dem Apoptosom resultiert die Aktivierung der

Initiatorcaspase 9, die wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert. Smac hemmt hingegen den Apoptosehemmer XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein), der sonst Caspase 9 sowie Caspasen 3 und 7 binden und inhibieren kann. Werden die Effektorcaspasen hingegen aktiviert, resultiert das in der Zellapoptose.

Die extrinsische Apoptose kann über verschiedene Liganden an die jeweiligen Todesrezeptoren ausgelöst werden. Hier ist die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor repräsentativ dargestellt. Sie bewirkt die Trimerisierung der Rezeptoren sowie die Rekrutierung von DDs (death domains), FADD (Fas-associated death domain) und der Procaspase 8. Sie bilden zusammen den Death Inducing Signalling Complex (DISC), der die Initiatorcaspase 8 aktiviert. Die Caspase 8 kann nun direkt über Induktion der Caspasen 3 und 7 zur Apoptose führen oder über die Spaltung von Bid (BH3 interacting domain death agonist) in tBid (truncated Bid) die intrinsischen Mechanismen der Apoptose in Gang setzen.

#### **1.4.1.1 Intrinsischer Signalweg**

Auslösende Faktoren des intrinsischen Weges können beispielsweise Schädigungen der DNA oder oxidativer Stress sein. Moduliert wird dieser Weg vor allem über die BCL-2-Familie. Diese beinhaltet anti-apoptotische (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, Mcl-1, BCL2A1) als auch pro-apoptotische (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA usw.) Proteine sowie die pro-apoptotischen, porenformenden Proteine Bax, Bak und Bok. Oxidativer Stress zum Beispiel führt zu einem Überwiegen der pro-apoptotischen Signale innerhalb der Familie und zur Aktivierung von Bax und Bak, woraufhin diese Poren in der Mitochondrienmembran bilden (Kale, Osterlund, & Andrews, 2018; Kist & Vucic, 2021; Wei et al., 2000). Dies resultiert in einer gesteigerten Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP; Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007; Tait & Green, 2010). Aufgrund der erhöhten Permeabilität werden wiederum apoptotische Proteine wie Cytochrom C, Smac, Apoptose-induzierender Faktor (AIF), Endonuklease G (ENDO G) und HTRA2 aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien frei (Du, Fang, Li, Li, & Wang, 2000; L. Y. Li, Luo, & Wang, 2001; Stein & Hansen, 1999; Susin et al., 1999; Yasuyuki Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2000). Durch Bindung von Cytochrom C und apoptotische-Proteasen-aktivierender-Faktor-1 (Apaf-1) im Zytoplasma kommt es über mehrere Schritte zur Apoptosom-Bildung und zur Rekrutierung und Aktivierung der Initiatorcaspase 9 (P. Li et al., 1997; Riedl & Salvesen, 2007; Zou, Henzel, & Liu, 1997). Durch limitierte Proteolyse aktiviert die Caspase 9 die Effektorcaspasen 3 und 7 (Srinivasa M. Srinivasula, Ahmad, Fernandes-Alnemri, & Alnemri, 1998). Weiterhin binden die Enzyme Smac/DIABLO und HTRA2 verschiedene Inhibitoren der Apoptose-Proteine wie XIAP, cIAP 1 und 2 und hemmen ihre Wirkung (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Q. H. Yang & Du, 2004). Die Caspasenaktivierung durch Cytochrom C wird somit verstärkt.

#### **1.4.1.2 Extrinsischer Signalweg**

Auslöser im extrinsischen Signalweg ist die Bindung eines Liganden an einen der sogenannten „Todesrezeptoren“, beispielsweise des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor (Itoh et al., 1991; Nagata, 1999; N. S. Wilson, Dixit, & Ashkenazi, 2009). Es kommt zur Trimerisierung der Rezeptoren und zur Rekrutierung von FADD (Fas-assoziierte death domain) (Ashkenazi & Dixit, 1998; Chinnaiyan, O'Rourke, Tewari, & Dixit, 1995). Dies hat die Bindung von Procaspasen 8 mittels der death effector domain und die Bildung des sogenannten DISC (death inducing signalling complex) zur Folge (Ashkenazi & Dixit, 1998; Boldin, Goncharov, Goltsev, & Wallach, 1996; Muzio et al., 1996). Durch autokatalytische Aktivierung der Caspase 8 kann diese mittels limitierter Proteolyse die Effektorcaspase 3 aktivieren (Deveraux et al., 1998; Muzio, 1998; X. Yang, Chang, & Baltimore, 1998). Weiterhin kann die Caspase 8 proteolytisch Bid, ein der BCL-2-Familie zugehöriges, proapoptotisches Protein, aktivieren (H. Li, Zhu, Xu, & Yuan, 1998). Dieses inhibiert die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine, sodass – wie beim intrinsischen Weg – Bax- und Bak-vermittelt Poren in der Mitochondrienmembran gebildet werden (Desagher et al., 1999; Wei et al., 2000).

#### **1.4.1.3 Gemeinsame Endstrecke der Signalwege**

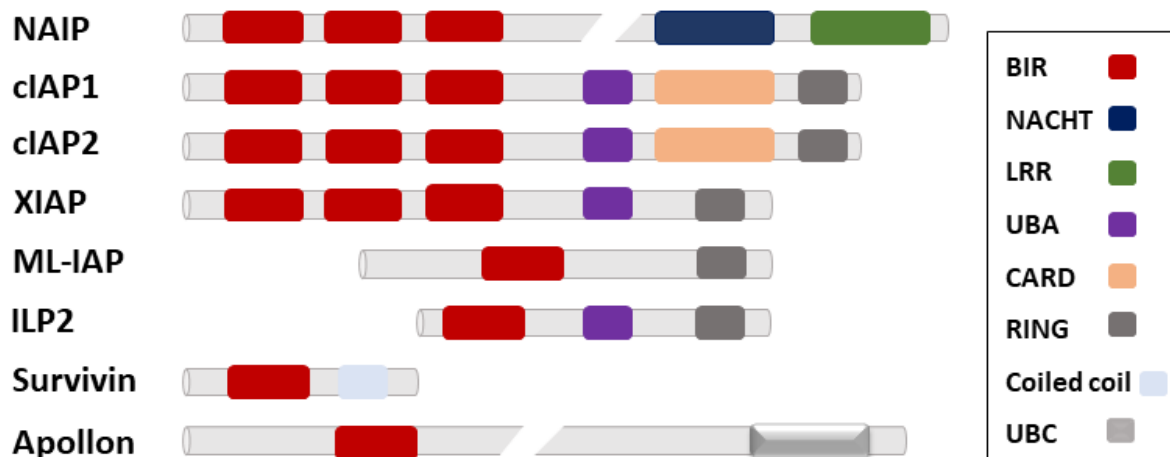
Die Endstrecke der Signalwege ist gleich. Lebenswichtige Proteine der Zelle wie Strukturproteine, Proteine des Zellzyklus oder der Transkription werden durch die Effektorcaspasen zerstört. Durch die aktivierten Caspasen wird zudem der Inhibitor der caspase-aktivierten Desoxyribonuklease (ICAD) abgebaut, sodass die DNase nun chromosomale DNA spalten kann (Enari et al., 1998; Sakahira, Enari, & Nagata, 1998). Es folgt die Chromatin-Kondensation und die Schrumpfung des Zellkerns. Daraufhin kommt es zur Fragmentierung der apoptotischen Zelle und zur Phagozytose durch Immunzellen (Kerr et al., 1972).

#### **1.4.1.4 Andere Zelltodarten**

Andere Arten des Zelltods sind Nekrose, Nekroptose, lysosomaler Zelltod, autophagozytotischer Zelltod, Pyroptose, Ferroptose, Parthanatos, Entose, NETose etc. (Galluzzi et al., 2018). Auf diese soll an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen werden.

## 1.5 Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAPs)

Inhibitoren der Apoptose-Proteine sind Proteine, die durch direkte und indirekte Hemmung des programmierten Zelltods antiapoptotisch auf eine Zelle wirken. IAPs wurden erstmalig Anfang der 90er-Jahre beschrieben. Es handelte sich damals um ein genetisches Screening, um die Regulation der Viabilität von virusbefallenen Zellen besser zu verstehen (Birnbaum, Clem, & Miller, 1994; Crook, Clem, & Miller, 1993). Die bisher bekannten IAPs beim Menschen sind: neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), cellular IAP1 (cIAP1), cellular IAP2 (cIAP2), X chromosome-linked IAP (XIAP), survivin, apollon, melanoma IAP (ML-IAP) und IAP-like protein 2 (ILP2) (Salvesen, Duckett, Torrey, Road, & Arbor, 2002). All diesen IAPs gemeinsam ist die Baculovirus IAP Repeat (BIR) Domäne, die ein- bis dreimal vorkommt. Diese Domäne trägt zu ihrer Protein-Protein-Wechselwirkung sowie zur Inhibition der Apoptose bei (Crook et al., 1993; Miller, 1999). XIAP, cIAP1 und 2 sowie ML-IAP haben zudem eine RING-Domäne mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Sie können Effektorproteine also direkt modulieren, ubiquitinylieren und degradieren (Miller, 1999; Vucic, Dixit, & Wertz, 2011). Die cIAPs haben außerdem eine sogenannte Caspase-rekrutierende Domäne (CARD), die ihnen die Auto- oder Heterodimerisierung mit anderen CAR-Domänen ermöglicht und so die eigene E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität reguliert (Lopez et al., 2011; Vaux & Silke, 2005). Weitere Domänen sind die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), welche an Ubiquitin-Ketten binden kann, die Ubiquitin-konjugierende Domäne (UBC), die leucinreiche Repeat-Domäne (LRR), die NACHT-Domäne von NAIP und die Coiled-coil-Domäne von survivin (Fulda & Vucic, 2012) (s. **Abb. 3**).



**Abb. 3: IAPs**

Darstellung der Protein-Domänen der IAPs. Abbildung adaptiert aus Targeting IAP Proteins for therapeutic intervention in cancer, Fulda & Vucic (2012).

### 1.5.1 IAPs in der Apoptose

Bei den Inhibitoren der Apoptose-Proteine ist der Name Programm. Sie schützen die Zelle gegen proapoptotische Stimuli und verhindern so den frühzeitigen Zelltod. XIAP hemmt über seine BIR-Motive direkt die Caspasen 3, 7 und 9 (Deveraux & Reed, 1999; Deveraux et al., 1998; Deveraux, Takahashi, Salvesen, & Reed, 1997; Eckelman, Salvesen, & Scott, 2006; Salvesen et al., 2002; S. M. Srinivasula et al., 2001). Zudem kann XIAP über seine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität die Caspase 3 ubiquitinylieren. Sie wird damit markiert und anschließend abgebaut (Schile, García-Fernández, & Steller, 2008; Y. Suzuki, Nakabayashi, & Takahashi, 2001). Im Falle eines MOMP und der Freisetzung von Smac blockiert Smac die BIR-Domänen 2 und 3 von XIAP, indem es mittels IAP-binding motif (IBM) bindet (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000; Salvesen et al., 2002; S. M. Srinivasula et al., 2001; Wu et al., 2000). Bei den cIAPs ist der Mechanismus der Hemmung der Apoptose nicht so transparent. Wurde anfangs noch angenommen, dass sie auch die Caspasen 3 und 7 effektiv hemmen (Roy, Deveraux, Takahashi, Salvesen, & Reed, 1997), wurde dies später revidiert. Zwischenzeitlich wurde angenommen, dass sie ein nicht so potenter, direkter Inhibitor der Caspasen seien (Salvesen et al., 2002), bis man zu dem Schluss kam, dass sie diese gar nicht direkt inhibieren, aber binden können (Eckelman et al., 2006). Vielmehr hemmen sie den programmierten Zelltod indirekt durch die Bindung und Ubiquitinylierung der Caspasen 3 und 7 sowie mittels Ubiquitinylierung von Smac (Choi et al., 2009; Hu & Yang, 2003). Weiterhin hemmen die cIAPs die TNF-vermittelte extrinsische Apoptose mittels NF- $\kappa$ B-Aktivierung

(s. u.). IAPs sind bisher die einzigen bekannten Inhibitoren von Initiator- und Effektorcaspasen (Mohamed, Bishr, Almutairi, & Ali, 2017).

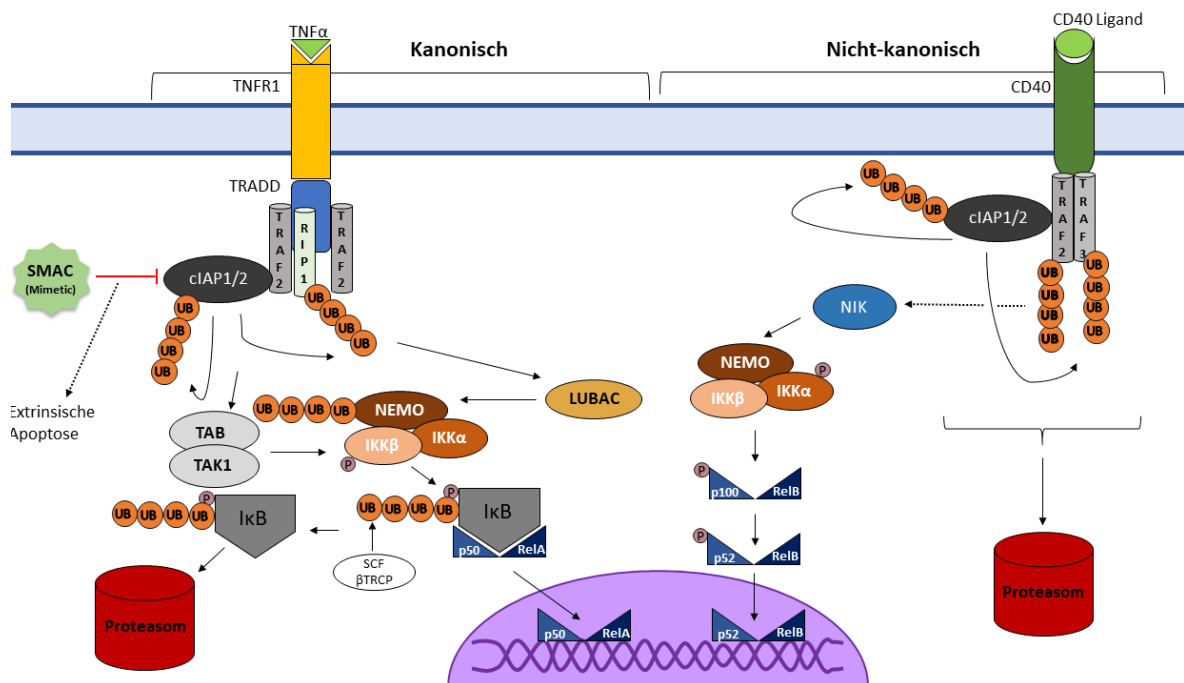
### 1.5.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg und der Einfluss der IAPs auf diesen

NF- $\kappa$ B ist eigentlich ein Überbegriff für eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit fünf Untereinheiten. Dazu gehören NF- $\kappa$ B 1 (inaktiv: p105, aktiv: p50), NF- $\kappa$ B 2 (inaktiv: p100, aktiv: p52), RelA (p65), RelB und c-Rel (Gilmore, 2006). Sie transkribieren für proapoptotische Proteine wie TRAFs, cIAPs und Proteine der BCL-2-Familie (Chu et al., 1997; C.-Y. Wang, Guttridge, Mayo, & Baldwin, 1999; C. Y. Wang, Mayo, Korneluk, Goeddel, & Baldwin, 1998). Der Signalweg wird typischerweise durch proinflammatorische Liganden wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  ausgelöst, er findet aber auch bei der Aktivierung und Proliferation der B-Zelle Anwendung (Baeuerle & Henkel, 1994; Porto et al., 2004; Young & Staudt, 2013). Man unterscheidet einen kanonischen von einem nicht kanonischen Signalweg.

Ist die Zelle ruhend, wird NF- $\kappa$ B in einem Komplex mit I $\kappa$ B im Zytoplasma inhibiert (Baeuerle & Baltimore, 1988). Beim klassischen Signalweg dockt TNF- $\alpha$  an TNFR1 an, was zur Bildung eines Signalkomplexes führt (Baud, Karin, & Karin, 2001). Dieser beinhaltet TNFR1-associated death domain protein (TRADD), TRAF-2, RIP-1 sowie c-IAP 1 und 2 (Micheau & Tschopp, 2003; Rothe, Pan, Henzel, Ayres, & Goeddel, 1995; Shu, Takeuchi, & Goeddel, 1996). Als RING-finger Ubiquitin E3-Ligasen binden cIAP1 und 2 Ubiquitin-Ketten an RIP-1, TRAF-2 und sich selbst. Es wurde gezeigt, dass die cIAPs somit einen wichtigen Teil zur anti-apoptotischen Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs beitragen (Bertrand et al., 2008; Mahoney et al., 2008; Varfolomeev et al., 2008; Varfolomeev & Vucic, 2008). Die Ubiquitinylierung führt zur Rekrutierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK), dem nicht enzymatischen Gerüstprotein NF- $\kappa$ B-essentieller-Modulator (NEMO), LUBAC, TAK und TAB-1 (Vucic et al., 2011). Diese bilden einen Kinase-Komplex, der zur Phosphorylierung und zur Degradation von I $\kappa$ B führt, sodass p50 und RelA frei werden. Die frei gewordenen Transkriptionsfaktoren werden daraufhin in den Zellkern transloziert (Hayden & Ghosh, 2004; Scheidereit, 2006). Bleibt die RIP1-Ubiquitinylierung durch die cIAPs aus, kommt es zur Caspase-8-vermittelten Apoptoseinduktion (Bertrand et al., 2008; Varfolomeev & Vucic, 2008; L. Wang, Du, & Wang, 2008).



Der alternative (nicht kanonische) Signalweg wird durch die cIAPs hingegen gehemmt (Varfolomeev et al., 2008; Vince et al., 2007). Physiologisch liegt in der Zelle ein niedriger Spiegel der NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK) vor, da sie ständiger Ubiquitinylierung durch die cIAPs unterliegt (Vallabhapurapu et al., 2009; Varfolomeev et al., 2007; Vince et al., 2007; Zarnegar et al., 2009). Werden cIAP 1 und 2 an Rezeptoren wie CD40 rekrutiert, wird die Ubiquitinylierung von TRAF2 und 3 sowie der cIAPs in Gang gesetzt, woraufhin alle depletiert werden und NIK akkumulieren kann (Vallabhapurapu et al., 2009). NIK phosphoryliert die IKK- $\alpha$ , welche wiederum das inaktive NF- $\kappa$ B 2 (p100) in die aktive Form (p52) umwandelt (Senftleben et al., 2001). Zusammen mit RelB wird diese dann in den Zellkern aufgenommen und transkribiert (Hayden & Ghosh, 2004; Scheidereit, 2006).



**Abb. 4: NF- $\kappa$ B-Signalweg**

In der Abbildung sind der kanonische und der nicht kanonische/alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg dargestellt.

Der kanonische Signalweg: Über die Bindung des Tumornekrosefaktors (TNF)  $\alpha$  an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird die Rekrutierung von TRADD (TNFR-assoziiertes Todesdomäne) sowie TRAF2, RIP1 sowie der cIAPs 1 und 2 ausgelöst. Die cIAPs ubiquitinylieren (UB) die RIP1-Kinase und sich selbst, was zur Rekrutierung von TAB und TAK1 sowie LUBAC führt und diese aktiviert. Nach Aktivierung modulieren sie den IKK-Komplex; TAB/TAK1 phosphorylieren (P) IKK $\beta$  und LUBAC ubiquitinyliert NEMO, sodass I $\kappa$ B durch IKK phosphoryliert werden kann und durch das  $\beta$ -transduzierendes Protein (β-TRCP) des SKP1/CUL1/F-box-Komplexes (SCF) ubiquitinyliert wird. Daraufhin wird I $\kappa$ B proteasomal degradiert und die Transkriptionsfaktoren p50 und RelA werden frei. Diese werden in den Zellkern transloziert. Bei Anwesenheit von Smac (oder eines Mimetics) kann die cIAP-Funktion eingeschränkt werden und es kommt zur Induktion des extrinsischen Apoptose-Mechanismus.

Der nicht kanonische Signalweg: Durch die Bindung des CD40-Liganden an den CD40-Rezeptor kommt es zur Freisetzung von NIK aus dem Komplex mit TRAF2, 3 und den cIAPs. Aufgrund der

Liganden-Bindung ubiquitinylieren die cIAPs sowohl die TRAFs als auch sich selbst, was in ihrer proteasomalen Degradation endet. Das freigewordene NIK kann nun den IKK-Komplex phosphorylieren, der den inaktiven NF- $\kappa$ B-Komplex phosphoryliert und in seine aktive Form umwandelt, welche in den Zellkern transloziert werden kann. cIAP (cellular IAP), IKK (Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$  B-kinase subunit), I $\kappa$ B (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor), LUBAC (Linear ubiquitin chain assembly complex), NIK (NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase), NEMO (NF- $\kappa$ B-essentieller-Modulator), RIP1 (Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Protein-Kinase), Smac (second mitochondria-derived activator of caspases), TRAF (Tumor necrosis factor receptor associated factors).

Abbildung adaptiert aus Targeting IAP Proteins for therapeutic intervention in cancer, Fulda & Vucic (2012).

### 1.5.3 Tumorgenese durch IAPs und Perspektiven

Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass IAPs zur Karzinogenese von verschiedensten malignen Tumorarten beitragen. Dazu gehören sowohl solide Tumoren als auch hämatologische Erkrankungen (Mohamed et al., 2017). Die Expression von XIAP, cIAP 1 und 2 wurde für verschiedene Non-Hodgkin-Lymphome in Zelllinien sowie primären Zellen gezeigt (Akyurek, Ren, Rassidakis, Schlette, & Medeiros, 2006). Im Verlauf wurde weiterhin untersucht, ob die Überexpression von XIAP mit einer schlechteren Prognose beim DLBCL einhergeht, wobei gezeigt werden konnte, dass eine höhere Expression mit einer niedrigeren 5-JÜR korrelierte (Hussain et al., 2010). Für das MALT-NH-Lymphom wurde mittels t(11;18) eine cIAP2-MALT1-Translokation nachgewiesen, die zur dauerhaften NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt (Ndubaku, Cohen, Varfolomeev, & Vucic, 2009). In klinischen Studien werden bereits verschiedene IAP-Antagonisten (Smac Mimetics) an hämatologischen Neoplasien sowie soliden Tumoren getestet, wobei sich herauskristallisierte, dass es sinnvoll sein könnte, Smac Mimetics in Kombinationstherapien einzusetzen (Fulda, 2014).

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg gilt als mitursächlich für das Überleben verschiedener Lymphomtypen wie MCL oder ABC-DLBCL (s. o.). Passend dazu wurden im ABC-Subtyp laut Yang et al. in etwa 16 % der Fälle Mutationen im BIRC2/3 Locus erkannt, der für cIAP1 und 2 transkribiert, deutlich häufiger als beim GCB-Subtyp (~4 %; Y. Yang et al., 2016). Bei Genanalysen des MCL wurden in 6–10 % BIRC 2/3 Mutationen festgestellt (Rahal et al., 2014). Erste Versuche mit Smac Mimetics im ABC-Subtyp haben gezeigt, dass eine Therapie mit IAP-Antagonisten sinnvoll sein könnte, da angenommen wird, dass die cIAPs den CBM-Komplex modulieren, der für die chronische Aktivierung des BZR im ABC-Subtyp mit verantwortlich ist (Davis et al., 2010; Y. Yang et al., 2016). Vorliegendes Projekt sollte diese Hypothese weiter untersuchen.

## 2 Zielsetzung

Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Dreyling beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Pathogenese aggressiver Lymphome, speziell des Mantelzell- und des Diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms, um neue, wirksame Inhibitoren und innovative zielgerichtete Therapiekonzepte einschließlich der Inhibition des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs zu finden. Gleichzeitig sollen die zugehörigen Wirkmechanismen effizienter Inhibitoren und daraus folgender Therapieansätze erforscht und charakterisiert werden. Das vorliegende Projekt beschäftigte sich zusätzlich mit der Apoptoseinduktion und der Aktivierung und Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in B-Zell-Lymphomen.

Apoptose ist eine wichtige Art des programmierten Zelltods. Sie wird durch viele Proteine moduliert, stimuliert und inhibiert. Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAPs) tragen wesentlich zur Hemmung bei. Wird der physiologische Zelltod (Apoptose) jedoch übermäßig inhibiert, kommt es entweder zum unkontrollierten Zellzerfall oder zur Entartung (Fulda, 2014). Die Überexpression von IAPs geht in verschiedensten Krebsarten mit einer schlechten Prognose einher (Fulda & Vucic, 2012). Zu Beginn dieser Arbeit war postuliert worden, dass Antagonisten der IAPs (Smac Mimetics) im ABC-Subtyp des DLBCLs möglicherweise nicht (nur) über die Apoptoseinduktion wirken, sondern auch deren BZR-Signalweg zielgerichtet inhibieren (Y. Yang et al., 2016).

In diesem Projekt wurden zwei Smac Mimetics, der monovalente Wirkstoff LCL161 und der bivalente BV-6, an DLBCL- und (nach Kenntnis der Arbeitsgruppe erstmalig) an MCL-Zelllinien getestet. Diese Medikamente bezwecken, das physiologisch aus Mitochondrien stammende Enzym Smac zu imitieren, welches zur Degradation der IAPs führt.

Ziele des Projekts waren:

1. In-vitro-Wirksamkeiten der beiden getesteten Smac Mimetics zu erforschen, diese mittels Proliferationsassays und Western-Blot-Analyse nachzuweisen und zu vergleichen.
2. Die Art des Zelltods mittels Durchflusszytometrie und Caspasen- sowie PARP-Spaltung im Western Blot festzustellen.

3. Mögliche Einflüsse auf den BZR-Signalweg zu erforschen.
4. Kombinationen mit anderen niedermolekularen Arzneimitteln und Chemotherapeutika mittels Proliferationsassay auf mögliche Synergien zu testen und durchflusszytometrisch sowie mittels Western Blot zu analysieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien

Tab. 1: Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft
Maver-1	B-NHL (MCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Peripheres Blut eines 82-Jährigen</li> <li>▪ Etabliert 2003</li> <li>▪ t(11;14)-Gen -&gt; Beeinflussung von BCL1-Gen und IGH-Genen</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
MINO	B-NHL (MCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut einer 68-Jährigen im Rezidiv</li> <li>▪ Etabliert 1997</li> <li>▪ t(11;14)q(13;32)-Translokation -&gt; BCL1-IGH-Fusionsgen</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
Rec-1	B-NHL (MCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: peripheres Blut oder Lymphknoten eines 61-Jährigen; terminal, therapierefraktär</li> <li>▪ Transformiertes MCL; blastoid</li> <li>▪ t(11;14)-Gen -&gt; Beeinflussung von CCND1/BCL1 und IGH-Gen</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
Hbl-1	B-NHL (DLBCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: 65-jähriger Mann</li> <li>▪ ABC-Subtyp</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
U2932	B-NHL (DLBCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Aszites einer 29-jährigen Frau</li> <li>▪ Etabliert 1996</li> <li>▪ ABC-Subtyp</li> <li>▪ Überexpression von BCL-2 &amp; -6, p53</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
Ht	B-NHL ( <b>DMixedBCL</b> ) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Aszites eines 70-jährigen Mannes</li> <li>▪ Etabliert 1983</li> </ul>	ATCC, Wesel

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft
Su-DHL-5	B-NHL (DLBCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Lymphknoten einer 17-Jährigen</li> <li>▪ GCB-Subtyp</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig
Ula	B-NHL (DLBCL) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Herkunft: Mononukleäre Aszites-Zellen eines 57-Jährigen; terminal, therapierefraktär</li> <li>▪ Etabliert 2002</li> <li>▪ GCB-Subtyp</li> <li>▪ t(14;18)-Gen</li> <li>▪ THL: MYC/BCL2- +MYC/BCL6-Translokation</li> </ul>	DSMZ, Braunschweig

### 3.1.2 Medikamente

Tab. 2: Medikamente

Inhibitor	Art der Inhibition	Konzentration	Hersteller
Bortezomib	Proteasom	1–4 nM	LC Laboratories, Woburn, MA (USA)
BV-6	IAP (bivalent; cIAP1, cIAP2, XIAP)	0,3125–10 µM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
Ibrutinib (PCI 3275)	BTK	0,3125–5 µM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
LCL161	IAP (monovalent; cIAP1, cIAP2, XIAP)	0,3125–10 µM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
Necrostatin (NEC-1)	RIP1-Kinase	30 µM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
Venetoclax (ABT-199)	BCL-2	2,5–125 nM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
zVAD-fmk	Pancaspase	20 µM	Selleckchem, Houston, TX (USA)
Zytostatikum	Wirkungsweise	Konzentration	Hersteller
Cytarabin (ARAC)	Cytidin-Isomer	12,5–500 nM	Apotheke Klinikum Großhadern
Doxorubicin	Anthrazyklin	75–600 nM	Apotheke Klinikum Großhadern

### 3.1.3 Lösungen und Chemikalien

Tab. 3: Lösungen und Chemikalien

Lösung/Chemikalie	Hersteller
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Acrylamid Mix 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Albumin Fraktion V 5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Annexin V	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Binding Puffer	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Blotting Puffer	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Bradford Lösung	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Couramin Acid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
EDTA-Tablette Proteinlyse	Roche, Basel (Schweiz)
Elektrophorese Puffer	Apotheke Klinikum Großhadern
Enhanced chemiluminescence (ECL) prime western blotting detection reagent	GE Healthcare, München
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Gelatine	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Loading Dye Reducing Agent	ThermoScientific, Waltham (USA)
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lyse-Puffer (Complete Lysis-M)	Roche, Basel (Schweiz)
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NET	Apotheke Klinikum Großhadern
Phosphatase-Inhibitoren (Cocktail 2 und 3)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Phosphate-buffered saline (PBS) Dulbecco	BioChrom GmbH, Berlin
Proteinstandards	ThermoScientific, Waltham (USA)



Lösung/Chemikalie	Hersteller
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Substanz A	Selbsthergestellt
Substanz B	Selbsthergestellt
TBS	Apotheke Klinikum Großhadern
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Transfer Puffer	Apotheke Klinikum Großhadern
Tris pH 6,8	Apotheke Klinikum Großhadern
Tris pH 8,8	Apotheke Klinikum Großhadern
Turbo Blot Solution	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Tween	Merck, Darmstadt
WST-1-Reagenz	Roche, Basel (Schweiz)

### 3.1.4 Antikörper

Tab. 4: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Actin	1:5.000	Rabbit	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Anti-Mouse IgG	1:5.000	Mouse	Promega Corporation, Mannheim
Anti-Rabbit IgG	1:5.000	Rabbit	Promega Corporation, Mannheim
BCL-2	1:500	Mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Caspase 3	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
Caspase 8	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
Caspase 9	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
clAP1	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
clAP2	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
GAPDH	1:5.000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX (USA)
NFκB2 p100/52	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
RelA (p65)	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
XIAP	1:500	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Alufolie	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Combitip (200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Costar Strippette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
CryoRack	ThermoScientific, Waltham (USA)
Cryovials	ThermoScientific, Waltham (USA)
Deep-Well-Platte	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen mit/ohne Sieb	FALCON
Falcons (50 ml, 15 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Filterpapier	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Frischhaltefolie	GE Healthcare, München
Handschuhe Vasco Nitril blue powder free	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kassetten und Kämmen	ThermoScientific, Waltham (USA)
LF PVDF-Membran	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Microtube (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatte (6-Well, 12-Well, 96-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
Papiertücher	GVS eG, Friedewald
Pipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Middleton (USA)
Pipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf
Pipettus accujet pro	Hirschmann, Eberstadt
Reservoir	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

### 3.1.6 Geräte

Tab. 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Abzugshaube	TROX GmbH, Berlin
BD FACSCanto II	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Begasungsbrutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Falcon-Roller	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
FUSION SL Vilber Lourmat	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
GloMax Discover System	Promega Corporation, Mannheim
Heraeus Megafuge 40R	ThermoScientific, Waltham (USA)
Sterile Arbeitsbank Berner FlowSafe	Berner International GmbH, Elmshorn
Tank Blotter	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot Turbo Transfer-System	Bio Rad Laboratories GmbH, München
UNITWIST 3-D Rüttelplatte	
Vi-Cell XR	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad Typ 1003 (14l)	GFL, Hannover
Zentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf 5424 R	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.7 Software

Tab. 7: Software

Software	Hersteller
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
FACSDivaSoftware	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
FlowJo	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Fusion Software	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
GloMaxDiscover	Promega Corporation, Mannheim
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, CA (USA)
PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)
ViCell XR Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington (USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Versuche mit Zellkulturen wurden in steriler Umgebung in Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Vor und nach Benutzung der Werkbänke wurden diese für mindestens 30 Minuten mit ultraviolettem Licht beleuchtet, um Sterilität zu gewährleisten. Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen im Inkubator kultiviert. Genährt wurden die Zelllinien Maver-1, Mino, Rec-1, Hbl-1, U2932 und Ht mit RPMI-1640 Medium, das anteilig mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) versetzt wurde; Su-DHL-5 und Ula wurden mit anteilig 20 % FKS genährt. Alle zwei bis drei Tage fand die Zellverdünnung statt. Mittels ViCell XR wurde die Zellkonzentration ermittelt und an die Geschwindigkeit der Zellproliferation der Zelllinie angepasst. Folgende Verdünnung (Zellzahl\*10<sup>6</sup>/ml) wurde pro Zelllinie vorgenommen:

**Tab. 8: Zellzahlverdünnung in der Zellkultur**  
Zellzahlverdünnung alle zwei bis drei Tage. Zellzahl\*10<sup>6</sup>/ml

Zelllinie	2 Tage	3 Tage
Maver-1	0,6	0,3
Mino	0,6	0,3
Rec-1	0,6	0,3
Hbl-1	0,6	0,3
Ht	0,6	0,3
Su-DHL-5	0,4 – 0,5	0,2
Ula	0,4 – 0,5	0,2

#### 3.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine Konzentration von etwa 1\*10<sup>7</sup>/ml pro Cryovial genutzt. Dafür wurde das entsprechende Volumen der Zellen 10 Minuten bei 300 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in Einfriermedium (FKS versetzt mit 8 % DMSO) gelöst. Die im Einfriermedium gelösten Zellen wurden in die Cryovials umpipettiert. Anschließend wurden sie für ein bis zwei Tage im CryoRack bei -80 °C eingefroren. Danach folgte die dauerhafte Lagerung bei -80 °C.

Zum Auftauen wurde 10 ml 20 %-iges FKS-haltiges Medium mit den aufgetauten Zellen versetzt und 10 Minuten bei 300 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet wiederum im Medium gelöst. Die Zellen wurden etwa eine Woche kultiviert, bevor sie für Versuche verwendet wurden.

### **3.2.2 Vi-Cell Zellzählung**

Zur Ermittlung der Zellzahl und Zellvitalität wurde das ViCell XR-Gerät genutzt. Dieses bedient sich der Trypanblau-Ausschluss-Methode, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Hierfür wurden die Zellen im Gerät mit Trypanblau versetzt. Tote Zellen sowie lebendige Zellen sind durchlässig für den Farbstoff, jedoch transportieren lebendige Zellen den Farbstoff mittels Pumpe wieder aus dem Zellinneren heraus. Durch den Farbkontrast kann das Gerät zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden und so die Vitalität und die Zellzahl pro Milliliter bestimmen. Das ViCell macht dabei etwa 100 Bilder pro Probe.

### **3.2.3 Viabilitätsassay mittels Enzymnachweis**

Das Viabilitätsassay nutzt zur Bestimmung der Zellproliferation ein färbendes Reagenz namens Water-Soluble-Tetrazolium (WST)-1. Es kann herangezogen werden, um die Stabilität der Atmungskette von behandelten und unbehandelten Zellen zu vergleichen. Das Prinzip dieses Assays ist folgendes: Das WST-1 Reagenz enthält ein Tetrazolium-Salz. Dieses Salz wird durch die mitochondrialen Dehydrogenasen der Zelle in Formazan-Rot umgewandelt. Es kommt zu einem sichtbaren Farbumschlag, welcher mittels Spektralphotometer photometrisch erfasst werden kann. Die Intensität des Farbumschlags korreliert direkt mit der Zahl der stoffwechselaktiven Zellen. Je stärker sich das Medium nach Zugabe färbt, desto mehr stoffwechselaktive Zellen sind vorhanden.

Diese Versuche dienten zum einen der Dosisfindung der einzelnen Medikamente und zum anderen zur Austestung der Kombinationsmöglichkeiten verschiedener Inhibitoren.

Hierfür wurde der Rand der 96-Well-Platte rundum mit 200 µl reinem Medium pipettiert, um Verdunstung zu vermeiden. Außerdem wurden sechs Wells mit lediglich 100 µl Medium gefüllt. Diese fungierten als Vergleichsreihe, um das durch das Medium entstehende Hintergrundrauschen anschließend rechnerisch zu entfernen. Je



### 3.2.3.1 Methode zur quantitativen Definition eines Synergismus bei Inhibitor-kombinationen: Kombinationsindex nach Chou-Talalay

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Medikamente kombiniert, um mögliche Synergien festzustellen. Diese können mittels des Combination Index (CI) nach Ting-Chao Chou und Paul Talalay quantifiziert werden. Er gibt so Auskunft über Synergien ( $CI > 1$ ), Antagonismen ( $CI < -1$ ) und additive Effekte ( $CI > -1$  und  $< 1$ ). Er leitet sich aus der folgenden Formel ab:

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$$

(D) stellt hierbei die verwendete Dosis des Inhibitors dar und ( $D_x$ ) den prozentualen Anteil der Inhibition (Chou & Talalay, 1984).

### 3.2.4 Western Blot

#### 3.2.4.1 Proteinlyse

Die Proteinlyse dient dem Zweck, Proteine aus der Zelle zu extrahieren. Diese Ly-sate können später für die Abbildung im Western Blot genutzt werden.

Hierfür wurden die Zelllinien auf eine Zellzahl von  $0,3 \cdot 10^6/\text{ml}$  verdünnt. Nach Behandlung wurden die Zellen für eine bestimmte Zeit inkubiert. Je nach Versuchsansatz 4 oder 24 Stunden. Nach 24 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in je 2 ml Tubes gefüllt und für 10 Minuten bei 2500 G zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgeschüttet und der Zellrückstand mit 1 ml PBS gewaschen. Der verbliebene Zellrückstand wurde mit einem Lyse-Puffer durchmischt, welcher wiederum mit zwei Phosphatase-Inhibitoren (PI) versetzt wurde (100  $\mu\text{l}$  Puffer je  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$  Zellen, 1  $\mu\text{l}$  PI je 100  $\mu\text{l}$  Puffer). Diese Lösung wurde 10 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C auf einer Rüttelplatte inkubiert. Nach Inkubation wurden die Tubes in der Kühlzentrifuge bei 4 °C 15 Minuten mit einer Kraft von 14.000 G zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand in ein neues Tube pipettiert und das Zellpellet verworfen. Die neuen Tubes konnten ab diesem Zeitpunkt bei -80 °C eingefroren werden.

### 3.2.4.2 Bradford Assay

Der Bradford Assay dient der Proteinkonzentrationsbestimmung eines Lysats. Die sogenannte Bradford-Lösung ist ein Triphenylmethanfarbstoff namens Coomassie Brilliant-Blau G250 (CBBG). In saurer Lösung nimmt er seine kationische Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm an. Bei Bindung an Proteine wird die anionische Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 595 nm. Dieser Farbumschlag wird anschließend photometrisch erfasst.

Hergestellte Lysate konnten mit diesem Test untersucht werden. Hierfür wurden in eine 96-Well-Platte pro Well 200 µl Bradford-Lösung gefüllt. In diese Wells wurde je 5 µl Lysat je Tube pipettiert. Als Referenz wurden Proteinstandards mit bereits bekannten Proteinkonzentrationen genutzt. Sowohl die Proteinreferenzen als auch die Lysate wurden doppelt angelegt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Platte lichtgeschützt im Spektralphotometer bei einem Absorptionsmaximum von 570 nm gemessen. Dabei wurden die standardisierten Proteinkonzentrationen zur Eichung herangezogen und anhand von diesen die Proteinkonzentration der Lysate in mg/ml ermittelt.

### 3.2.4.3 Herstellung von Gelen

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden verschiedene Lösungen in bestimmten Konzentrationen verwendet. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden zehner- oder zwölfprozentige Gele gegossen (s. **Tab. 11**). Nach 30 Minuten wurde das Sammelgel hinzugefügt und ein Kamm bis zur Nutzung des Gels eingeführt. Dieser wurde bei Benutzung entfernt und die Lysate in die entstandenen Spalten pipettiert.

**Tab. 11: Zusammensetzung der 10 %- bzw. 12 %-Polyacrylamidgele**  
Angaben sind für zwei Gele.

Bestandteile	10 %	12 %	Sammelgel
Aqua dest.	5,9 ml	4,9 ml	4,35 ml
30 % Acrylamid	5,0 ml	6,0 ml	1,0 ml
1,5M TRIS (pH 6,8) Sammelgel: (pH 8,8)	3,8 ml	3,8 ml	0,5 ml
10 % SDS	150 µl	150 µl	60 µl
10 % Ammoniumpersulfat	150 µl	150 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl



#### **3.2.4.4 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach Größe. Hierbei wurde die sogenannte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit einem Farbstoff und einem Reduktionsmittel versetzt und anschließend bei 70 °C 10 Minuten inkubiert. Dies diente der Denaturierung der Lysate vor der Übertragung auf das Gel. Nach Entfernung des Kamms wurden die produzierten Gele in den mit Gelelektrophorese-Puffer befüllten Tank Blotter eingespannt. Jedes Gel wurde mit einem Größenmarker und den berechneten Konzentrationen der Lysate beladen. Anschließend wurden die Tank Blotter an einen Stromkreislauf angeschlossen. Die unterschiedlich großen Moleküle liefen nun mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Gel. Bis zur vollständigen Auftrennung des Lysats betrug die Spannung die ersten 30 Minuten 61 mV, 90 Minuten 81 mV und noch mal etwa 60 Minuten 121 mV.

#### **3.2.4.5 Blotting**

Das Blotting dient der Proteinbandenübertragung vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran. Nach Ablauf der Gelelektrophorese musste die PVDF-Membran kurz in Methanol befeuchtet werden und dann in der bereitgestellten Lösung 3 Minuten einwirken. Gleichzeitig wurden pro Membran sechs Filterpapiere 2 bis 3 Minuten im Blot-Puffer eingelegt. Anschließend wurden drei Filterpapiere unter der Membran platziert. Über diese wurde das Gel gelegt und mittels eines Rollers von Blasen befreit. Auf das Gel wurden drei weitere Filterpapiere gelegt. Im Trans-Blot Turbo Transfer System fand nun innerhalb von 8 Minuten die Übertragung statt. Zur Verfestigung der Proteinbanden auf der Membran wurden diese in 50 ml Falcons übertragen, 5 ml 5 %-ige Milch hinzugegeben und auf einem Falcon-Roller eine Stunde geblockt. Anschließend wurden die Membranen dreimal 10 Minuten mit 10 ml TBS-T auf dem Falcon-Roller gewaschen. Danach wurde der gewünschte Antikörper in angegebener Konzentration zur Membran pipettiert. Die Membran wurde dann für etwa 12–24 Stunden auf einem Falcon-Roller bei 4° C inkubiert.

#### **3.2.4.6 Belichtung der Membranen**

Die Antikörper wurden bis zu dreimal wiederverwendet. Nach Abpipettieren des Antikörpers wurde der bereits beschriebene Waschvorgang wiederholt. Anschließend wurde die 5 % Milch mit 1 µl Anti-Rabbit oder Anti-Mouse-Antikörper versetzt und für

eine weitere Stunde zur Membran hinzugegeben. Dadurch wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nach einem weiteren Waschvorgang fand die Belichtung statt. Dafür wurde die Membran, je nach Belichtungszeit, mit einem selbsthergestelltem ECL für 2 Minuten oder einem industriell hergestellten ECL-Prime für 5 Minuten benetzt. Im Fusion XR wurde mittels Programm die Belichtungszeit ermittelt und ausgeführt.

### 3.2.5 Durchflusszytometrie und Zelltodanalyse

#### 3.2.5.1 Anfärbung mittels Annexin V und 7-AAD

Mittels Durchflusszytometrie fand die Zelltodanalyse zur Unterscheidung von nekrotischem Zelltod und Apoptose statt. Dafür wurde die jeweilige Zelllinie verdünnt (Zellzahl  $0,3 \times 10^6/\text{ml}$ ). Anschließend wurde sie, jeweils 48 Stunden vor Analyse, mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Zellzahl erfasst. Zur Vorbereitung und Anfärbung der Zellen mussten diese von ihrem Medium getrennt werden. Dafür wurde 1 ml der Zellsuspension abzentrifugiert und anschließend zweifach mit PBS gewaschen. Danach wurde zu den Zellen 100  $\mu\text{l}$  eines 1/10 verdünnten Binding-Puffers hinzugegeben. In diesem wurden dann 5  $\mu\text{l}$  Phycoerythrin (PE) Annexin V und 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) gelöst.

Annexin V ist ein zelluläres Protein, das an Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin wird im apoptotischen Zustand an der Außenmembran der Zellen exprimiert. Durch PE, ein Fluorochrom, wird die Reaktion sichtbar gemacht. 7-AAD ist ein Fluoreszenz-Marker, der mit hoher Affinität an DNA bindet, wenn eine Zelle zugrunde gegangen ist.

Anschließend mussten die angefärbten Proben in Dunkelheit 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Zum Schluss wurden weitere 400  $\mu\text{l}$  des verdünnten Binding Puffers hinzugegeben. Zuletzt wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert. Dabei ergaben sich lebende, apoptotische und tote Zellkohorten (s. **Tab. 12**).

**Tab. 12: Anfärbung der Zellen je nach Zustand**

Darstellung der Anfärbung der Zellen je nach Zustand (lebend, apoptotisch, tot).

Zustand der Zellen	Annexin V	7-AAD
Lebend	-	-
Apoptotisch	+	-
Tot	+	+

### 3.2.5.2 Erfassung des spezifischen Zelltods

Apoptose stellt nur eine von vielen Zelltodmechanismen dar. Um nachzuweisen, dass der in durchflusszytometrischen Versuchen verursachte Zelltod auf die Smac Mimetics zurückzuführen ist, wurde folgende Formel angewendet:

$$100 * \left( \frac{(\text{experimentell tote Zellen (\%)} - \text{spontan tote Zellen (\%)})}{(100\% - \text{spontan tote Zellen (\%)})} \right)$$

Experimentell tote Zellen: jeglicher Zelltod nach Behandlung.

Spontan tote Zellen: jeglicher Zelltod der unbehandelten Kontrolle.

## 4 Ergebnisse

Das vorliegende Projekt beschäftigte sich mit neuen Therapieoptionen durch Smac Mimetics (SM) in B-Zell-Lymphomen, im Speziellen dem Mantelzelllymphom und den Diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen. SM imitieren das physiologisch aus Mitochondrien stammende Enzym Smac, welches eine tragende Rolle in der Apoptoseinduktion spielt (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Apoptose ist eine wichtige Art des programmierten Zelltods. Sie wird durch viele Proteine moduliert, stimuliert und inhibiert (Heinrich et al., 2014). Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAPs) tragen wesentlich zu dieser Hemmung bei (Salvesen et al., 2002). Es gibt viele verschiedene Mechanismen, die zur Apoptose-Resistenz in malignen Neoplasien beitragen. Die Überexpression von IAPs gehört dazu und geht mit einer schlechten Prognose einher (Fulda, 2009; Mohamed et al., 2017).

Um diese unkontrollierte Hemmung des programmierten Zelltods zu unterbinden, wurden in diesem Projekt zwei SMs, LCL161 und BV-6, an MCL- und DLBCL-Zelllinien getestet. Die Medikamente sollten zur Degradation der IAPs führen und somit die Apoptose einleiten. Weiterhin sollten mögliche Synergien mit konventionellen Chemotherapeutika und niedermolekularen Arzneimitteln, sogenannten „small molecules“, gefunden werden.

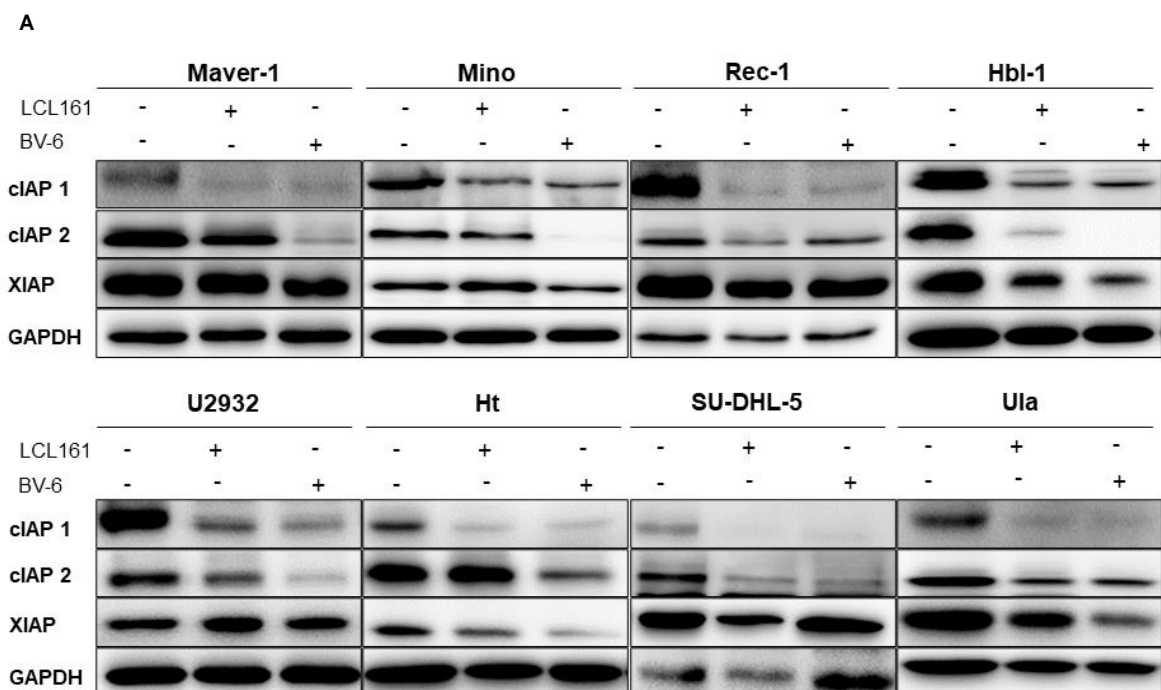
Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass Smac Mimetics einen zytotoxischen Effekt auf den ABC-Subtyp der DLBCL-Zelllinien haben (Y. Yang et al., 2016). Die zugrunde liegende Hypothese war, dass die chronische BZR-Aktivierung dieses Subtyps ihn besonders anfällig für Smac Mimetics macht. Dies sollte nun auch für andere Lymphom-Subtypen und (der Kenntnis der Arbeitsgruppe nach erstmalig) an MCL-Zelllinien getestet werden.

### 4.1 Zytotoxizität der Smac Mimetics

#### 4.1.1 Smac Mimetics induzieren IAP-Degradation

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Smac Mimetics auf die IAPs wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Degradation der IAPs durch Behandlung mit Smac Mimetics sollte als erfolgreicher Nachweis dienen.

Grundsätzlich exprimierten alle Zelllinien im unbehandelten Zustand XIAP sowie cIAP1 und 2. Eine Beeinflussung der Expression durch die Smac Mimetics war in allen Zelllinien nachweisbar. Auffällig war der in **Abb. 5** dargestellte starke Abfall der cIAP1-Expression nach Behandlung mit den Smac Mimetics. Die cIAP1-Degradation lässt sich im Vergleich der Zelllinien kaum unterscheiden. Die cIAP2-Degradation fand hingegen vermehrt durch BV-6 statt. Auffällig ist hier, dass bei den Zelllinien Rec-1 und Ula die cIAP2-Expression durch BV-6 weniger beeinflusst scheint als bei den anderen Zelllinien. Die XIAP-Expression blieb insgesamt durch Behandlung weniger beeinflusst. Höchstens eine leichte Abnahme durch BV-6 wurde in verschiedenen Zelllinien (Maver-1, Mino, Hbl-1, Ht, Ula) sichtbar.



**Abb. 5: Western Blot zur Darstellung der IAP-Degradation nach Behandlung mit Smac Mimetics**

**A)** Zellen wurden mit 5  $\mu$ M der Smac Mimetics behandelt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression von cIAP1 und 2 und XIAP mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

**B)** Tabellarische Darstellung der Proteinexpression der einzelnen Zelllinien (ZL) nach Behandlung mit den Smac Mimetics (SM) LCL 161 (L) und BV-6 (B).

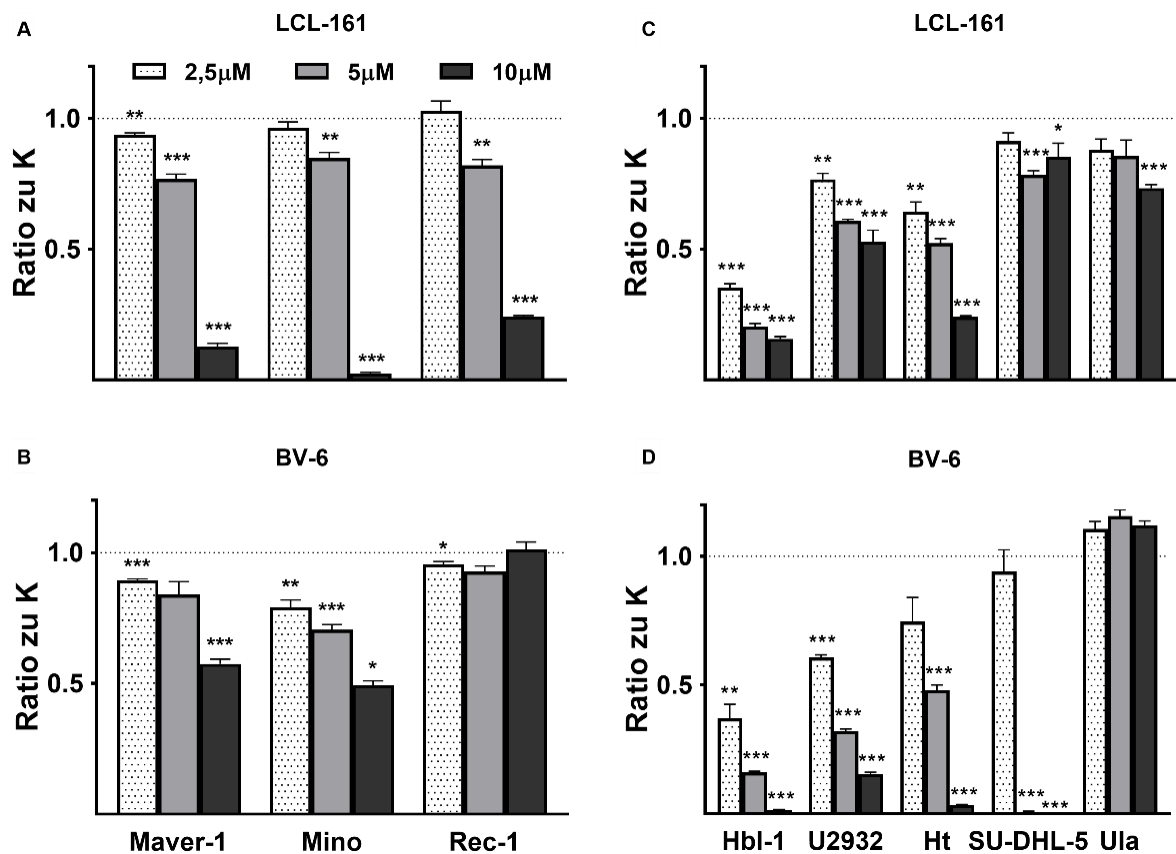
#### 4.1.2 Smac Mimetics rufen eine dosisabhängige Zytotoxizität hervor, insbesondere im ABC-Subtyp

Nachdem die Degradation der cIAPs in den Zelllinien nachgewiesen war, sollte der Zelltod durch die Smac Mimetics überprüft und verglichen werden, da Smac-vermittelte Degradation von cIAPs nicht mit einer antitumoralen Aktivität gleichzusetzen ist (Fulda, 2015). Zu Beginn wurde eine Dosisfindung durchgeführt. Als erstes wurden alle Zelllinien mit jeweils 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  der beiden Smac Mimetics (LCL161, BV-6) behandelt und im Viabilitätsassay analysiert. Das Überleben der Zellen wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Es wurde sich für die Dosisfindung an bereits vorhergehenden Versuchen orientiert (Bhatti, Abhari, & Fulda, 2017; Weisberg et al., 2010).

Es zeigte sich ein signifikanter, dosisabhängiger Effekt für beide Medikamente auf die Viabilität, wie in **Abb. 6** dargestellt.

Die MCL-Zelllinien (**Abb. 6 A & B**) sprachen alle ähnlich auf LCL161 mit einem signifikanten Rückgang ab 5  $\mu\text{M}$  an. Bei BV-6 sah dies anders aus. Maver-1 und Mino reagierten schon bei niedrigeren Dosen auf BV-6. Es hatte jedoch keinerlei zytotoxischen Effekt auf Rec-1.

LCL161 zeigte bei allen DLBCL-Zelllinien ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt, der vor allem bei den ABC-Subtypen Hbl-1 und U2932, aber auch beim GCB-Subtyp Ht ausgeprägt war. BV-6 führte zu einem starken Zellrückgang bei den DLBCL-Zellen (**Abb. 6 C & D**). Bei einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  waren fast alle DLBCL-Zelllinien tot, mit Ausnahme von Ula. Sie schien wie Rec-1 keinerlei Ansprechen auf BV-6 zu zeigen. Vor allem die ABC-Subtypen, Hbl-1 und U2932, aber auch GCB-Subtyp Ht gingen durch beide Smac Mimetics zugrunde.



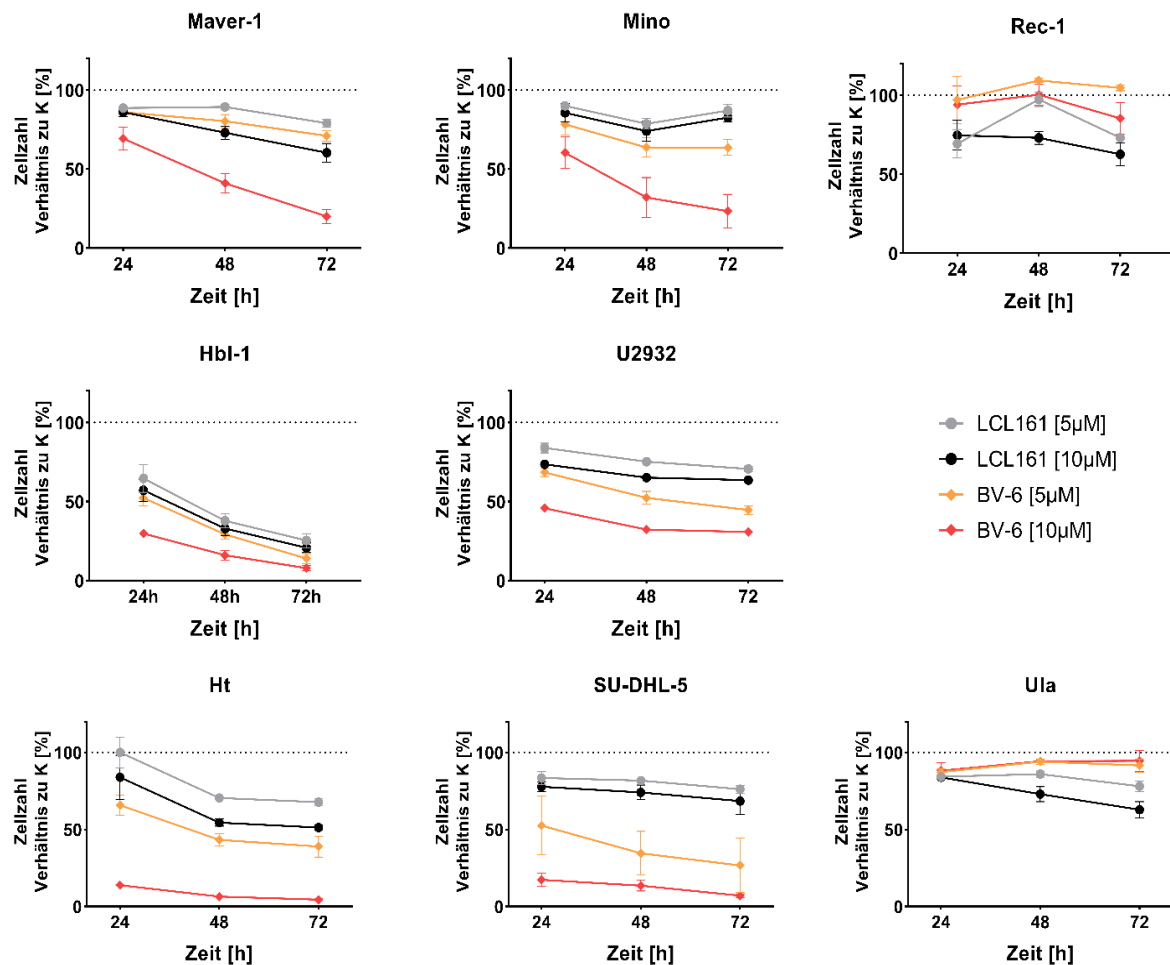
**Abb. 6: Dosisabhängige Zytotoxizität nach Behandlung mit Smac Mimetics**

Zellen (Maver-1, Mino, Rec-1, Hbl-1, U2932, Ht, Su-DHL-5, Ula) wurden mit LCL161 (A & C)/BV-6 (B & D) mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. Analyse fand mittels Zell-Proliferationsassay (WST-1) nach 48 h statt. Darstellung des Zellüberlebens im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (K). MW und SEM zeigen drei Replikate. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt, Vergleich zur unbehandelten Kontrolle \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3 Zelltod durch Smac Mimetics ist zeitabhängig

Um die zeitabhängige Auswirkung der Smac Mimetics zu überprüfen, fand eine Zellzählung mittels ViCell XR statt. Die Zellen wurden hierfür mit beiden Smac Mimetics mit einer Dosis von jeweils 5 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt. Anschließend fand eine Zellzählung nach 24, 48 und 72 Stunden statt, die mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen wurden.

Es wurde eine ähnliche Reaktion wie im Assay sichtbar (s. **Abb. 7**). Bei den MCL-Zelllinien reagierten Maver-1 und Mino sehr ähnlich. Bei beiden Smac Mimetics nahm das Zellwachstum dosis- und zeitabhängig ab. Ausgeprägter war dieser Effekt durch die Behandlung mit BV-6 zu sehen. Die Zellen der Linie Rec-1 veränderten ihr Wachstum kaum nach Behandlung mit den Smac Mimetics. Nur LCL161 in der Höchstdosis von 10  $\mu\text{M}$  führte über 72 Stunden zu einem Zellrückgang.



**Abb. 7: Zeitabhängige Zytotoxizität nach Behandlung mit Smac Mimetics**

Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der beiden Smac Mimetics behandelt und inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die Zellzahl mittels ViCell XR überprüft. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, dargestellt sind MW und SEM. Darstellung der Zellzahl in Prozent im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (K).

Für die DLBCL-Zelllinien stellte es sich wie folgt dar: Die ABC-Subtypen Hbl-1 und U2932 zeigten bei beiden SMs einen dosis- und zeitabhängigen Wachstums-Abfall im Vergleich zur Kontrolle. Insgesamt war dieser Effekt für Hbl-1 ausgeprägter und bei beiden Zelllinien durch BV-6 stärker nachweisbar. GCB-Subtypen Ht und SU-DHL-5 sprachen auf beide Therapien mit einem Abfall der Zellzahl an, jedoch stärker auf die Therapie mit BV-6. Ula sprach auf die Behandlung ähnlich wie Rec-1 an.

Ulas Zellzahl ließ sich durch BV-6 kaum bis gar nicht beeinflussen. LCL161 hatte, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den anderen Zelllinien, einen sichtbaren Effekt auf die Zellzahl.



## 4.2 Zelltodmechanismen unter Smac-Mimetics-Therapie

Nachdem die Zytotoxizität der Smac Mimetics auf die Zelllinien bestätigt war, sollte ermittelt werden, ob es sich bei dem ausgelösten Zelltod tatsächlich um Apoptose handelt. Aus diesem Grund wurden Durchflusszytometrie sowie Western-Blot-Analysen durchgeführt.

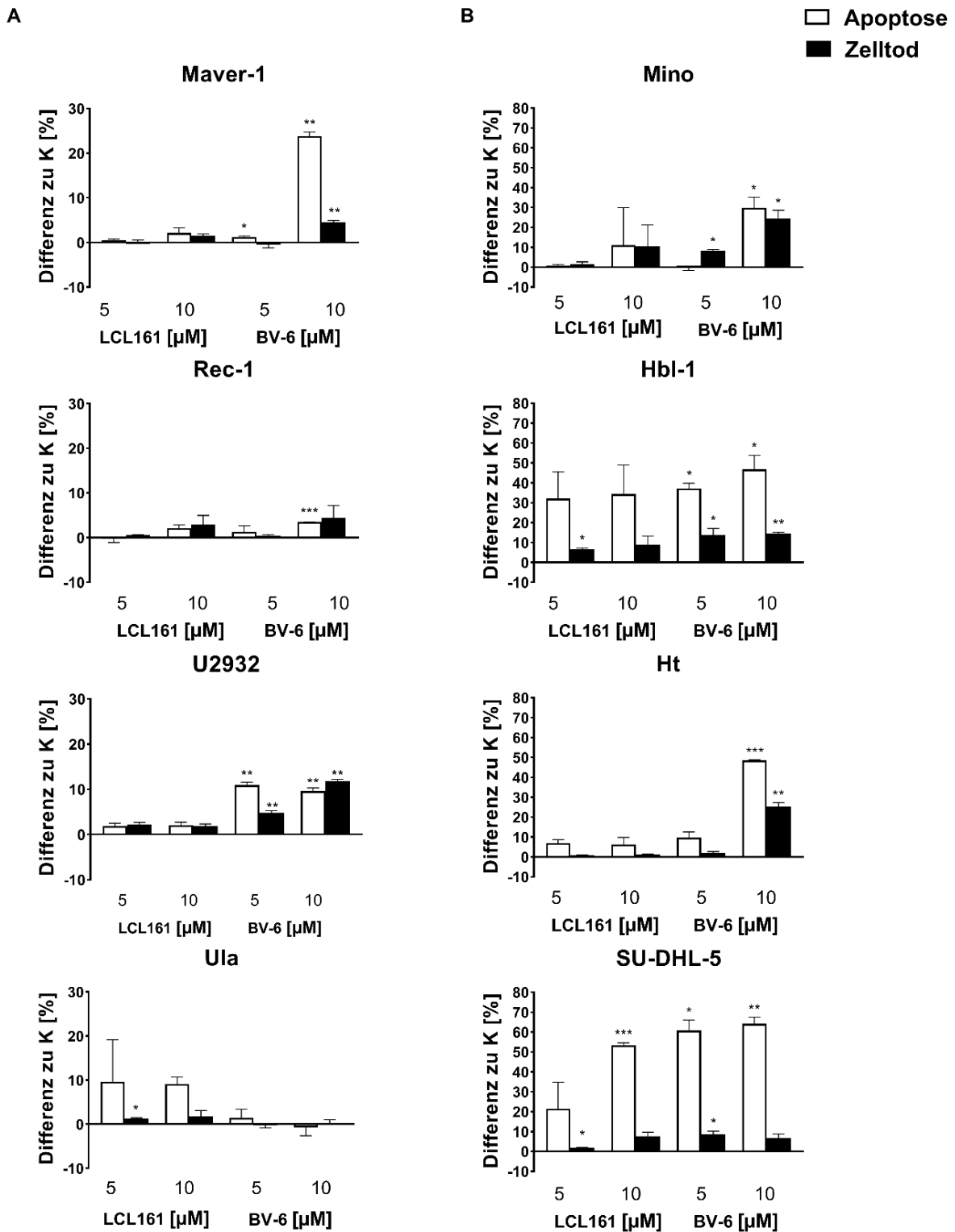
### 4.2.1 BV-6 führt zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose in den Zelllinien

Es fand eine durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien nach Behandlung statt, um die Mechanismen des Zelltods genauer zu betrachten. Mittels Anfärbung mit PE Annexin und 7-AAD in der FACS-Analyse sollte die Differenzierung in tote respektive apoptotische Zellen stattfinden (s. **Tab. 12**). Die Zellen wurden hierfür mit jeweils 5 und 10  $\mu\text{M}$  der Smac Mimetics behandelt und 48 Stunden inkubiert. Nach Anfärbung fand die FACS-Analyse statt (s. **Abb. 8**).

Für die MCL-Zelllinien ließ sich zeigen, dass Maver-1 und Mino nur auf die Höchstdosis von BV-6 mit einem signifikanten Anstieg der Apoptose reagierten. Rec-1 hingegen zeigte sich weitgehend resistent gegen jegliche Behandlung.

Dies war für die DLBCL-Zelllinien anders. Bei diesen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptose durch die Behandlung mit BV-6 bei den DLBCL-Zelllinien (Hbl-1, U2932, Ht, Su-DHL-5). Ausnahme blieb die Zelllinie Ula.

Teils zeigte sich nach Behandlung mit LCL161 auch apoptotischer Zelltod bei den DLBCL-Zelllinien, jedoch nicht in einem so signifikanten Ausmaß. Hbl-1 und Su-DHL-5, die beide mit starkem Anstieg der Apoptose beziehungsweise des Zelltods reagierten, sprachen auch mit einem leicht signifikanten Anstieg auf LCL161 an, ebenso die Zelllinie Ht. Bei Ula wurde Zelltod durch LCL 161 ausgelöst, nicht jedoch durch BV-6.



**Abb. 8: Darstellung von Apoptose und Zelltod nach Behandlung mit Smac Mimetics**

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der beiden Smac Mimetics behandelt und 48 h inkubiert. Der Zelltod wurde anschließend mittels PE Annexin V und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Darstellung des Zelltods mittels prozentualer Differenz zur unbehandelten Kontrolle (K).

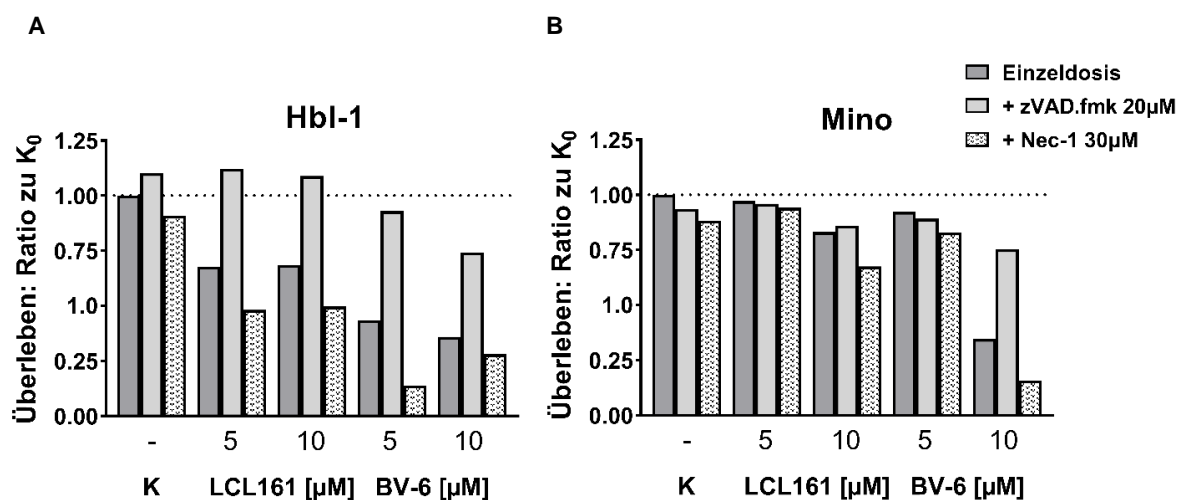
Zwei verschiedene Skalierungen wurden genutzt. Für **A)** Maver-1, Rec-1, U2932, Ula bis 30 % und **B)** Mino, Hbl-1, Ht und Su-DHL-5 bis 80 %.

Mittelwert und SEM von zwei Versuchen sind abgebildet. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt und im Verhältnis zu K abgebildet. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Zellrettung durch Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor

Zur weiteren Zelltodanalyse wurden die Zelllinien jeweils mit einem Pancaspase-Inhibitor (zVAD-fmk (20  $\mu$ M)) oder einem RIP1-Kinase-Inhibitor (Necrostatin (30  $\mu$ M)) vorbehandelt. Anschließend wurden sie mit 5 beziehungsweise 10  $\mu$ M der Smac Mimetics therapiert. Es wurden eine unbehandelte Kontrolle (K), Zellen, die nur mit den Smac Mimetics behandelt wurden, und die vorbehandelten Zellen ausgewertet und verglichen. Die Vorbehandlung sollte Rückschlüsse auf die Art des Zelltods ermöglichen. Durch die oben genannten Inhibitoren wurde eine Verhinderung des Zelltods nach zytotoxischer Therapie mit den Smac Mimetics erwartet: die Effektorcaspasen im Apoptose-Signalweg würden gehemmt oder die Nekroptose verhindert werden.

Die Ergebnisse ließen nur im ABC-Subtyp Hbl-1 (s. **Abb. 9 A**) eine eindeutige Zuordnung zum caspasenvermittelten Zelltod zu, da hier durch die Vorbehandlung mit zVAD-fmk-Zelltod verhindert wurde. Bei allen anderen Zelllinien ließ sich dieser Effekt nur eingeschränkt beobachten (s. **Abb. 9 B**). Weiterhin ist auffällig, dass durch die Kombination der SMs mit Nec-1 sogar weniger Zellen überlebten als mit der Einzeldosis der jeweiligen SMs.



**Abb. 9: Darstellung des Zelltodverhaltens nach Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor/ RIP1-Kinase-Inhibitor**

Der Versuch wurde für alle Zelllinien durchgeführt. Hbl-1 (**A**) und Mino (**B**) sind exemplarisch abgebildet. Die Zellen wurden mit zVAD-fmk und Necrostatin (Nec-1) in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und anschließend mit 5  $\mu$ M/10  $\mu$ M der beiden Smac Mimetics für 48 h inkubiert. Der Zelltod wurde anschließend mittels PE Annexin V und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Darstellung des Überlebens im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (K<sub>0</sub>). Der Versuch wurde einmalig durchgeführt.

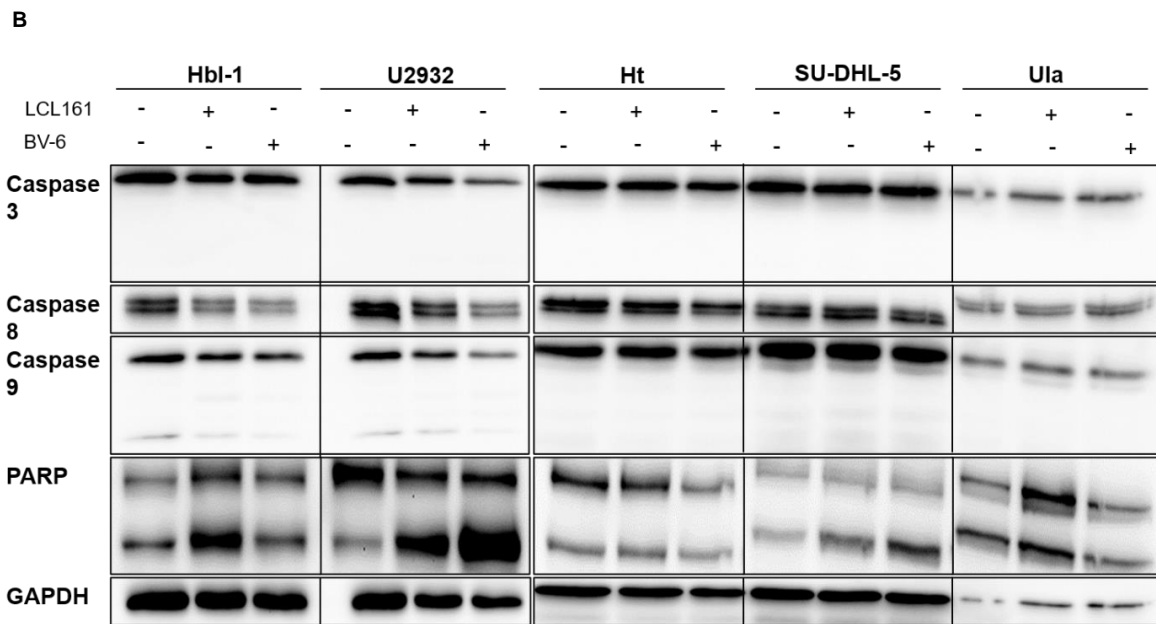
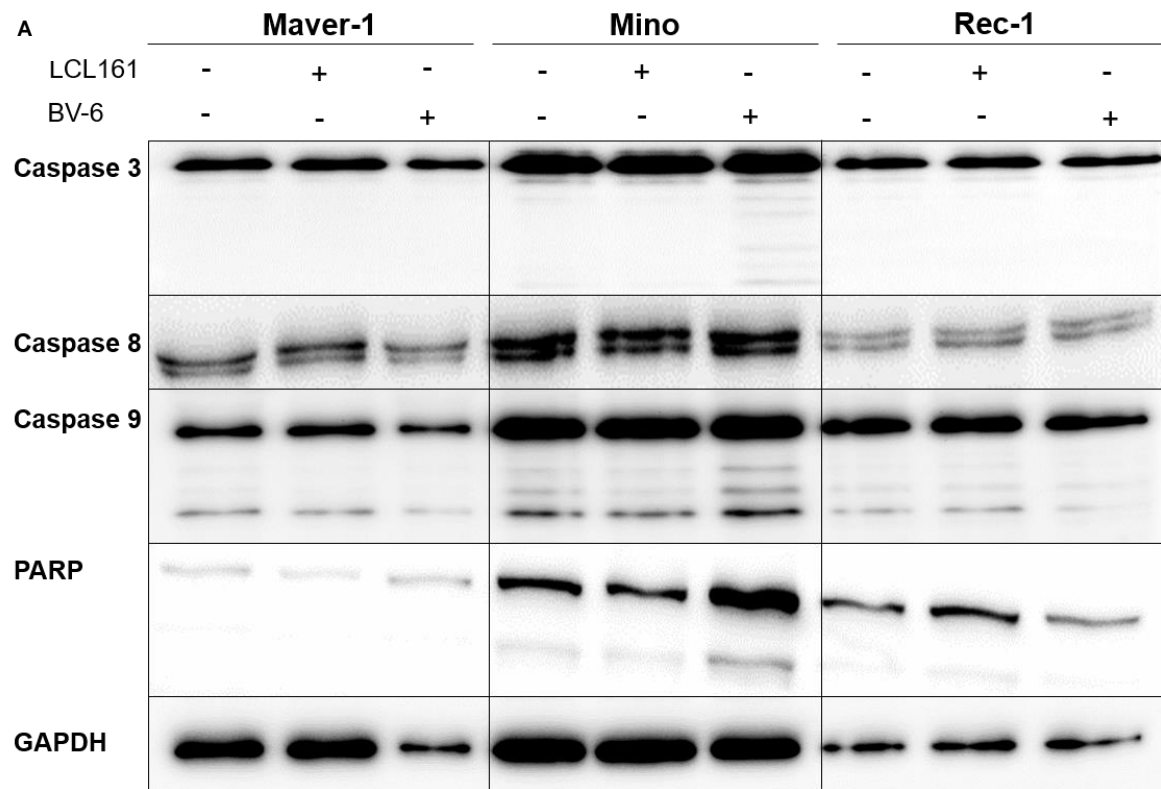
### 4.2.3 Smac Mimetics führen zur Spaltung von Caspasen und PARP

Caspasen spielen eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod. Sie tragen durch proteolytische Vorgänge dazu bei, dass die Apoptose eingeleitet und ausgeführt wird (Galluzzi et al., 2018). PARP ist ein Enzym, das DNA-Schäden repariert. Im Rahmen des apoptotischen Prozesses wird es durch die Caspase 3 gespalten (Kaufmann, Desnoyers, Ottaviano, Davidson, & Poirier, 1993; Soldani & Scovassi, 2002). Zur Analyse des extrinsischen sowie intrinsischen Signalwegs und der Ausführung der Apoptose durch Caspase 3 wurden die beiden Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie die Effektor-Caspase 3 ausgewählt.

Nach Behandlung der Zelllinien mit jeweils 5  $\mu$ M der Smac Mimetics wurden die PARP-Spaltung und Caspasen 3-, 8- und 9-Aktivierung mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Da die Caspasen durch Proteolyse aktiv werden, sollte diese im Western Blot dargestellt werden.

Bei allen drei MCL-Zelllinien (s. **Abb. 10 A**) ließ sich eine Veränderung nach Behandlung nachweisen. Die Spaltung der Caspasen und PARP wurde vor allem bei Mino sichtbar. BV-6 zeigte den stärkeren Effekt hinsichtlich der proteolytischen Aktivierung. Die PARP-Spaltung in der Zelllinie Rec-1 blieb nach BV-6-Behandlung hingegen aus.

ABC-Subtypen Hbl-1 und U2932 zeigten eine starke PARP- und eine leichte Caspase 9-Spaltung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. **Abb. 10 B**). In den GCB-Subtypen Ht und Su-DHL-5 wurde ebenfalls eine Spaltung von PARP nach Behandlung sichtbar. Ula stellte diesen Effekt nur bei LCL161-Therapie dar. Die PARP-Spaltung der Zelllinie Ula wirkte durch das Smac Mimetic BV-6 geradezu gehemmt.



**C**

ZL	Maver-1			Mino			Rec-1			Hbl-1			U2932			Ht			SU-DHL-5			Ula		
	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B
C3	—	—	—	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	—
P	—	—	—	✓	✓	✓	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

— = keine Spaltung, ✓ = leichte Spaltung, ✓ = starke Spaltung

**Abb. 10: Western Blot zur Darstellung der Zelltodmechanismen nach Behandlung mit Smac Mimetics**

MCL-Zelllinien (**A**) und DLBCL-Zelllinien (**B**) wurden mit 5  $\mu\text{M}$  der Smac Mimetics behandelt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression von Caspasen 3, 8 und 9 und PARP mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. GAPDH diente als Ladekontrolle.

(**C**) Tabellarische Darstellung der Proteinspaltung von Caspasen 3 (C3), 8 (C8), 9 (C9) und PARP (P) in den einzelnen Zelllinien (ZL) nach Behandlung mit den Smac Mimetics (SM) LCL 161 (L) und BV-6 (B).

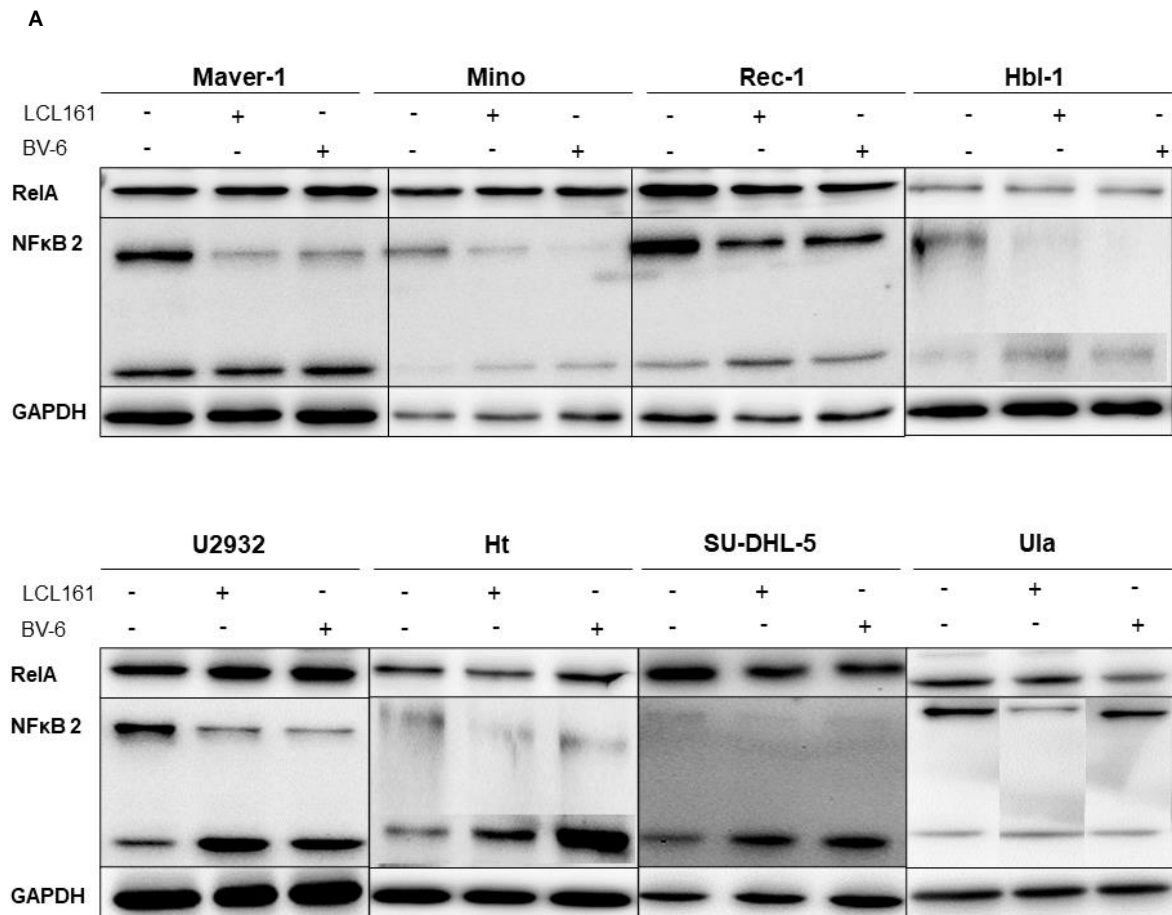
### 4.3 Aktivierung des nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Smac Mimetics in allen Zelllinien

Eine Rolle der cIAPs im NF- $\kappa$ B-Signalweg hat sich bereits etabliert. Sie stimulieren den klassischen und hemmen den alternativen Signalweg (Fulda & Vucic, 2012). In multiplen verschiedenen Versuchsansätzen offenbarte sich, dass bei Antagonisierung und Degradation der cIAPs – beispielsweise durch Smac Mimetics – nicht nur der alternative Signalweg induziert wird. Es führt auch dazu, dass TNF- $\alpha$  transkribiert wird. Die Transkription wiederum trägt zur Induktion des extrinsischen Signalwegs der Apoptose bei (Bertrand et al., 2008; Fulda, 2015; Varfolomeev et al., 2007; Vince et al., 2007; L. Wang et al., 2008). Nun sollte gezeigt werden, ob der alternative Signalweg auch in den genutzten Lymphom-Zelllinien aktiviert wird.

Zudem war bereits bekannt, dass der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg unter anderem durch cIAP1/2 im ABC-Subtyp der DLBCL-Zelllinien angetrieben wird (Y. Yang et al., 2016). Dies trägt zur Beibehaltung der chronischen B-Zell-Rezeptor-Aktivierung bei (Davis et al., 2010; Eric Davis et al., 2001). Jetzt stellte sich die Frage, ob sich dieser Signalweg auch in den MCL-Zelllinien beeinflussen lässt, da auch hier der NF- $\kappa$ B-Signalweg im Rahmen des BZR-Signalwegs einen wichtigen Anteil zum Überleben dieser Zellen beiträgt (Rahal et al., 2014; Saba et al., 2016). Getestet wurde die Expression der p-Untereinheiten (p100 und p52) des nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs sowie die Expression von p65 (RelA) nach Behandlung mit beiden Smac Mimetics. RelA wird bei Aktivierung in den Zellkern transloziert. Der nicht kanonische Signalweg wird normalerweise durch die cIAPs inhibiert (s. **Abb. 4**).

Wie **Abb. 11** zeigt, war nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  der Smac Mimetics eine Proteinabnahme der inaktiven p100-Untereinheit und eine Zunahme der Expression der aktiven p52-Untereinheit im Western Blot in allen Zelllinien sichtbar. Bei Vergleich zwischen LCL161 und BV-6 ließ sich in der Analyse, außer in den Zelllinien Rec-1 und Ula, kein Unterschied feststellen. Die Proteinexpression von p52 war durch das Smac Mimetic LCL161 in diesen beiden Zelllinien ausgeprägter. Die Untereinheit

von NF-κB p65 zeigte in der Analyse wenig bis keine Veränderung nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle.



**B**

ZL	Maver-1			Mino			Rec-1			Hbl-1			U2932			Ht			SU-DHL-5			Ula		
SM	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B	-	L	B
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	✓	✓	✓	-		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

— = kein Effekt, ✓ = leichte Spaltung, ✓ = starke Spaltung

**Abb. 11: Western Blot zur Darstellung der NF-κB Aktivierung nach Behandlung mit Smac Mimetics**

**(A)** Zellen wurden mit 5 μM der Smac Mimetics behandelt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression von RelA (p65) und NF-κB2 (p100/52) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

**(B)** Tabellarische Darstellung der Proteinexpression von RelA (R) bzw. -spaltung von NFκB2 (N) in den einzelnen Zelllinien (ZL) nach Behandlung mit den Smac Mimetics (SM) LCL 161 (L) und BV-6 (B).

#### 4.4 Kombinationstherapien mit Smac Mimetics

Chemotherapie führt durch verschiedene Mechanismen zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen (Kaufmann & Earnshaw, 2000). Tumoren haben gleichzeitig vielfältige Mechanismen, den programmierten Zelltod zu umgehen, darunter gilt auch die Überexpression von IAPs als möglicher Einflussfaktor (Fulda, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). Die Überexpression von XIAP in DLBCLs ist beispielsweise mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Hussain et al., 2010). Die Fragestellung war, ob Smac Mimetics möglicherweise apoptotische Resistenzmechanismen in den Zelllinien reduzieren, da bereits in anderen in-vitro-Versuchen gezeigt wurde, dass SMs in Kombination mit Chemotherapeutika, aber auch mit immunologischen Inhibitoren, synergistisch wirken (Fulda, 2015; Löder et al., 2012; Probst et al., 2010; Weisberg et al., 2007; Y. Yang et al., 2016). Aus diesem Grund sollten die Zelllinien abschließend in Kombinationen mit verschiedenen small molecules und Chemotherapeutika getestet werden.

Es wurden der BTK-Inhibitor Ibrutinib, der auf den BZR-Signalweg wirkt und der BCL-2-Inhibitor Venetoclax, welcher direkt auf die Induktion der Apoptose Einfluss nimmt, als small molecules ausgewählt. Für diese Medikamente war zum Teil bereits ein synergistischer Effekt beschrieben worden (Ramakrishnan et al., 2016; Y. Yang et al., 2016).

Ferner wurden Doxorubicin und Cytarabin als Chemotherapeutika ausgewählt. Beide werden in der Behandlung von MCL sowie DLBCL als Standardtherapie genutzt (M. Dreyling et al., 2016; Pfreundschuh, 2016).

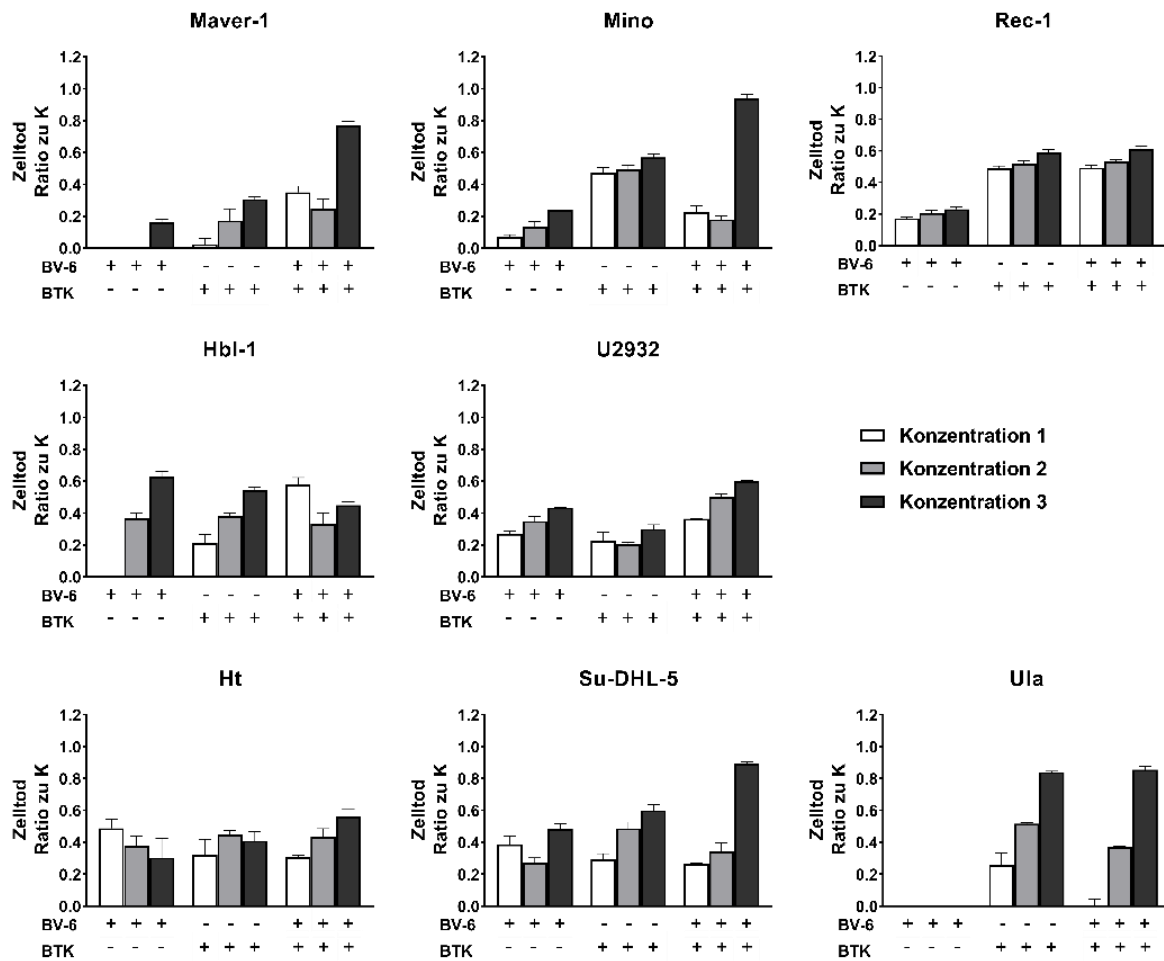


#### 4.4.1 Ibrutinib eignet sich bei Maver-1 und Mino für die Kombinationstherapie

Ibrutinib ist ein Inhibitor der Bruton's Tyrosinkinase (Honigberg et al., 2010). BTK spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs, unter anderem des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Mohamed et al., 2009). 2014 wurde Ibrutinib in Deutschland für die Rezidiv-Therapie des MCL zugelassen, da es die Anzahl an Remissionen nach Behandlung signifikant steigerte (Dreyling et al., 2016; M. L. Wang et al., 2013). Auch im ABC-Subtyp ist ein positiver Effekt durch Ibrutinib bereits beschrieben worden (Davis et al., 2010; W. H. Wilson et al., 2015).

In den vorliegenden Versuchen wurden Smac Mimetics und Ibrutinib in Kombination getestet, um mögliche Synergien in der Inhibition des BZR-Signalwegs zu erfassen.

Alle Zelllinien wurden sowohl einzeln als auch in Kombination mit BV-6 und Ibrutinib behandelt. Der Effekt wurde anschließend mittels WST-1 Assay analysiert. Es ergab sich für Maver-1 und Mino in den Höchstdosen der beiden Medikamente ein positiver Kombinationsindex (CI). Für diese beiden Zelllinien wurde dementsprechend ein synergistischer Effekt nachgewiesen. Dieser Effekt ergab sich für die anderen Zelllinien nicht. Die Kombination erzielte in Rec-1 und U1a ähnlichen Zelltod wie Ibrutinib in Einzeldosis, was stimmig mit ihrem bisherigen Ansprechen auf die SM-Behandlung erschien. Teilweise ließ sich trotz sichtbar höherer Zelltodrate kein positiver CI nachweisen (U2932, Ht, Su-DHL-5). Dass BTK-Inhibitor und Smac Mimetics in DLBCL-Zelllinien nicht synergistisch wirken würden, hatten Yang et al. 2016 bereits postuliert. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden (s. **Abb. 12**).



**Abb. 12: Zelltod nach Kombinationsbehandlung mit BTK-Inhibitor und Smac Mimetics**

Zellen wurden in den angegebenen Konzentrationen mit BV-6 und Ibrutinib (BTK) behandelt. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation. Analyse erfolgte mittels WST-1 Assay. Zelltod wurde ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (K) gesetzt. Combination Index (CI) wurde nach Chou-Talalay berechnet. Mittelwert und SEM wurden aus drei Replikaten ermittelt.

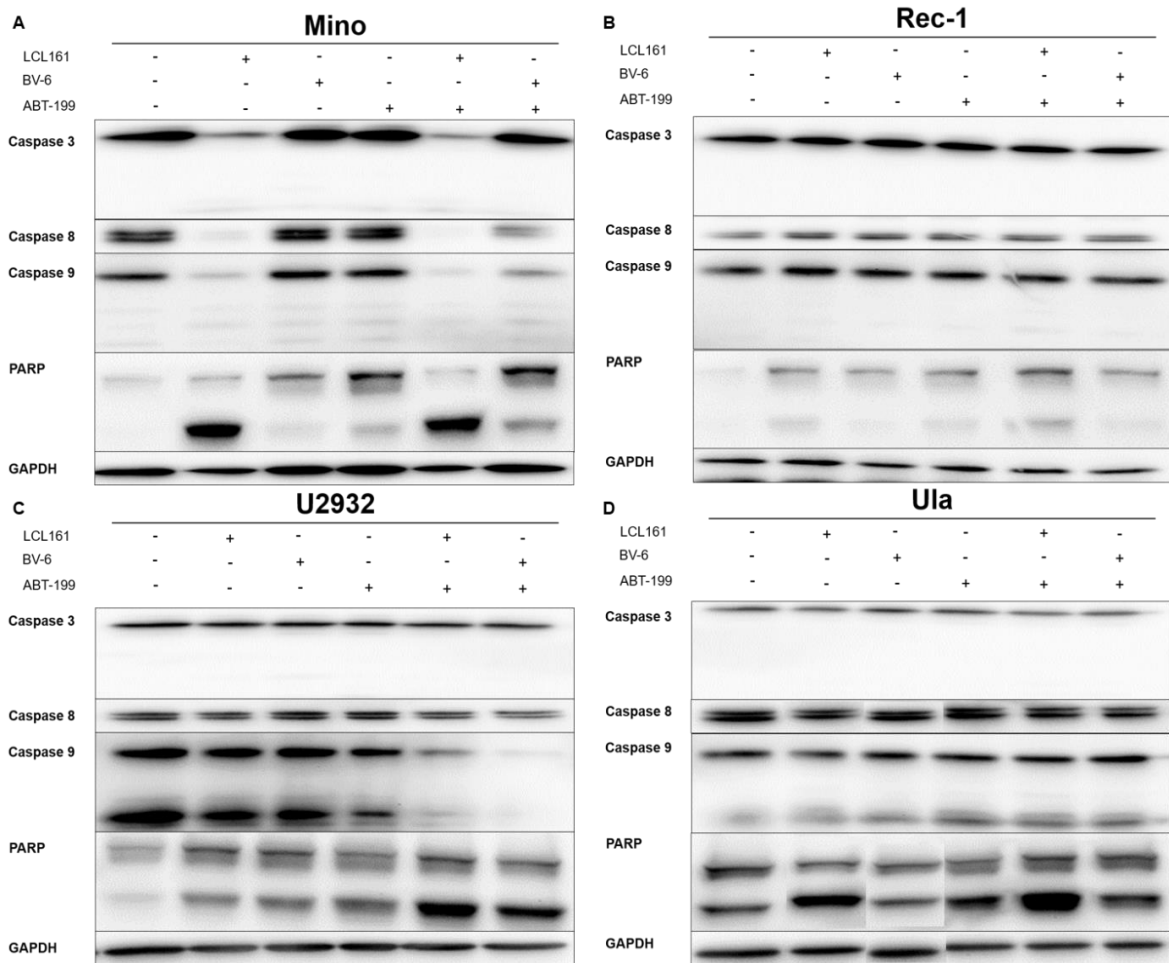
Maver-1 CI = **0,35**; Mino CI = **0,26**.

Konzentrationen MCL: K1: 1,25  $\mu$ M BV-6/BTK, K2: 2,5  $\mu$ M BV-6/BTK, K3: 5  $\mu$ M BV-6/BTK. Konzentration DLBCL: K1: 0,625  $\mu$ M BV-6/0,313  $\mu$ M BTK, K2: 1,25  $\mu$ M BV-6/0,625  $\mu$ M BTK, K3: 2,5  $\mu$ M BV-6/1,25  $\mu$ M BTK.

#### 4.4.2 Venetoclax in Kombination mit Smac Mimetics führt zur PARP-Inaktivierung

Venetoclax ist ein BCL-2-Inhibitor, der das anti-apoptotische Protein BCL-2 spezifisch hemmt (Souers et al., 2013). BCL-2 sorgt für das Aufrechterhalten der anti-apoptotischen Signale und inhibiert die Porenbildung durch Bax und Bak (Kale et al., 2018). Eine Überexpression von BCL-2 ist laut einem Review von Klanova & Klener in 49–67 % der DLBCL-Fälle und in quasi 100 % der MCL-Fälle vorkommend, was es zu einem interessanten Therapieziel in der Lymphomtherapie macht (Klanova & Klener, 2020). Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax ist zudem seit 2016 in der Therapie der CLL zugelassen (Wendtner, Dreger, Eichhorst et al., 2020). Im Rahmen klini-

scher Studien für andere NHL wie MCL und DLBCL zeigten sich erfolgsversprechende Ergebnisse (Davids & Letai, 2013).



**E**

ZL	Mino						Rec-1						U2932						Ula					
M	-	L	B	A	LA	BA	-	L	B	A	LA	BA	-	L	B	A	LA	BA	-	L	B	A	LA	BA
C3	—	✓	✓	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

— = keine Spaltung, ✓ = leichte Spaltung, ✓ = starke Spaltung

**Abb. 13: Western Blot zur Darstellung der Zelltodmechanismen nach Behandlung mit BCL-2-Inhibitor und Smac Mimetics**

Zellen wurden in den angegebenen Konzentrationen mit LCL161 bzw. BV-6 behandelt und mit Venetoclax (ABT-199) kombiniert:

Mino (A): 10µM LCL161/5 µM BV-6 + 2,5 nM ABT-199.

Rec-1 (B) und Ula (D): 5 µM LCL161/2,5 µM BV-6 + 25 nM ABT-199.

U2932 (C): 2,5 µM LCL161/1,25 µM BV-6 + 125 nM ABT-199.

Nach 24 h Inkubation wurde die Proteinexpression der Caspasen 3, 8 und 9 und PARP mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Versuch wurde zweimalig durchgeführt. (E) Tabellarische Darstellung der Proteinspaltung von Caspase 3 (C3), 8 (C8), 9 (C9) und PARP (P) in den einzelnen Zelllinien (ZL) nach Behandlung mit den Medikamenten LCL 161 (L), BV-6 (B) und ABT-199 (A).

Zur Ermittlung der Zelltodmechanismen im Kombinationsversuch mit Venetoclax wurden wieder Mino (**Abb. 13 A**), Rec-1 (**Abb. 13 B**), U2932 (**Abb. 13 C**) und Ula (**Abb. 13 D**) herangezogen. Alle vier Zelllinien wurden mit Smac Mimetics in Einzeldosen und in Kombination mit Venetoclax behandelt, anschließend lysiert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Sie wurden hinsichtlich ihrer PARP- und Caspasen 3, 8, 9-Spaltung untersucht.

In der Zelllinie Mino war die Spaltung von PARP und Caspase 3 nach Behandlung mit LCL161 am stärksten ausgeprägt. In der Kombination fielen kaum Unterschiede in der Proteinexpression auf. Die Expression der Caspasen und PARP in der Zelllinie Rec-1 blieb nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle auffallend gleich. Im ABC-Subtyp U2932 nahm vor allem die PARP-Spaltung in der Kombination mit Venetoclax deutlich zu. Das Gleiche gilt für den GCB-Subtyp Ula, wobei die PARP-Spaltung durch die Kombination von LCL161 und Venetoclax ausgeprägter war als durch BV-6. Zusammenfassend war die Spaltung bei allen Zelllinien in Kombination am ausgeprägtesten.

#### **4.4.3 Chemotherapeutika und Immuntherapie rufen in Kombination mit Smac Mimetics signifikant erhöhte Zelltodrate hervor**

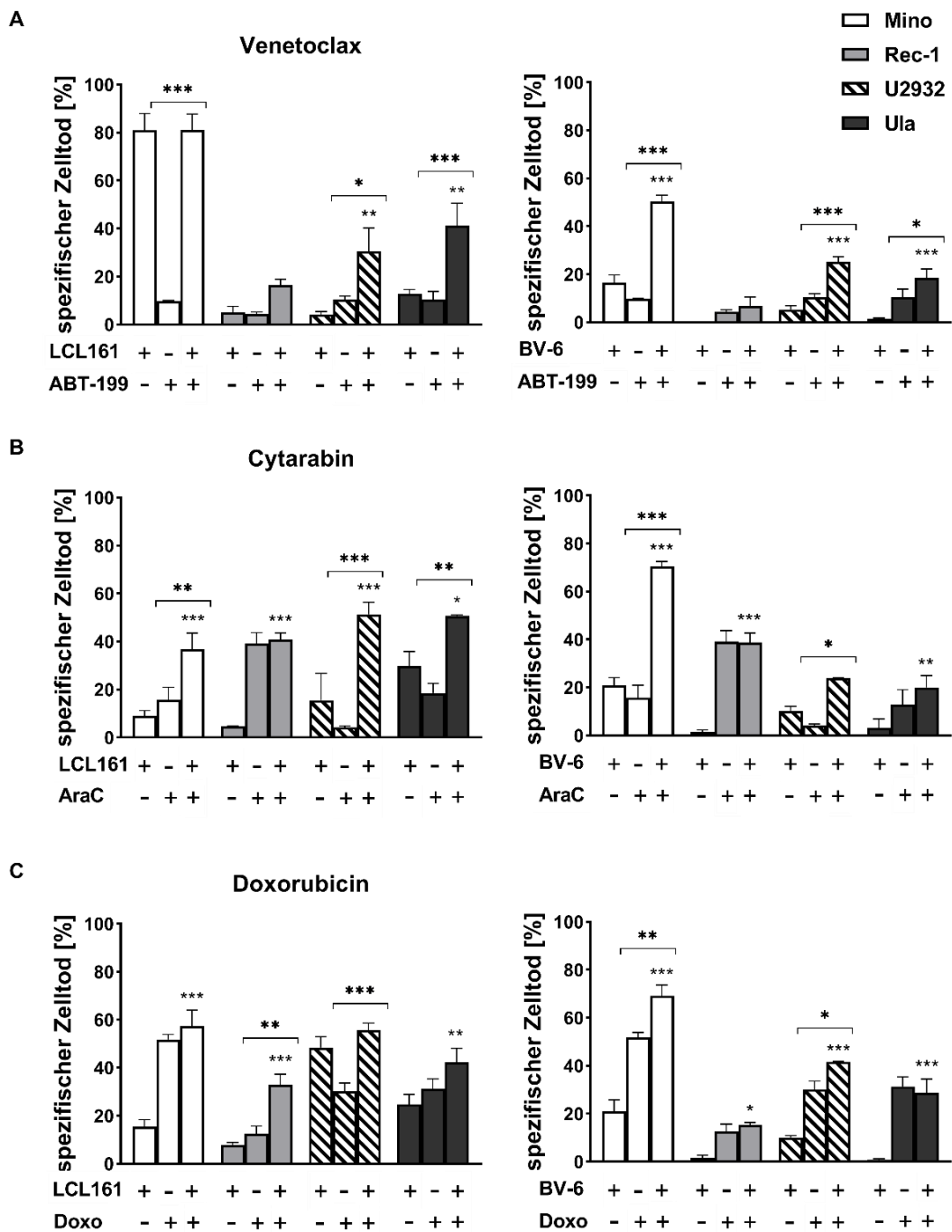
Für die durchflusszytometrische Analyse von Kombinationstherapien wurden die Zelllinien Mino, Rec-1, U2932 und Ula ausgewählt. Zuvor fand für alle Zelllinien eine Dosisfindung mittels WST-1-Assay statt (Daten nicht dargestellt). Zelllinien wurden einzeln und in Kombination mit den Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin sowie dem BCL-2 Inhibitor Venetoclax behandelt. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Zelltodanalyse durchgeführt und der spezifische Zelltod ermittelt.

LCL161 zeigte in Kombination mit Doxorubicin für die Zelllinie Rec-1 einen signifikanten Anstieg der Zelltodrate im Vergleich zu den Einzeldosen. Für die anderen Zelllinien schien der Zelltod vor allem durch Doxorubicin hervorgerufen worden zu sein (Mino, Ula) oder ließ sich nicht klar zuordnen (U2932).

Die Kombination von LCL161 mit Cytarabin bei den Zelllinien Mino, U2932 und Ula mutete sehr effektiv an, mit teils hochsignifikanter Erhöhung der Zelltodrate im Vergleich zu deren Einzeldosen. Für Rec-1 hingegen hatte sie keinen signifikanten Effekt. Der Zelltod durch Cytarabin war in Einzeldosis bereits sehr ausgeprägt.

Venetoclax konnte sich in Kombination für die DLBCL-Zelllinien bewähren, wobei Ula am meisten profitierte. Der Zelltod stieg für Rec-1 zwar an, war jedoch nicht signifikant erhöht. Der Zelltod für Mino war bei einer Erhöhung der Dosis auf 10 µm LCL161 zu ausgeprägt, um andere Effekte zu erkennen.

BV-6 rief in der Kombination mit Doxorubicin und Cytarabin sowohl in Mino als auch U2932 eine signifikante Erhöhung der Zelltodrate hervor. Erkennbar hatte BV-6 sowohl in Einzeldosis als auch in den Kombinationen überhaupt keinen Effekt auf den Zelltod von Rec-1. Besonders bedeutsam ist dahingehend, dass BV-6 plus Venetoclax einen signifikanten Effekt auf den spezifischen Zelltod von Mino, U2932 *und* Ula hatten. Für Rec-1 wurde keine Änderung des Zelltodverhaltens beobachtet.



**Abb. 14: Durchflusszytometrische Darstellung des Zelltods nach Kombinationsbehandlung mit BCL-2-Inhibitor und Smac Mimetics/ Chemotherapeutika und Smac Mimetics**

Zelllinien Mino, Rec-1, U2932 und Ula wurden mit den angegebenen Konzentrationen der beiden Smac Mimetics einzeln und in Kombination mit **A**) Venetoclax (ABT-199), **B**) Cytarabin (AraC) und **C**) Doxorubicin (Doxo) behandelt und 48 h inkubiert.

Venetoclax **A**): 10  $\mu$ M LCL161/5  $\mu$ M BV-6 + 2,5 nM (Mino), 5  $\mu$ M LCL161/2,5  $\mu$ M BV-6 + 25 nM (Rec-1 & Ula), 2,5  $\mu$ M LCL161/1,25  $\mu$ M BV-6 + 125 nM (U2932).

Cytarabin **B**): 5  $\mu$ M LCL161/BV-6 + 50 nM (Mino & Rec-1)/250 nM (U2932 & Ula).

Doxorubicin **C**): 5  $\mu$ M LCL161/BV-6 + 150 nM.

Der spezifische Zelltod wurde anschließend mittels PE Annexin V und 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt und mittels Formel (s. Material und Methoden) berechnet. Darstellung des spezifischen Zelltods in Prozent. Mittelwert und SEM von drei Versuchen sind abgebildet. Signifikanzen ohne Klammern sind im Verhältnis des Smac Mimetics zur Kombination abgebildet. Signifikanzen mit Klammern sind im Verhältnis des Chemotherapeutikums zur Kombination abgebildet. Ermittlung mittels „2way ANOVA“. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 5 Diskussion

Die Untersuchung der Smac Mimetics auf ihre Effektivität in Lymphomzelllinien zeigte, dass sowohl MCL- als auch DLBCL-Zelllinien auf die Behandlung zeit- sowie dosisabhängig ansprachen.

Besonders ausgeprägt war dieser Effekt im ABC-Subtyp (Hbl-1 und U2932) der DLBCL-Zelllinien. Der ABC-Subtyp reagierte in der durchflusszytometrischen Analyse mit einem signifikanten Anstieg der Apoptose, insbesondere bei der Behandlung mit BV-6.

In allen Zelllinien führte die Behandlung im Western Blot zur cIAP-Degradation und Caspasen- sowie PARP-Spaltung. Weiterhin zeigte sich durch die Smac Mimetics eine Proteinexpression des nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Dies lässt darauf schließen, dass die Smac Mimetics nicht nur direkt die Apoptose induzieren, sondern auch, dass sie andere Signalwege hemmen beziehungsweise aktivieren (zum Beispiel den BZR-Signalweg).

Aus diesem Grund wurden die Zelllinien anschließend in Kombination mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib behandelt und die Viabilität im Assay analysiert, wobei die MCL-Zelllinien (Maver-1 und Mino) eine Synergie aufwiesen. In kombinierten Behandlungen mit dem BCL-2-Inhibitor Venetoclax zeichnete sich vor allem für die DLBCLs eine erhöhte Wirkung ab. In der Western-Blot-Analyse ließ sich dies durch eine sichtbar erhöhte PARP-Spaltung nachvollziehen. Smac Mimetics in Verbindung mit konventionellen Chemotherapeutika (Doxorubicin und Cytarabin) bewirkte in allen Zelllinien einen signifikanten Anstieg des spezifischen Zelltods.

### 5.1 Smac Mimetics vermitteln vor allem eine Degradation der cIAPs

Die proteosomale Degradation der IAPs wurde für cIAP1 und 2 in allen MCL- und DLBCL-Zelllinien deutlich. XIAP blieb durch die SM-Behandlung relativ unbeeindruckt und zeigte allenfalls einen leichten Rückgang in der Expression. Dies deckt sich mit Versuchen von Varfolomeev et al. (2007) nach SM-Behandlung. Bei in-vitro-Versuchen mit Brustkrebs-Zelllinien blieb die XIAP-Expression erhalten, während die cIAPs degradiert wurden. Sie korrelierten dies mit WB-Analysen durch Q. H. Yang &

Du (2004) nach in-vitro-Transfektion von IAPs und Smac, bei denen die XIAP-Degradation ebenfalls ausblieb. Yang & Du argumentierten, dass die Interaktion von Smac und XIAP am ehesten auf eine direkte Inhibition zurückzuführen ist. Die cIAP-Degradation resultiert hingegen am ehesten aus einer Smac-induzierten Auto-Ubiquitylierung (Q. H. Yang & Du, 2004). Nachfolgend wurde gezeigt, dass Smac Mimetics die BIR-Domäne der cIAPs binden. Die BIR-Domäne ermöglicht den cIAPs normalerweise, als Monomer vorzuliegen. Durch Bindung wird die RING-Domäne der cIAPs frei, was in einer Dimerisierung resultiert und zur Aktivierung der E3-Ligase-Aktivität der cIAPs führt. Daraufhin folgt die eigene Ubiquitylierung und Degradation (Dueber, 2011; Feltham et al., 2011; Mace et al., 2008). Bertrand et al. (2008) zeigten in ihren in-vitro-Versuchen explizit, dass die Auto-Ubiquitylierung durch SMs die cIAPs, aber nicht XIAP betreffen. In vergleichbaren Versuchen von Bhatti et al. (2017) mit DLBCL-Zelllinien zeigte sich nach BV-6-Behandlung ebenfalls eine starke cIAP-Degradation und lediglich eine leicht verminderte XIAP-Expression.

In den vorliegenden Ergebnissen konnten wir dies nachvollziehen. Der sichtbar stärkere Effekt liegt bei den SMs LCL161 und BV-6 also in der cIAP-Degradation. Es gilt zu hinterfragen, ob dies mit einer verminderten Wirkung der IAPs auf zellulärer Ebene gleichzusetzen ist.

## **5.2 Einfluss der niedermolekularen Struktur der SMs auf die Effektstärke**

Bei diesen ersten Versuchen der Viabilität und des Zellwachstums nach Behandlung fiel auf, dass BV-6 potenter zu sein schien als LCL161. Ein möglicher Grund dafür ist, dass BV-6 im Gegensatz zu LCL161 ein bivalentes Smac Mimetikum darstellt. Bivalent heißt, dass der gleiche Wirkstoff über eine chemische Bindung erneut gebunden ist; er wurde dimerisiert (Fulda & Vucic, 2012; L. Li et al., 2004). In einem Review von Ndubaku & Cohen aus dem Jahr 2009 wurde diese in verschiedensten Versuchen nachgewiesene, deutlich höhere Effektivität der bivalenten gegenüber den monovalenten SM diskutiert. In Experimenten von Varfolomeev et al. (2007), mit BV-6 als bivalentem Wirkstoff im Vergleich mit seiner monovalenten Form MV-1, waren deren Bindungsaffinitäten für die BIR3-Domäne von XIAP und cIAPs ähnlich, jedoch hatte BV-6 eine höhere Affinität für die BIR2-Domäne von XIAP. Beide Wirkstoffe führten zur Auto-Ubiquitylierung und proteosomalen Degradation der cIAPs. BV-6 zeigte sich jedoch als deutlich potenterer Wirkstoff in den Viabilitätsas-



says (Varfolomeev et al., 2007). Die höhere Potenz wird damit erklärt, dass der bivalente Wirkstoff mehrere BIR-Domänen von XIAP gleichzeitig binden kann und so nicht nur die Caspase-9-, sondern auch die Caspase-3- und -7-Aktivität erhöhen kann (Gao et al., 2007; L. Li et al., 2004). Die bessere Wirksamkeit durch BV-6 zeigte sich auch in den dargestellten Versuchen. Sowohl in den Viabilitätsassays als auch in Zellzahlversuchen war die Behandlung mit BV-6 vor allem in den DLBCL-Zelllinien deutlich potenter. BV-6 war LCL161 somit überlegen. Die erniedrigte Viabilität korreliert mit der deutlich verminderten cIAP2-Expression nach BV-6-Behandlung im Vergleich zu LCL161. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass BV-6 möglicherweise der klinisch sinnvollere Wirkstoff ist, da bereits niedrigere Konzentrationen wirksam sind und dadurch eine niedrigere Rate an unerwünschten Nebenwirkungen hervorgerufen werden könnte.

### 5.3 Wirkmechanismen der SMs in Lymphomzelllinien

In den Zytotoxizitätsversuchen bestätigte sich ein gutes Ansprechen des ABC-Subtyps. Y. Yang et al. (2016) hatten dies bereits in in-vitro-Versuchen mit dem Smac Mimetic Birinapant gezeigt und diese Effekte konnten mit den untersuchten SMs LCL161 und BV-6 im Rahmen der hier vorliegenden Studie repliziert werden. Die Forschungsgruppe führte das gute Ansprechen auf die chronische BZR-Aktivierung und die konstitutive Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs des Subtyps zurück (Davis et al., 2010; Eric Davis et al., 2001). Im Verlauf stellten Y. Yang et al. (2016) zudem anhand ihrer Versuche die Hypothese auf, dass die cIAPs 1 und 2 Teil des CBM-Komplexes sind, ihn aktivieren und so den NF- $\kappa$ B-Signalweg im Rahmen der BZR-Aktivierung in Gang setzen (s. **Abb. 1**). Aus diesem Grund wurde argumentiert, dass der ABC-Subtyp eine sehr gute Angriffsfläche für Smac Mimetics bietet, die über die apoptotischen Mechanismen hinausgeht.

In dem genannten Paper sprachen jedoch keine der GCB-Subtyp-Zellen an (Y. Yang et al., 2016). In den vorliegenden Untersuchungen konnte das mangelnde Ansprechen des GCB-Subtyps nicht bestätigt werden. Obwohl Ula als GCB-Subtyp sich resistenter zeigte, kam es auch in diesen Zelllinien (Ht, Su\_DHL-5 und Ula) zum Zelluntergang nach Behandlung mit den SMs. Hier ist denkbar, dass die XIAP-Inhibition und die darauffolgende Caspasenaktivierung durch die SMs eine zentrale

Rolle einnahm, da XIAP in 55 % der DLBCLs überexprimiert ist (Hussain et al., 2010).

Ein ähnlicher Mechanismus wie im ABC-Subtyp könnte in den MCL-Zelllinien zum Zelluntergang mit beigetragen haben, da auch sie vom CBM-Komplex und der konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivierung abhängen (Rahal et al., 2014; Y. Yang et al., 2016). Folglich ist die weitere Untersuchung der Behandlung mit SMs all dieser Lymphomtypen sinnvoll.

#### **5.4 Resistenzmechanismen der Zelllinien Rec-1 und Ula**

Die Zelllinien Rec-1 (MCL) und Ula (DLBCL) zeigten beide ein geringes Ansprechen auf die Behandlung mit den SMs. Insbesondere fiel eine Resistenz gegen BV-6 auf, passend zu den Ergebnissen im Western Blot, die eine verminderte cIAP2-Degradation zeigten.

Die DLBCL-Zelllinie Ula stammt aus einem therapieresistenten GCB-Subtyp (Berglund et al., 2007). Nach chromosomaler Charakterisierung und FISH-Analyse ergab sich in den Untersuchungen ein sogenanntes „Triple-Hit-Lymphom“ (THL). Dies beinhaltet Translokationen im Bereich von MYC, BCL-2 und BCL-6 (Drexler, Eberth, Nagel, & MacLeod, 2016). Fraglich ist, ob eine der Mutationen für die Resistenz von Ula gegen BV-6 verantwortlich ist. Unter Inhibition von BCL-2 war sogar in Kombination mit BV-6 eine signifikante Steigerung des Zelltods möglich. Für Rec-1 ist keine außer der für MCL typischen t(11;14)-Translokation beschrieben (DSMZ, 2022). Das Lymphom, aus dem die Zelllinie Rec-1 ursprünglich stammt, galt als therapierefraktär.

#### **5.5 SMs-induzierter Zelltod ist Apoptose-vermittelt**

Mittels Annexin-Färbung wurde die Art des Zelltods durch die SMs ermittelt. Vor allem durch BV-6 ließ sich eine signifikante Erhöhung des apoptotischen Zelltods in MCL-Zelllinien (Maver-1 und Mino) sowie in den DLBCL-Zelllinien (Hbl-1, Ht, U2932, Su-DHL-5) zeigen. In beiden ABC-Subtypen (Hbl-1 und U2932) und GCB-Subtypen (Ht, Su-DHL-5) sah man einen Anstieg der Apoptose. Es sollte mittels verschiedener Methoden genauer eruiert werden, wie die Apoptose vermittelt wird.

So unterzogen wir die Zellen einer Vorbehandlung mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk und dem RIP-Inhibitor Necrostatin. Hiermit sollte untersucht werden, ob der Zelltod Caspasen-vermittelt erzielt wird oder durch Nekroptose ausgelöst wird. Die Vermeidung des Zelltods durch zVAD-fmk schien bei ABC-Subtyp Hbl-1 erfolgreich. Hbl-1 sprach sehr gut auf die Therapie mit BV-6 an und hatte einen höheren Zelltod als andere Zelllinien. Zum Vergleich schien ab einer BV-6-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auch bei Mino eine zVAD-fmk-vermittelte Rettung des Zelltods einzutreten. Eventuell war der Smac-vermittelte Zelltod in manchen Zellen zu niedrig, sodass eine Rettung nicht sichtbar wurde, obwohl sie stattfand. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass in anderen Versuchen mit SMs und zVAD-fmk bedingter Zellrettung teilweise höhere Dosen der Wirkstoffe genutzt wurden (Bhatti et al., 2017; Varfolomeev et al., 2007), andere Krebszelllinien gerettet wurden (Schirmer et al., 2016; Varfolomeev et al., 2007) oder DLBCL-Zelllinien nur nach Kombinationstherapie von SMs mit einem Proteasom-Inhibitor vor dem Zelltod gerettet werden konnten (Bhatti et al., 2017). Es konnten jedoch Zellen durch zVAD-fmk vor dem Zelltod gerettet werden, was in diesen Zelllinien auf einen Caspase-vermittelten Zelltod schließen lässt.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum der RIP1-Inhibitor in Hbl-1 zu einem höheren Zelltod nach Behandlung führte. Die Nekroptose ist eine regulierte Form des Zelltods, die Caspase-unabhängig verläuft. Im Rahmen der TNFR1-vermittelten Aktivierung kommt es bei Caspase-8-Inhibition zur Phosphorylierung von RIP1 und 3. Diese setzen eine Vielzahl von Mechanismen in Gang, die zur regulierten Nekrose oder sogenannten „Nekroptose“ einer Zelle führen (Vandenabeele, Galluzzi, Vanden Berghe, & Kroemer, 2010). Es ist bekannt, dass RIP1 für die Signaltransduktion von TNF- $\alpha$  zur NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung essenziell ist. RIP1 wird durch die cIAPs ubiquitinyliert, um weitere Enzyme zu aktivieren und zu rekrutieren (s. **Abb. 4**; Bertrand et al., 2008; Mahoney et al., 2008; Varfolomeev et al., 2008). Durch Smac Mimetics werden die cIAPs bekanntermaßen auto-ubiquitinyliert und degradiert, sodass der extrinsische Signalweg der Apoptose Caspase-8-vermittelt eingeleitet wird (Bertrand et al., 2008; L. Wang et al., 2008). Bereits im 20. Jahrhundert wurde im Mausmodell festgestellt, dass in lymphoiden Geweben von RIP-defizienten Mäusen vermehrt Apoptose induziert wird und keine NF- $\kappa\text{B}$ -Signalvermittlung mehr stattfindet (Kelliher et al., 1998). Weiterhin gibt es indirekte RIP1-Inhibitoren, die in-vitro-Apoptose induzierten und die Expression des NF- $\kappa\text{B}$ -Signalwegs verminderten

(Vanden Berghe, Kalai, Van Loo, Declercq, & Vandenabeele, 2003). Nec-1 soll hingegen ein spezifischer RIP1-Inhibitor sein, der die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs unbeeinflusst lässt (Degterev et al., 2008). Nichtsdestotrotz sollte hier an eine Nec-1-vermittelte Synergie mit Smac Mimetics gedacht werden.

In Zukunft sollte ermittelt werden, ob Nec-1 eventuell synergistisch mit Smac Mimetics Zelltod in diesen Zelllinien induziert und der NF- $\kappa$ B-Signalweg vermehrt inhibiert wird. Weiterhin sollte eine Zelltodrettung mit TNF- $\alpha$ -Inhibitor Etanercept experimentell durchgeführt werden, um die Hypothese zu testen, dass der durch Smac Mimetics ausgelöste Zelltod TNF- $\alpha$ -vermittelt ausgelöst wird.

Um die Zelltodmechanismen noch genauer zu analysieren, erfolgten Western Blots, die die Caspasen- und die daraufhin folgende PARP-Spaltung darstellten. In allen Zelllinien war eine vermehrte PARP-Spaltung nach Smac Mimetic-Behandlung dargestellt. Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase ist normalerweise für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich. Im Rahmen der Caspasenaktivierung kommt es zur Spaltung und Inaktivierung von PARP (Kaufmann et al., 1993; Soldani & Scovassi, 2002). PARP wurde in anderen Versuchen in sensitiven Leukämie-Zelllinien gespalten und in BV-6-resistenten Zellen nicht (Schirmer et al., 2016), was sich mit den Ergebnissen der verminderten PARP-Aktivierung von Rec-1 und Ula im Rahmen der hier vorliegenden Studie deckt. Die Spaltung der Caspasen war in Mino, Hbl-1 und U2932 deutlicher erkennbar als in anderen Zelllinien, was mit ihrem guten Ansprechen auf die SMs korreliert. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse scheint am ehesten eine Caspasen-vermittelte Zelltodinduktion stattzufinden.

## **5.6 Induktion des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs und gleichzeitige Hemmung der cIAPs führt zu Zelltod**

Um mögliche andere Angriffspunkte der Smac Mimetics in den Lymphom-Zelllinien zu untersuchen, erfolgten Western-Blot-Analysen auf p65 (RelA) und p100/p52. RelA ist einer der beiden Transkriptionsfaktoren, die im Rahmen der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung aktiviert werden. Die Expression von p65 veränderte sich nach SM-Behandlung nicht. Dies impliziert jedoch nicht notwendigerweise, dass der klassische Weg nicht inhibiert wird. RelA kann in diesem Fall immer noch exprimiert werden und im inhibitorischen Komplex gebunden vorliegen. Die Schlussfolgerung im Rahmen der Untersuchungen war jedoch, dass der Einfluss auf den klassischen Signalweg und damit auch auf den BZR-Signalweg nicht klar nachvollzogen werden

konnte. Weitere Untersuchungen des klassischen Signalwegs in Lymphomzellen sind daher notwendig.

Die Aktivierung des nicht kanonischen Signalwegs wurde im Western Blot mittels p52-Expression dargestellt. In den Western-Blot-Analysen ist deutlich erkennbar, dass die SM-Behandlung zur erhöhten Expression der aktiven p52-Untereinheit führte und somit die Vermutung nahelegt, dass der nicht kanonische Signalweg induziert wird, was sich mit der Annahme deckt, dass cIAPs den nicht kanonischen Signalweg inhibieren (Varfolomeev et al., 2008; Vince et al., 2007). Die Hypothese ist nun, dass die Aktivierung des alternativen Signalwegs wiederum zur Transkription von TNF- $\alpha$  führt. Durch die Bindung des Liganden TNF- $\alpha$  am kommt es bei gleichzeitiger Hemmung der cIAPs zur Einleitung der extrinsischen Apoptose. Die Zellen könnten so ausgelöscht werden. Die TNF- $\alpha$ -Expression nachzuvollziehen wäre hier noch ein wichtiger Schritt.

In den Untersuchungen von Y. Yang et al. (2016) fanden diese ebenfalls eine Aktivierung des nicht kanonischen Signalwegs für DLBCL-Zelllinien vom ABC-Subtyp nach Behandlung mit Birinapant. Sie kombinierten anschließend jedoch das Smac Mimetic mit einem NIK-Inhibitor und konnten die Zelltoxizität noch erhöhen (Y. Yang et al., 2016). Prospektiv wäre es sinnvoll, die Synergie von SMs und NIK-Inhibitoren in MCL- sowie DLBCL-Zelllinien nachzuvollziehen.

## **5.7 Kombinationstherapien zeigen Effektivität**

### **5.7.1 SMs und Ibrutinib-vermittelter Zelltod unterscheidet sich zwischen MCL und ABC-DLBCL**

Da Ibrutinib sich vor allem für das Mantelzelllymphom als wertvolles Therapeutikum entwickelt hat (Dreyling et al., 2016) und im Studiensetting auch für die DLBCL-Therapie genutzt wird (W. H. Wilson et al., 2015), wurde die Kombinationstherapie von Smac Mimetics für alle Zelllinien getestet. Es galt, mögliche Synergien in der Inhibition des BZR-Signalwegs und in der Induktion des Zelltods zu erfassen. Mittels Ermittlung des CI ließen sich Synergien für die beiden MCL-Zelllinien Maver-1 und Mino nachweisen.

Bereits durch Yang et al. (2016) wurde dargestellt, dass Ibrutinib und Smac Mimetics als Kombination für den ABC-Subtyp nicht synergistisch reagieren. Die Hypo-

these der Autoren Y. Yang et al. (2016) war, dass die Angriffsstellen der beiden Therapeutika zu ähnlich seien. Dabei implizieren Y. Yang et al. (2016), dass die cIAPs am CBM-Komplex beteiligt sind, der den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert und der BTK-Inhibitor Ibrutinib auch auf die indirekte Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs abzielt. Jedoch wirft dies die Frage auf, warum die SMs in Kombination mit Ibrutinib in MCL-Zelllinien synergistisch wirkten, da hier auch der NF- $\kappa$ B-Signalweg im BZR als Pathomechanismus gilt (Rahal et al., 2014; Saba et al., 2016). Die Rolle der IAPs in der Apoptoseinduktion von Zellen sollte hier vermehrt Beachtung finden. Zielführend wären weitere Western-Blot-Analysen sowie Aktivitätsassays, um den Wirkmechanismus besser nachzuvollziehen.

### **5.7.2 Venetoclax und SMs zeigen sich in BCL-2-mutierten Zelllinien als besonders effektiv**

Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax konnte sich in Kombinationen mit beiden Smac Mimetics für die DLBCL-Zelllinien bewähren, wobei Ula am meisten profitierte. Besonders eindrücklich zeigte sich hier erstmalig ein erhöhter Zelltod in der Kombinationsbehandlung mit BV-6 in der resistenten Zelllinie Ula. Der Grund, warum die DLBCL-Zelllinien U2932 und Ula so stark profitierten, liegt vermutlich in der Inhibition von BCL-2, da in beiden Zelllinien eine BCL-2 Mutation beschrieben ist. Eine konstitutive Aktivierung des anti-apoptotischen BCL-2 Proteins trägt zum Überleben der Zelle und zu ausgeprägten Resistenzen gegenüber den Auslösern der Apoptose bei (Klanova & Klener, 2020). Die MCL-Zelllinie Mino reagierte ebenfalls synergistisch für BV-6.

Da die IAPs im apoptotischen Prozess „stromabwärts“ von BCL-2 aktiv werden, scheint sich die Inhibition von BCL-2 zusätzlich positiv auf den Zelltod auszuwirken (s. **Abb. 14 A**).

Die Zunahme der Apoptose stellte sich auch im Western Blot dar. Auffällig war die starke PARP-Spaltung, die in Kombination der Einzeldosen nochmal zunahm und den erhöhten Wirkmechanismus der Kombination verdeutlichte.

### **5.7.3 Smac Mimetics sensitivieren für Chemotherapeutika**

Da bereits bei soliden Krebsarten, aber auch bei hämatologischen Neoplasien in vitro eine Sensibilisierung für Chemotherapie durch die Behandlung mit Smac Mimetics beschrieben worden war, sollte dieser Effekt auch für die Lymphomzelllinien

getestet werden (Fulda, 2015; Löder et al., 2012; Probst et al., 2010; Weisberg et al., 2007).

Im Rahmen der Kombination der Chemotherapeutika mit LCL161 gelang für die resistenten Zelllinien Rec-1 und Ula ein signifikanter Anstieg des Zelltods im Vergleich zu den Einzeldosen. Die Kombination mit Cytarabin in beiden Smac Mimetics war besonders potent.

Dies deckt sich mit Versuchen von Löder et al. (2012), die Leukämiezelllinien in Kombination mit verschiedensten Chemotherapeutika, darunter Doxorubicin und Cytarabin testeten. Die Autoren konnten dies, u. a. durch Gen-Knockdown-Versuche von RIP1, auf die durch IAP-vermittelte extrinsische Apoptose zurückführen. Auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg wurde in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Perspektivisch wirkt die Kombination von Smac Mimetics mit Chemotherapeutika wie eine besonders interessante Therapieoption zur Senkung der notwendigen Dosis und der damit verbundenen Rate an unerwünschten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, aber auch Kardiotoxizität.

## 5.8 Ausblick

Zusammengenommen haben Smac Mimetics einen zytotoxischen Effekt in MCL- und DLBCL-Zelllinien. Sie induzieren direkt Apoptose, nehmen aber auch Einfluss auf andere Signalwege wie NF- $\kappa$ B. Die Kombination von BV-6 mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib, der den BCR-Signalweg inhibiert, erbrachte in MCL-Zelllinien synergistische Ergebnisse. Der BCL-2-Inhibitor Venetoclax mit Smac Mimetics induzierte sogar in resistenten Zelllinien den Zelltod durch das Ansetzen am gleichen Signalweg. Smac Mimetics führten außerdem zu einem signifikanten Anstieg des spezifischen Zelltods durch Chemotherapeutika.

Als Schlussfolgerung ergibt sich daraus, dass Smac Mimetics auf Zelltodmechanismen abzielen, die durch die bisherige Therapie nicht abgedeckt werden und die weitere Erforschung von SMs in der Mantelzelllymphom-Therapie und der Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom-Therapie weitere zielführende Erkenntnisse bringen kann.

Limitationen der Forschungsarbeit ergeben sich zum einen aus der Vielzahl an verschiedenen Zelllinien, die dennoch das Erkrankungsbild des lebenden Patienten beziehungsweise der lebenden Patientin nicht in seiner Vollständigkeit abbilden.

Sinnvoll wäre es die Smac Mimetics beispielsweise am Mausmodell weiter zu testen, um weitere Rückschlüsse auf Dosis und Wirkung ziehen zu können. Weiterhin wurden viele verschiedene Aspekte der Wirkmechanismen der Smac Mimetics in den Zelllinien erwähnt, wobei eine vertiefte Darstellung sowohl des Mechanismus im apoptotischen Zelltod, im NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs fehlt. Dies wäre beispielsweise anhand der weiteren Darstellung der verschiedenen Signalmoleküle mittels Western Blot möglich. Insgesamt gibt die Arbeit einen zunächst superfiziellen Einblick auf das Potenzial der Smac Mimetics in der Lymphomtherapie ohne dieses in seiner Vollständigkeit abzubilden. Nichtsdestotrotz zeigen sich aus den Ergebnissen einige interessante Aspekte, die die weitere Erforschung der Smac Mimetics im Bereich der Lymphomtherapie stützen.

Aspekte, die in Zukunft noch weiter erforscht werden könnten und sollten:

1. Einfluss der Smac Mimetics im BZR-Signalwegs: Weitere Untersuchungen des CBM-Komplexes und der Assoziation mit den clAPs zur Aktivierung des BZR-Signalwegs, insbesondere im MCL, wo bis heute kaum kurativ therapiert wird.
2. Einfluss der Smac Mimetics in der Apoptoseinduktion beim GCB-Subtyp, wo angenommen werden muss, dass andere Mechanismen eine wichtigere Rolle in der Apoptoseinduktion spielen als beim MCL und ABC-Subtyp.
3. Ermittlung des Sensibilisierungseffekt von Smac Mimetics auf Chemotherapeutika in primären Lymphom-Zellen und klinischen Studien.



## 6 Zusammenfassung

Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAPs) sind physiologische Inhibitoren des programmierten Zelltods (Crook et al., 1993). In Karzinomen sind sie häufig überexprimiert und tragen so zu einer schlechteren Prognose bei (Fulda, 2009; Hussain et al., 2010; Mohamed et al., 2017). Es wird angenommen, dass sie außerdem eine Rolle im B-Zell-Rezeptor-Signalweg spielen, welcher zur malignen Transformation in Lymphomen beiträgt (Y. Yang et al., 2016). XIAP ist ein direkter Inhibitor der Caspasen 3, 7 und 9 und beeinflusst so die Apoptose (Eckelman et al., 2006). Die cIAPs sind Regulatoren des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, welcher für verschiedene Apoptose-Modulatoren transkribiert (Fulda & Vucic, 2012). IAPs werden durch Second Mitochondria-derived Activators of Caspase (Smac) gehemmt (Du et al., 2000). Die Smac Mimetics LCL161 und BV-6 sind duale Inhibitoren der cIAPs und XIAP (Weisberg et al., 2010; Li W. et al. 2011). In dieser Arbeit wurden die Effekte der Smac Mimetics (LCL161 und BV-6) an Mantelzell- sowie Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom-Zelllinien untersucht.

MCL- (Maver-1, Mino und Rec-1) und DLBCL-Zelllinien (Hbl-1, U2932, Ht, Su-DHL-5 und Ula) wurden sowohl mit den Smac Mimetics einzeln als auch in Kombinationen mit Ibrutinib, Venetoclax sowie den Chemotherapeutika Cytarabin und Doxorubicin behandelt. Die Zellproliferation und Apoptose wurden mittels Trypanblau- bzw. Annexin-Färbung analysiert. Die Zelllinien wurde zudem mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk und dem RIP-1-Kinase-Inhibitor Nec-1 vorbehandelt, um Zelltodmechanismen weitergehend zu untersuchen. Die Proteinexpression von cIAP1 & 2, XIAP, p65, p100/p52, PARP-Spaltung und Caspasen 3, 8 und 9 wurde mittels Western Blot analysiert.

Die Behandlung mit Smac Mimetics zeigte für MCL- und DLBCL-Zelllinien einen zytotoxischen Effekt, wobei der ABC-Subtyp hierbei hervorstach. Die SMs induzierten IAP-Degradation, aktivierten den nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg und führten zur Caspasen- sowie PARP-Spaltung. Die Vorbehandlung mit zVAD-fmk rettete Zellen vor der Apoptose-Induktion, vor allem im ABC-Subtyp. Die Kombination der Smac Mimetics mit anderen Inhibitoren und Chemotherapeutika rief einen signifikanten Anstieg des Zelltods hervor.

Die Smac Mimetics zeigten in den Zelllinien vielversprechende, antitumorale Effekte, die durch die Kombination mit Chemotherapeutika noch gesteigert werden konnten. Perspektivisch sollten Smac Mimetics als zielgerichtete Therapie in der Lymphombehandlung weiter erforscht werden.

## Literaturverzeichnis

- Akyurek, N., Ren, Y., Rassidakis, G. Z., Schlette, E. J., & Medeiros, L. J. (2006). Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *Cancer*, *107*(8), 1844–1851. <https://doi.org/10.1002/cncr.22219>
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, *403*(6769), 503-11. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Armitage, J. O. (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, *89*(11), 3909–3918. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.11.3909>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, *281*(5381), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Baeuerle, P. A., & Baltimore, D. (1988). I $\kappa$ B: A specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Science*, *242*(4878), 540–546. <https://doi.org/10.1126/science.3140380>
- Baeuerle PA, Henkel T (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* *12*, 141-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001041>
- Barth, T. F. E., Leithäuser, F., Joos, S., Bentz, M., & Möller, P. (2002). Review Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma : where do we stand ? Clinical presentation of MBL. *The Lancet*, *3*(April), 229–234.
- Baud, V., Karin, M., & Karin, M. (2001). Signal transduction by TNF and its relatives. *Trends in Cell Biology*, *11*(9), 372–377.
- Berglund, M., Thunberg, U., Fridberg, M., Wingren, A. G., Gullbo, J., Leuchowius, K. J., ... Söderberg, O. (2007). Establishment of a cell line from a chemotherapy resistant diffuse large B-cell lymphoma [8]. *Leukemia and Lymphoma*, *48*(5), 1038–1041. <https://doi.org/10.1080/10428190701230866>
- Bertrand, M. J. M., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., ... Barker, P. A. (2008). cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. *Molecular Cell*, *30*(6), 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.014>

- Bhatti, I. A., Abhari, B. A., & Fulda, S. (2017). Identification of a synergistic combination of Smac mimetic and Bortezomib to trigger cell death in B-cell non-Hodgkin lymphoma cells. *Cancer Letters*, *405*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.008>
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology*, *68*(4), 2521–2528. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.4.2521-2528.1994>
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., & Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, *85*(6), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81265-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81265-9)
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., & Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, *406*(6798), 855–862. <https://doi.org/10.1038/35022514>
- Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Daley, J., Chen, W., Witzig, T. E., ... Shipp, M. A. (2008). SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *111*(4), 2230–2237. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100115>
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, *81*(4), 505–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90071-3)
- Choi, Y. E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C. S., Cohen, G. M., & Bratton, S. B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(19), 12772–12782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807550200>
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, *22*(C), 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., & Ballard, D. W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- $\kappa$ B control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(19), 10057–10062. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10057>

- Coiffier, B., Lepage, E., Brière, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., ... Gisselbrecht, C. (2002). CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, *346*(4), 235–242.  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa011795>
- Col, J. D., Zancai, P., Terrin, L., Guidoboni, M., Ponzoni, M., Pavan, A., ... Dolcetti, R. (2008). Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*, *111*(10), 5142–5151.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103481>
- Cortelazzo, S., Ponzoni, M., Ferreri, A. J. M., & Dreyling, M. (2020). Mantle cell lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *153*(July), 103038.  
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103038>
- Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology*, *67*(4), 2168–2174.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.2168-2174.1993>
- Dameshek, W., & Schwartz, R. S. (1959). Leukemia and Autoimmunization - some possible relations. *Blood*, 1151–1158.
- Davids, M. S., & Letai, A. (2013). ABT-199: A New Hope for Selective BCL-2 Inhibition. *Cancer Cell*, *23*(1878-3686 (Electronic)), 139–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.018.ABT-199>
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R., Romesser, P. B., ... Staudt, L. M. (2010). Chronic Active B Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Nature*, *463*(7277), 88–92.  
<https://doi.org/10.1038/nature08638.Chronic>
- Deane JA, Fruman DA (2004). Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol*. *22*, 563-98.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104721>
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I., Korkina, O., Teng, X., ... Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, *4*, 313–321.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.83.Identification>
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., ... Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *144*(5), 891–901.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.144.5.891>
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Ht, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-567> [Abruf: 2022-05-25]

- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Maver-1, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-717> [Abruf: 2022-05-25]
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Mino, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-687> [Abruf: 2022-05-25]
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Rec-1, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-584> [Abruf: 2022-05-25]
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. SU-DHL-5, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-571> [Abruf: 2022-05-25]
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. U-2932, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-633> [Abruf: 2022-05-25]
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. ULA, online unter URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-627> [Abruf: 2022-05-25]
- Deveraux, Q. L., & Reed, J. C. (1999). IAP family proteins - Suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, 13(3), 239–252. <https://doi.org/10.1101/gad.13.3.239>
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., ... Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal*, 17(8), 2215–2223. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2215>
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(6639), 300–304. <https://doi.org/10.1038/40901>
- Drexler, H. G., Eberth, S., Nagel, S., & MacLeod, R. A. F. (2016). Malignant hematopoietic cell lines: *in vitro* models for double-hit B-cell lymphomas. *Leukemia & Lymphoma*, 57(5), 1015–1020. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1108414>
- Dreyling, M., Buske, C., Cairoli, A., Heß, G., Mey, U. J. M., Pott, C., Raderer, M. (2021). Onkopedia: Mantelzell-Lymphom, online unter URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@@guideline/html/index.html> [Abruf: 2022-05-25]
- Dreyling, M., Schnaiter, A., Schmidt, C., & Hoster, E. (2016). Aktuelle Therapiestrategien beim Mantelzelllymphom. *Internist*, 57(3), 230–237. <https://doi.org/10.1007/s00108-016-0017-y>

- Dreyling, Martin, Jurczak, W., Jerkeman, M., Silva, R. S., Rusconi, C., Trneny, M., ... Rule, S. (2016). Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: An international, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*, 387(10020), 770–778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00667-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00667-4)
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)
- Dueber EC, Schoeffler AJ, Lingel A, Elliott JM, Fedorova AV, Giannetti AM, Zobel K, Maurer B, Varfolomeev E, Wu P, Wallweber HJ, Hymowitz SG, Deshayes K, Vucic D, Fairbrother WJ (2011). Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science*, 334(6054), 376-80. <https://doi.org/10.1126/science.1207862>
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*, 7(10), 988–994. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400795>
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Eric Davis, R., Brown, K. D., Siebenlist, U., & Staudt, L. M. (2001). Constitutive nuclear factor  $\kappa$ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *Journal of Experimental Medicine*, 194(12), 1861–1874. <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861>
- Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P. D., Shirley, S., Condon, S. M., ... Day, C. L. (2011). Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17015–17028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222919>
- Flaswinkel H, Reth M (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J*, 13(1), 83-9. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06237.x>
- Freedman AS, Jacobson CA, Mauch P, Aster JC . Non-Hodgkin lymphoma. DeVita VT Jr, Lawrence TS, & Rosenberg SA (2015). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 103:1552-1583
- Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124(3), 511–515. <https://doi.org/10.1002/ijc.24064>
- Fulda, S. (2014). Molecular pathways: targeting inhibitor of apoptosis proteins in cancer--from molecular mechanism to therapeutic application. *Clin Cancer Res*, 20(2), 289-95. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0227>

- Fulda, S. (2015). Promises and challenges of Smac mimetics as cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research*, 21(22).  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0365>
- Fulda, S., & Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(2), 109–124.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3627>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541.  
<https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, Z., Tian, Y., Wang, J., Yin, Q., Wu, H., Li, Y. M., & Jiang, X. (2007). A dimeric Smac/Diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP: Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30718–30727.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M705258200>
- Gilmore TD (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-4. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., ... Tsukada, S. (1999). Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK - Functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood*, 94(7), 2357–2364. [https://doi.org/10.1182/blood.v94.7.2357.419k40\\_2357\\_2364](https://doi.org/10.1182/blood.v94.7.2357.419k40_2357_2364)
- Hayden MS, Ghosh S (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 18(18), 2195-224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704.bone>
- Heinrich, P., Koch, HG., Brix, J. (2014). Apoptose – Der programmierte Zelltod. In: Heinrich, P., Müller, M., Graeve, L. (eds) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3\\_51](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_51)
- Herrmann, A., Hoster, E., Zwingers, T., Brittinger, G., Engelhard, M., Meusers, P., ... Dreyling, M. (2009). Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(4), 511–518.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.8435>
- Honigberg, L. A., Smith, A. M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., ... Buggy, J. J. (2010). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13075–13080.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1004594107>



- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., Hoof, A. Van, Kluijnleemans, H. C., ... Jung, W. (2008). A new prognostic index ( MIPI ) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma, *Blood*, 111(2), 558–565. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095331>.The
- Hozumi N, Tonegawa S (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(10), 3628-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3628>
- Hu, S., & Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10055–10060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207197200>
- Hussain, A. R., Uddin, S., Ahmed, M., Bu, R., Ahmed, S. O., Abubaker, J., ... Al-Kuraya, K. S. (2010). Prognostic significance of XIAP expression in DLBCL and effect of its inhibition on AKT signalling. *Journal of Pathology*, 222(2), 180–190. <https://doi.org/10.1002/path.2747>
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S. I., Sameshima, M., ... Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66(2), 233–243. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90614-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90614-5)
- Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., & Poirier, G. G. (1993). Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Research*, 53(17), 3976–3985.
- Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256(1), 42–49. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4838>
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., & Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- $\kappa$ B signal. *Immunity*, 8(3), 297–303. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80535-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80535-X)
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kist M, Vucic D (2021). Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J*, 40(5), e106700. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106700>
- Klanova, M., & Klener, P. (2020). BCL-2 proteins in pathogenesis and therapy of B-Cell non-hodgkin lymphomas. *Cancers*, 12(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers12040938>

- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., & Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igα/β heterodimer. *Cell*, *117*(6), 787–800.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.014>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Küppers R (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, *5*(4), 251–62. <https://doi.org/10.1038/nrc1589>
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M., & Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human b-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine*, *341*, 1520–1529.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M., & Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections, *12*(13), 4955–4967.
- Lam, K. P., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, *90*(6), 1073–1083. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80373-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80373-6)
- Lenz, G., Chapuy, B., Glaß, B., Keil, F., Klapper, W., Nickelsen, M., Urban, N., Schmidberger, H. (2021). Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom. Onkopedia, online unter URL:  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@@guideline/html/index.html> [Abruf: 2022-05-25]
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., Wright, G. W., ... Staudt, L. M. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, *319*(5870), 1676–1679.  
<https://doi.org/10.1126/science.1153629>
- Lenz, G., Wright, G. W., Emre, N. C. T., Kohlhammer, H., Dave, S. S., Davis, R. E., ... Staudt, L. M. (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13520–13525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804295105>
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, *94*(4), 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1)
- Li, L., Thomas, R. M., Suzuki, H., De Brabander, J. K., Wang, X., & Harran, P. G. (2004). A small molecule smac mimic potentiates TRAIL- and TNFα-mediated cell death. *Science*, *305*(5689), 1471–1474.  
<https://doi.org/10.1126/science.1098231>

- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, *412*(6842), 95–99. <https://doi.org/10.1038/35083620>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*(4), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Li W, Li B, Giacalone NJ, Torossian A, Sun Y, Niu K, Lin-Tsai O, Lu B. BV6, an IAP antagonist, activates apoptosis and enhances radiosensitization of non-small cell lung carcinoma in vitro. *J Thorac Oncol*, *6*(11), 1801-9. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318226b4a6>
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., ... Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, *408*(6815), 1004–1008. <https://doi.org/10.1038/35050006>
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R (1999). B-cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*, *190*(1), 75-89. <https://doi.org/10.1084/jem.190.1.75>
- Löder, S., Fakler, M., Schoeneberger, H., Cristofanon, S., Leibacher, J., Vanlangenakker, N., ... Fulda, S. (2012). RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization of childhood acute leukemia cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Leukemia*, *26*(5), 1020–1029. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.353>
- Löffert D, Schaal S, Ehlich A, Hardy RR, Zou YR, Müller W, Rajewsky K (1994). Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting. *Immunol Rev*, *137*, 135-53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1994.tb00662.x>
- Lopez, J., John, S. W., Tenev, T., Rautureau, G. J. P., Hinds, M. G., Francalanci, F., ... Meier, P. (2011). CARD-Mediated Autoinhibition of cIAP1's E3 Ligase Activity Suppresses Cell Proliferation and Migration. *Molecular Cell*, *42*(5), 569–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.008>
- Mace, P. D., Linke, K., Feltham, R., Schumacher, F. R., Smith, C. A., Vaux, D. L., ... Day, C. L. (2008). Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(46), 31633–31640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804753200>
- Mackay F, Browning JL (2002). BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol*, *2*(7), 465-75. <https://doi.org/10.1038/nri844>
- MacLennan IC (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, *12*, 117-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>

- Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Mrad, R. L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., ... Korneluk, R. G. (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11778–11783. Retrieved from [papers://72bca0fc-e332-48ef-8a9e-8743a2053742/Paper/p34](https://doi.org/10.1073/pnas.0709111105)
- Marcucci F, Mele A (2011). Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood*, 117(6), 1792-8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-275818>.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., & Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 83(3), 387–395. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90116-7)
- McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(10), 3180-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3180>
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Miller, L. K. (1999). An exegesis of IAPs: Salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology*, 9(8), 323–328. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01609-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01609-8)
- Mócsai, A., Ruland, J., & Tybulewicz, V. L. J. (2010). The SYK tyrosine kinase: A crucial player in diverse biological functions. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 387–402. <https://doi.org/10.1038/nri2765>
- Mohamed, A. J., Yu, L., Bäckesjö, C. M., Vargas, L., Faryal, R., Aints, A., ... Edvard Smith, C. I. (2009). Bruton's tyrosine kinase (Btk): Function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological Reviews*, 228(1), 58–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00741.x>
- Mohamed, M. S., Bishr, M. K., Almutairi, F. M., & Ali, A. G. (2017). Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, 22(12), 1487–1509. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1429-4>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. Neunte Auflage. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Muzio, M. (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 28, 141–147.

- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., ... Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, *85*(6), 817–827. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81266-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81266-0)
- Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics*, *33*, 29–55.
- Ndubaku, C., Cohen, F., Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2009, November). Targeting inhibitor of apoptosis proteins for therapeutic intervention. *Future Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.116>
- Nussenzweig A, Nussenzweig MC (2010). Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*, *141*(1), 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.016>
- Oellerich, T., Bremes, V., Neumann, K., Dittmann, K., Engelke, M., Schnyder, T., ... Urlaub, H. (2011). The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO J*, *30*(17), 3620–3634. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.251>
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., & Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, Adjacent Genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, *248*(D), 1517–1523.
- Pfreundschuh, M. (2016). Aktuelle Therapiestrategien beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom. *Internist*, *57*(3), 214–221. <https://doi.org/10.1007/s00108-015-0007-5>
- Phelan JD, Young RM, Webster DE, Roulland S, Wright GW, Kasbekar M, Shaffer AL 3rd, Ceribelli M, Wang JQ, Schmitz R, Nakagawa M, Bachy E, Huang DW, Ji Y, Chen L, Yang Y, Zhao H, Yu X, Xu W, Palisoc MM, Valadez RR, Davies-Hill T, Wilson WH, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Rodriguez FJ, Estephan F, Holdhoff M, Kruhlak MJ, Hewitt SM, Thomas CJ, Pittaluga S, Oellerich T, Staudt LM (2018). A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma. *Nature*, *560*(7718), 387-391. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0290-0.A>
- Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*, *41*(6-7), 599-613. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.008>
- Probst, B. L., Liu, L., Ramesh, V., Li, L., Sun, H., Minna, J. D., & Wang, L. (2010). Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- $\alpha$ -dependent manner. *Cell Death and Differentiation*, *17*(10), 1645–1654. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.44>

- Queirós AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, Raineri E, Russiñol N, Castellano G, Beà S, Navarro A, Kulis M, Verdaguier-Dot N, Jares P, Enjuanes A, Calasanz MJ, Bergmann A, Vater I, Salaverría I, van de Werken HJG, Wilson WH, Datta A, Flicek P, Royo R, Martens J, Giné E, Lopez-Guillermo A, Stunnenberg HG, Klapper W, Pott C, Heath S, Gut IG, Siebert R, Campo E, Martín-Subero JI (2016). Decoding the DNA Methyome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell*, 30(5), 806-821. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.014>
- Quinn ER, Chan CH, Hadlock KG, Fong SK, Flint M, Levy S (2001). The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood*, 98(13), 3745-9. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.13.3745>.
- Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J. M., Kridel, R., Chan, F. C., ... Stegmeier, F. (2014). Pharmacological and genomic profiling identifies NF- $\kappa$ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature Medicine*, 20(1), 87–92. <https://doi.org/10.1038/nm.3435>
- Rajewsky K (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585), 751-8. <https://doi.org/10.1038/381751a0>
- Ramakrishnan, V., Gomez, M., Prasad, V., Kimlinger, T., Painuly, U., Mukhopadhyay, B., ... Kumar, S. (2016). Smac mimetic LCL161 overcomes protective ER stress induced by obatoclox, synergistically causing cell death in multiple myeloma. *Oncotarget*, 7(35), 56253–56265. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11028>
- Reth M (1995). The B-cell antigen receptor complex and co-receptors. *Immunol Today*, 16(7), 310-3. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80141-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80141-3)
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405–413. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>
- Robert Koch Institut (2018). Krebs in Deutschland: Non-Hodgkin-Lymphome, 134-139, online unter URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c82\\_c85\\_non\\_hodgkin.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c82_c85_non_hodgkin.pdf?__blob=publicationFile) [Abruf: 2021-01-10]
- Robert Koch Institut (2018). Krebs in Deutschland: Ergebnisse nach ICD-10, 24, online unter URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c00\\_97\\_krebs\\_gesamt.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile) [Abruf: 2021-01-10]

- Rothe, M., Pan, M., Henzel, W. J., Ayres, T. M., & Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Cell*, *83*, 1243–1252.
- Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R., & Bolen, J. B. (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(19), 11590–11594. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11590>
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO Journal*, *16*(23), 6914–6925. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.6914>
- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T. H. T., Fend, F., Jaffe, E. S., ... Raffeld, M. (2006). Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, *108*(5), 1668–1676. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015586>
- Rui, L., Schmitz, R., Ceribelli, M., & Staudt, L. M. (2011). Malignant pirates of the immune system. *Nature Immunology*, *12*(10), 933–940. <https://doi.org/10.1038/ni.2094>
- Saba, N. S., Liu, D., Herman, S. E. M., Underbayev, C., Tian, X., Behrend, D., ... Wiestner, A. (2016). Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- $\kappa$ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*, *128*(1), 82–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681460>
- Saijo, K., Schmedt, C., Su, I., Karasuyama, H., Lowell, C. A., Reth, M., ... Tarakhovskiy, A. (2003). Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- $\kappa$ B activation during B cell development, *4*(3), 1–6. <https://doi.org/10.1038/ni893>
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, *391*(6662), 96–99. <https://doi.org/10.1038/34214>
- Salvesen GS, Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(6), 401-10. <https://doi.org/10.1038/nrm830>
- Sant, M., Minicozzi, P., Mounier, M., Anderson, L. A., Brenner, H., Holleccek, B., ... De Angelis, R. (2014). Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: Results of EURO CARE-5, a population-based study. *The Lancet Oncology*, *15*(9), 931–942. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70282-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70282-7)
- Scheidereit C (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*, *25* (51), 6685-705. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209934>

- Schieber M, Gordon LI, Karmali R (2018). Current overview and treatment of mantle cell lymphoma. *F1000Res*, 7, F1000 Faculty Rev-1136 <https://doi.org/10.12688/f1000research.14122.1>
- Schile, A. J., García-Fernández, M., & Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes and Development*, 22(16), 2256–2266. <https://doi.org/10.1101/gad.1663108>
- Schirmer, M., Trentin, L., Queudeville, M., Seyfried, F., Demir, S., Tausch, E., ... Meyer, L. H. (2016). Intrinsic and chemo-sensitizing activity of SMAC-mimetics on high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis*, 7(1), e2052-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.382>
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., ... Karin, M. (2001). Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, 293(5534), 1495–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>
- Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM (2002). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 920-32. <https://doi.org/10.1038/nri953>
- Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, Watarai H, Sakurai H, Kurosaki T (2005). PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med*, 202(10), 1423-31. <https://doi.org/10.1084/jem.20051591>
- Shu, H.-B., Takeuchi, M., & Goeddel, D. (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Immunology*, 93(November), 13973–13978.
- Smedby, K. E., Hjalgrim, H., Askling, J., Chang, E. T., Gregersen, H., Porwit-MacDonald, A., ... Adami, H. O. (2006). Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(1), 51–60. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj004>
- Soldani, C., & Scovassi, A. I. (2002). Poly ( ADP-ribose ) polymerase-1 cleavage during apoptosis : An update Cell death mechanisms : Necrosis and apoptosis. *Apoptosis*, 7(4), 321–328.
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., Depinho, R. A., ... Rajewsky, K. (2009). PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival. *Cell*, 139(3), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.041>



- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., ... Alnemri, E. S. (2001). Erratum: A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis (Nature (2001) 410 (112-116)). *Nature*, 411(6841), 1081. <https://doi.org/10.1038/35082622>
- Srinivasula, Srinivasa M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular Cell*, 1(7), 949–957. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80095-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80095-7)
- Stein, J. C., & Hansen, G. (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiology*, 121(1), 71–79. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.71>
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441–446. <https://doi.org/10.1038/17135>
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., & Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8662–8667. <https://doi.org/10.1073/pnas.161506698>
- Suzuki, Yasuyuki, Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell*, 8(3), 613–621. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00341-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00341-0)
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J. (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, *WHO classification of tumors, Revised 4<sup>th</sup> Edition, Volume 2*, 10-29, 285-298.
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993). A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 329(14), 987-94. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291402>
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 89(11), 3909-3918, ISSN 0006-4971, <https://doi.org/10.1182/blood.V89.11.3909>

- Thome, M. (2004). CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 348–359.  
<https://doi.org/10.1038/nri1352>
- Turner, L., Hartmann, S., Neumann, F., Hoth, M., Stilgenbauer, S., Küppers, R., ... Bewarder, M. (2020). Role of Specific B-Cell Receptor Antigens in Lymphomagenesis. *Frontiers in Oncology*, 10(December), 1–20.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.604685>
- Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*, 378(6554), 298-302. <https://doi.org/10.1038/378298a0>
- Valla K, Flowers CR, Koff JL (2019). Targeting the B cell receptor pathway in non-Hodgkin lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 27(6), 513-522.  
<https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1482273>
- Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P., Keats, J. J., Wang, H., ... Bergsagel, P. L. (2009). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nature Immunology*, 9(12), 1364–1370. <https://doi.org/10.1038/ni.1678>
- Vanden Berghe, T., Kalai, M., Van Loo, G., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2003). Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5622–5629.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M208925200>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700–714.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kayagaki, N., Garg, P., Vucic, D. (2007). IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-κB Activation, and TNFα-Dependent Apoptosis. *Cell*, 131(4), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Dynek, J. N., Zobel, K., Deshayes, K., ... Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor α (TNFα)-induced NF-κB activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24295–24299.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C800128200>
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2008, June 1). (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFκB signaling pathways. *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.  
<https://doi.org/10.4161/cc.7.11.5959>
- Vaux, D. L., & Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 287–297. <https://doi.org/10.1038/nrm1621>

- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., ... Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, *102*(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X)
- Victoria GD, Nussenzweig MC (2012). Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, *30*, 429-57. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- Victoria, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., & Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, *143*(4), 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>
- Vince, J. E., Wong, W. W. L., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., ... Silke, J. (2007). IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis. *Cell*, *131*(4), 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.037>
- Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., & Hong, W. K. (1993). The New England Journal of Medicine . No other uses without permission. Copyright © 1993 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *The New England Journal of Medicine*, *29*(328 (17)), 1230–1235.
- Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(7), 439–452. <https://doi.org/10.1038/nrm3143>
- Wang, C.-Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., & Baldwin, A. S. (1999). NF- $\kappa$ B Induces Expression of the Bcl-2 Homologue A1/Bfl-1 To Preferentially Suppress Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(9), 5923–5929. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.5923>
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., & Baldwin, A. S. (1998). NF- $\kappa$ B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, *281*(5383), 1680–1683. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680>
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell*, *133*(4), 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.036>
- Wang, M. L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B. S., ... Blum, K. A. (2013). Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, *369*(6), 507–516. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1306220>
- Watanabe, D., Hashimoto, S., Ishiai, M., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., ... Tsukada, S. (2001). Four Tyrosine Residues in Phospholipase C- $\gamma$ 2, Identified as Btk-dependent Phosphorylation Sites, Are Required for B Cell Antigen Receptor-coupled Calcium Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38595–38601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103675200>

- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., ... Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes and Development*, *14*(16), 2060–2071. <https://doi.org/10.1101/gad.14.16.2060>
- Weisberg, E., Kung, A. L., Wright, R. D., Moreno, D., Catley, L., Ray, A., ... Griffin, J. D. (2007). Potentiation of antileukemic therapies by Smac mimetic, LBW242: Effects on mutant FLT3-expressing cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, *6*(7), 1951–1961. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0810>
- Weisberg E, Ray A, Barrett R, Nelson E, Christie AL, Porter D, Straub C, Zawel L, Daley JF, Lazo-Kallanian S, Stone R, Galinsky I, Frank D, Kung AL, Griffin JD (2010). Smac mimetics: implications for enhancement of targeted therapies in leukemia. *Leukemia*, *24*(12), 2100-9. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.212>. Epub 2010 Sep 16. Erratum in: *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1221
- Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., ... Jaeger, U. (2001). Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: Implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Research*, *61*(4), 1629–1636.
- Wendtner, C., Dreger, P., Eichhorst, B., Gregor, M., Greil, R., Hallek, M., Knauf, W. U., Pritzkuweit, R., Schetelig, J., Staber, P.B., Wörmann, B., Zenz, T., Stilgenbauer, S. (2020). Onkopedia: Chronische Lymphatische Leukämie, online unter URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html> [Abruf: 2022-01-07]
- WHO, International Agency for Reaserch on Cancer (2020). Non-hodgkin Lymphoma fact sheet, 1-2, Globocan 2020, online unter URL: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/34-Non-hodgkin-lymphoma-fact-sheet.pdf> [Abruf: 2022-05-25]
- Wilson, N. S., Dixit, V., & Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology*, *10*(4), 348–355. <https://doi.org/10.1038/ni.1714>
- Wilson, W. H., Young, R. M., Schmitz, R., Yang, Y., Pittaluga, S., Wright, G., ... Staudt, L. M. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, *21*(8), 922–926. <https://doi.org/10.1038/nm.3884>
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., & Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, *408*(6815), 1008–1012. <https://doi.org/10.1038/35050012>

- Yan, M., Brady, J. R., Chan, B., Lee, W. P., Hsu, B., Harless, S., ... Dixit, V. M. (2001). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Current Biology*, 11(19), 1547–1552. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00481-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00481-X)
- Yang, Q. H., & Du, C. (2004). Smac/DIABLO Selectively Reduces the Levels of c-IAP1 and c-IAP2 but Not That of XIAP and Livin in HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16963–16970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401253200>
- Yang, X., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Molecular Cell*, 1(2), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80032-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80032-5)
- Yang, Y., Kelly, P., Shaffer, A. L., Schmitz, R., Yoo, H. M., Liu, X., ... Staudt, L. M. (2016). Targeting Non-proteolytic Protein Ubiquitination for the Treatment of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 29(4), 494–507. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.006>
- Young RM, Phelan JD, Wilson WH, Staudt LM (2019). Pathogenic B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies: New insights to improve treatment. *Immunol Rev*, 291(1), 190-213. <https://doi.org/10.1111/imr.12792>
- Young, R. M., & Staudt, L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(3), 229–243. <https://doi.org/10.1038/nrd3937>
- Yurasov, S., & Nussenzweig, M. C. (2007). Regulation of autoreactive antibodies. *Current Opinion in Rheumatology*, 19(5), 421–426. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328277ef3b>
- Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Herman, H., He, J., ... Network, H. (2009). Activation of noncanonical NF- $\kappa$ B requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2, TRAF3 and the kinase NIK. *Nature Immunology*, 9(12), 1371–1378. <https://doi.org/10.1038/ni.1676.Activation>
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-13. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80501-2)

## Danksagung

Vielen Dank an meinen Doktorvater und Betreuer, Herrn Professor Dr. Dreyling, der mir diese spannende Doktorarbeit überhaupt erst ermöglichte, mir in Fragen und Problematiken half und mich stets bei Vorhaben – innerhalb sowie außerhalb der Promotion – unterstützte.

Zudem danke ich Andrea Mayer und Elisabeth Silkenstedt, die mich bei dieser Arbeit betreuten, sich mit meinen Ergebnissen auseinandersetzten und mich mit ihrer Expertise anleiteten.

Ich danke Yvonne Zimmermann für all die Hilfe bei technischen Fragen und für den ständigen Nachschub an Nervennahrung, den sie bereitstellte.

Außerdem danke ich allen meinen KollegInnen im Labor, die diese Zeit nicht nur intellektuell, sondern auch emotional durch ihre Anwesenheit für mich bereicherten.

Insbesondere gilt mein Dank der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, die mich im Rahmen des Sieglinde-Welker-Stipendiums in meinem Forschungsvorhaben förderte.

Außerdem danke ich David Roser, der mich durch die Höhen und Tiefen des Verfassens dieser Doktorarbeit begleitete.

Ich danke meinen Eltern, Marion und Michael Hoffmann, sowie meinen Großeltern, Herrmann und Irmgard Schaffner und Regina und Michael Hoffmann, die mich das gesamte Medizinstudium über unterstützt haben und immer an mich glaubten.

## Lebenslauf

### Victoria Leonie Christine Hoffmann

#### Beruf:

02/21 – heute: Assistenzärztin der Frauenklinik  
Universitätsklinikum Augsburg

#### Bildung:

Dezember 2020: Abschluss des Studiums der Humanmedizin  
Note: 1,66  
3. Abschnitt der ärztl. Prüfung  
Note: 1,0

Oktober 2019: 2. Abschnitt der ärztl. Prüfung  
Note: 2,0

September 2015: 1. Abschnitt der ärztl. Prüfung  
Note 2,0

Oktober 2013: Beginn des Studiums der Humanmedizin  
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

Juni 2013: Abitur  
Karl-Theodor-von-Dalberg-Gymnasium, Aschaffenburg  
Note: 1,4

August 2010 – Juni 2011: Keith Country Day School, Rockford, Illinois, USA

#### Promotion:

April 2017: Beginn der experimentellen Doktorarbeit  
AG Dreyling, Klinikum Großhadern  
LMU München

September 2017 – 2018 **Stipendiatin der Sieglinde-Welker-Stiftung** der  
Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

#### Kongresse:

Oktober 2018: **Posterpräsentation**, DGHO Jahrestagung 2018,  
Wien, Österreich

Juli 2018: **Posterpräsentation**, 20. Wissenschaftliches Sympo-  
sium der Med. Klinik 3, Klinikum Großhadern, LMU  
München, Herrsching

Oktober 2017: **Posterpräsentation**, DGHO Jahrestagung 2017,  
Stuttgart

#### Praktisches Jahr:

November 2019 – Oktober 2020: Universitätsklinikum Augsburg  
New York Presbyterian Hospital, NY, USA  
Wahlfach: Gynäkologie