

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**

**Klinik für Kinder- und Jugendmedizin**

**- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -**

**- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens -**

**Untersuchung zur in-vitro-Toxizität eines Inhibitors  
der Aurorakinase A/B, von Vincristin und Paclitaxel an  
einem Panel von 18 ausgewählten pädiatrischen  
Tumor- Zelllinien**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster

vorgelegt von

Bröckling, Sebastian

aus Paderborn 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos
2. Berichterstatter: PD Dr. C. Schliemann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos  
Koreferent: PD Dr. C. Schliemann

Bröckling, Sebastian

### **Zusammenfassung:**

## **Untersuchung zur in-vitro-Toxizität eines Inhibitors der Aurorakinase A/B, von Vincristin und Paclitaxel an einem Panel von 18 ausgewählten pädiatrischen Tumor-Zelllinien**

**Einleitung:** Jedes Jahr erkranken in der Bundesrepublik Deutschland ungefähr 1.800 Kinder unter 15 Jahren an einem Malignom (Gesamtinzidenz 15/100.000/Jahr) (65). Ziel der Therapieschemata in unserer Zeit ist nicht nur eine weitere Verbesserung der Überlebensraten, sondern auch eine Optimierung der Lebensqualität hinsichtlich der (Langzeit-) Nebenwirkungen.

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits die Wirksamkeit einer neuen Substanzklasse, der sogenannten Aurorakinaseinhibitoren, an Tumorzelllinien, im Tierversuch sowie in Phase I- und II-Studien dokumentiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, einen möglichen Einsatz im bisher unterrepräsentierten Bereich der pädiatrischen Tumorerkrankungen zu eruieren. Zusätzlich wird das bislang in der pädiatrischen Onkologie wenig eingesetzte Spindelgift Paclitaxel (Taxol®) im Vergleich zu dem bereits lange etablierten Vincristin (Oncovin®) mit einbezogen.

**Methodik:** Die Effekte des hier verwendeten Aurorakinaseinhibitors II wurden zum einen allein als auch jeweils in Kombination mit den Zytostatika Paclitaxel und Vincristin in unterschiedlichen Substanzkonzentrationen unter Zuhilfenahme von MTT-Assays an 18 Zelllinien aus sechs Tumorentitäten untersucht. Zusätzlich wurde durch real-time TaqMan®-PCR die Expression der Aurorakinasen A und B in den einzelnen Zelllinien geprüft sowie die Expression auf Proteinebene mittels Western Blots.

**Ergebnisse:** Der hier getestete Aurorakinaseinhibitor II zeigte zusammenfassend unabhängig von seiner Expression in den jeweiligen Zelllinien zytostatische Effekte, insbesondere für die getesteten Leukämie- als auch Ewingsarkomzelllinien und ein heterogenes Ansprechen für die Neuroblastomzelllinien. Die Osteosarkom-, Rhabdomyosarkom- und Medulloblastomzelllinien zeigten eine weitgehende Resistenz. Beim Einsatz von Paclitaxel ließ sich darüber hinaus ein zytotoxischer Effekt bei den Rhabdomyosarkom- und den Leukämiezelllinien zeigen.

**Schlussfolgerungen:** Die Untersuchungen an den ausgewählten Zelllinien bestätigen eine hohe in-vitro-Toxizität des Aurorakinaseinhibitors II wie auch eingeschränkt für Paclitaxel. Gerade in Hinblick auf den Einsatz in der Kombination mit den etablierten Spindelgiften empfehlen sich daher weitergehende Untersuchungen am Tiermodell und davon abhängig in Phase-I/II-Studien, wie sie teilweise bereits im Erwachsenenalter durchgeführt werden.



## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchung zur in-vitro-Toxizität eines Inhibitors der  
Aurorakinase A/B, von Vincristin und Paclitaxel an einem Panel  
von 18 ausgewählten pädiatrischen Tumor-Zelllinien**

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

**Klinik für Kinder- und Jugendmedizin –  
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie**

unter der Anleitung von:

**Univ.-Prof. Dr. med. J. Boos**

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

---

Ort, Datum

---

Name/ Unterschrift

## Abkürzungsverzeichnis:

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AURKA	Aurorakinase A
AURKB	Aurorakinase B
BCR-ABL	auch Philadelphia-Chromosom, Genprodukt bedingt durch Translokation zwischen Chromosom 9 und 22
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Carcinoma (Karzinom)
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CI	Kombinationsindex
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonucleic acid
et al.	et alii (und andere)
FCS	Foetal bovine serum
g	Gramm
GI <sub>50</sub>	50%ige Wachstumshemmung im Vergleich zum Messzeitpunkt
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hora (Stunde)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IC <sub>50</sub>	Konzentration, welche zu einer 50%igen Inhibition in vitro führt
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
l	Liter
LC <sub>50</sub>	50%ige Wachstumshemmung bezogen auf die Kontrolle am Tag Null
log	Zehnerlogarithmus
MDR	Multidrug-Resistance
MDR1-Gen	Multidrug-Resistance1-Gen

µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromol/Liter
µMol	Mikromol
mM	Millimol/Liter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mRNA	messenger RNA
MTD	maximal tolerierbare Dosis
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
nl	Nanoliter
nM	Nanomol/Liter
nMol	Nanomol
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute - Medium
RT-PCR	Real-Time-PCR
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SOP	standard operating procedure (Standardanweisung)
STABW	Standardabweichung
t	tempus (Zeit)
Tab.	Tabelle
TNM-Stadium	Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N), Metastasen (M)
UKM	Universitätsklinikum Münster
v.a.	vor allem
VCR	Vincristin
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung:</b>	1
1.1. Was sind Aurorakinasen?	3
1.2. Der Spindelapparat:	7
1.3. Verwendete Substanzen:	8
1.3.1. Aurorakinase A/B-Inhibitor:	8
1.3.2. Vincristin (Oncovin®):	9
1.3.3. Paclitaxel (Taxol®):	11
<b>2. Material und Methoden:</b>	13
2.1. Verwendetes Material:	13
2.2. Vorstellung des Tumorzellpanels:	18
2.2.1. Ewing-Sarkom:	19
2.2.2. Osteosarkom:	20
2.2.3. Medulloblastom:	21
2.2.4. Neuroblastom:	21
2.2.5. Leukämie:	22
2.2.6. Rhabdomyosarkom:	23
2.3. Grundlagen der Zellkulturtechnik:	24
2.4. MTT-Assay:	26
2.5. RNA-Isolierung:	27
2.6. Real-Time-PCR:	28
2.7. Western Blot:	31
2.8. Herstellung der Verdünnungsreihen:	32
2.9. Versuchsdurchführung:	33
2.10. Datenverarbeitung:	34
<b>3. Ergebnisse:</b>	38
3.1. Inkubation mit Vincristin:	38
3.2. Inkubation mit Paclitaxel:	44
3.3. Inkubation mit Aurora-Kinaseinhibitor II:	49
3.4. Inkubation mit einer Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Paclitaxel:	54
3.5. Inkubation mit einer Kombination aus	

	Aurora-Kinaseinhibitor II und Vincristin:	67
3.6.	Zusammenfassung der ermittelten GI <sub>50</sub> -Werte und der Kombinationsindices :	77
3.7.	Vergleich der zytostatischen Potenz der untersuchten Wirkstoffe:	80
3.8.	Auswertung der RNA-Expressions-Tests:	81
3.9.	Auswertung der Western Blots:	83
<b>4.</b>	<b>Diskussion:</b>	85
4.1.	Auswahl Zellpanel:	85
4.2.	Auswahl der Substanzen und Versuchsdurchführung:	86
4.3.	Vergleichbarkeit von in vitro Daten mit in vivo Daten: Pharmakodynamik, -kinetik:	87
4.4.	Aussagekraft des verwendeten MTT-Assays:	89
4.5.	Versuche mit Vincristin:	90
4.6.	Versuche mit Paclitaxel:	92
4.7.	Versuche mit Aurora-Kinaseinhibitor II:	93
4.8.	Sind besonders schnellwachsende Zellen auch besonders sensibel?	96
4.9.	Versuche mit Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Paclitaxel:	97
4.10.	Versuche mit Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Vincristin:	100
4.11.	Expressionsassays:	102
4.12.	Korrelation p53 Status mit Wirkung des Aurora-Kinaseinhibitors II zum Therapieansprechen:	104
4.13.	Zusammenfassung:	104
<b>5.</b>	<b>Ausblick in die Zukunft:</b>	108
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis:</b>	111
<b>7.</b>	<b>Anlagen:</b>	122
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf:</b>	137
<b>9.</b>	<b>Danksagung:</b>	138

## 1. Einleitung:

Jedes Jahr erkranken in der Bundesrepublik Deutschland ca. 1.800 Kinder unter 15 Jahren an einem Malignom (Gesamtinzidenz 15/100.000/Jahr) (65). Ziel der aktuellen Therapieschemata ist nicht nur eine weitere Verbesserung der Überlebensraten, sondern auch eine Optimierung der Lebensqualität hinsichtlich der (Langzeit-) Nebenwirkungen. Dafür werden bestehende Therapieregime modifiziert sowie neue Wirkstoffkombinationen getestet. Darüber hinaus werden durch die medizinische Grundlagenforschung alternative Wirkstoffe für die Anwendung erschlossen. Hierbei fällt speziell eine Fokussierung auf die häufigen Tumorentitäten des Erwachsenenalters auf. Insbesondere die insgesamt seltenen, jedoch im Kindesalter häufig auftretenden Tumore, wie z.B. die Familie der Ewing-Tumore oder das Rhabdomyosarkom, finden daher bei der Markteinführung neuer Medikamente meist keine Berücksichtigung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Teil dieser Lücke zu schließen und eine neue Wirkstoffklasse chemotherapeutischer Agenzien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit an einem Panel von Zellkulturen häufiger pädiatrischer Tumore zu prüfen. Dazu wurde ein neuartiger „small-molecul-inhibitor“ der Aurorakinase A und B im Vergleich zu dem in der Pädiatrie etablierten Vincristin untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde die bei pädiatrischen Patienten bisher wenig verwendete Substanz Paclitaxel auf ihre Wirksamkeit untersucht. Zusätzlich wurde der Aurorakinaseinhibitor jeweils in Kombination mit Vincristin und Paclitaxel an den unterschiedlichen Zellkulturen getestet. Als Toxizitätsnachweis dienten MTT-Assays.

Ein zweiter Teil der Arbeit sollte zeigen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression der Aurorakinase A und B und dem Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung insbesondere mit Inhibitoren der Aurorakinase A und B gibt. Als Methode diente hier der RNA-Nachweis der Aurorakinasen-RNA-Transkripte mittels Real-Time-PCR. Zusätzlich wurde mittels Western Blots die Höhe der translatierten mRNA bestimmt.

---

Zusammenfassend ergeben sich damit folgende Fragestellungen:

- Sind Aurorakinasen zytotoxisch gegen pädiatrische Tumorzelllinien?
- Ist das an pädiatrischen Tumorzelllinien bisher wenig erforschte Paclitaxel (Taxol®) eine zusätzliche Alternative zum etablierten Vincristin?
- Kann mit einer Kombination, im Speziellen mit etablierten Hemmern des Spindelapparates, eine Dosisreduktion erreicht werden? Oder bestehen antagonistische Effekte?
- Korreliert die Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Aurorakinase mit deren Expression durch die verschiedenen Tumoren?

### 1.1. Was sind Aurorakinasen?

Jede Zelle des Körpers benötigt vielfältige Signalwege, um essentielle Funktionen z.B. für ihren Stoffwechsel oder ihre Teilung aufrecht zu erhalten. Kinasen, dies sind Enzyme, die Phosphatgruppen auf andere Moleküle übertragen, spielen dabei eine wichtige Rolle. Momentan sind über 500 von ihnen bekannt, die in einem komplexen Netzwerk miteinander interagieren. Eine Störung dieses Netzwerks scheint ein bei vielen Tumorerkrankungen zentrales Element für den malignen Phänotyp zu sein (86).

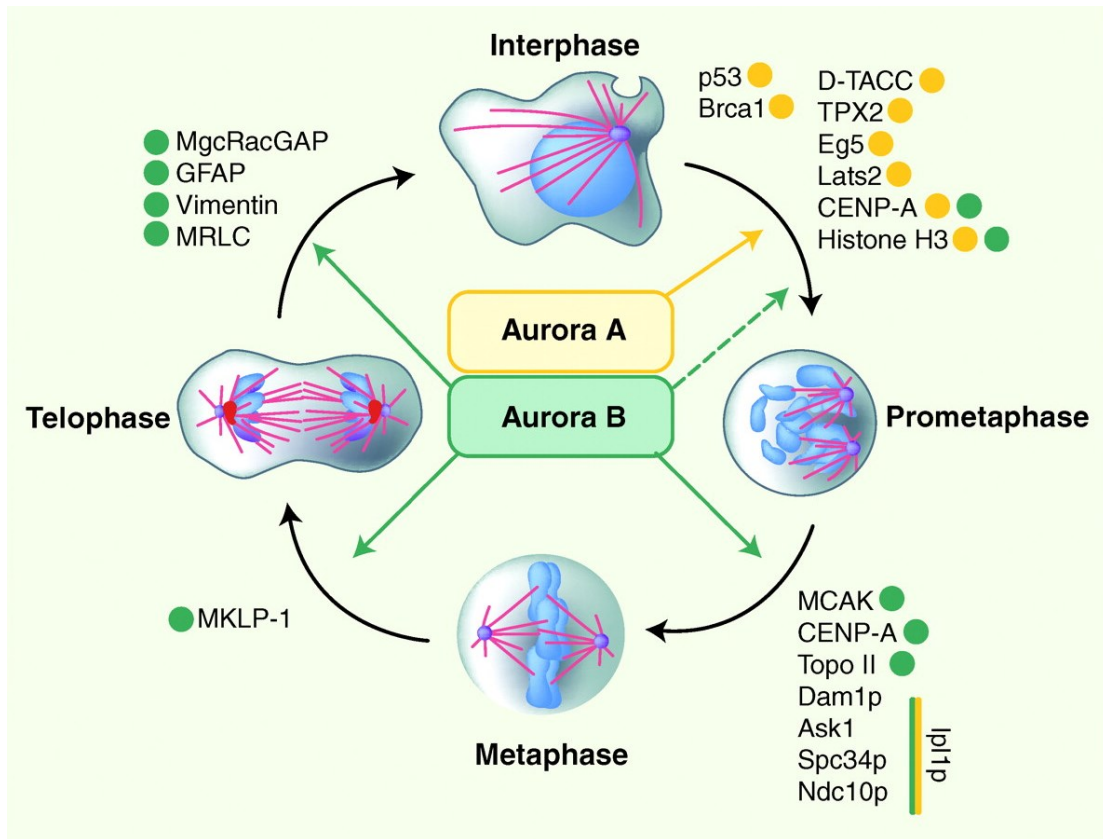
Verstände man die Bedeutung einzelner Akteure in diesem Netzwerk genauer, wäre es möglich, eine auf molekularbiologischen Erkenntnissen basierende speziellere, eventuell nebenwirkungsärmere Therapie anbieten zu können.

Ein Durchbruch in der klinischen Anwendung gelang mit der Einführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Glivec) in die Behandlung der Chronischen myeloischen Leukämie (CML) (O'Brien et al. 2003). Momentan sind weitere Kinaseinhibitoren in der Entwicklung, einige, wie Sunitinib (Sutent®) (84) oder Sorafenib (Nexavar®) (29), bereits in der klinischen Erprobung bzw. Anwendung, z.B. bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Die Familie der Aurorakinasen stellt ein weiteres viel versprechendes Angriffsziel für neue Therapieoptionen in der Krebsbehandlung dar.

Die Familie der Aurorakinasen, die zur Gruppe der Seronin-Threonin-Kinasen gehören, umfasst drei verschiedene Enzyme, die im Zusammenspiel mit anderen Proteinen für die Verteilung der Chromosomen während der Mitose sorgen. Eine Überexpression der Aurorakinase A ist mit einer Chromosomenamplifikation, schlechter histologischer Differenzierung und schlechter Prognose verbunden (37), während eine Überexpression der Aurorakinase B bei vielen Tumoren gezeigt werden konnte und mit vermehrter genetischer Instabilität einhergeht (63). Über die Funktion der Aurorakinase C und insbesondere einer Rolle bei Tumoren ist bisher nur wenig bekannt (24). In Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer Überexpression von Aurora C während der Meiose in Mäusehoden kommt (113).

Einen Überblick über die bekannten Interaktionen mit zellzykluspezifischen Proteinen gibt Abbildung 1 (37).





**Abb. 1:** Rolle und zeitliches Auftreten der Aurorakinasen im Zellzyklus sowie die Beeinflussung verschiedener Zellzyklusgene: Dargestellt sind mit orangenen Punkten Ziele der AURKA, mit grünen Punkten diejenigen der AURKB, Grafik unverändert übernommen aus Quelle: (37)

Es wurden bereits verschiedene „small-molecule-inhibitors“ für die Aurorakinasen entwickelt (24), (85). Gute Ergebnisse zeigten sich bisher bei Leukämiepatienten. Die Relevanz der Aurorakinasen für die Regulierung der Mitose hat diese aber auch für andere Tumorentitäten, wie z.B. das Mamma-Karzinom, das Ovarial-Karzinom, das Colon-Karzinom usw., interessant werden lassen (37), so dass derzeitige viele Tumoren auf ein eventuelles therapeutisches Ansprechen mit verschiedenen Inhibitoren untersucht werden (18), (25), (31), (61), (99), s. Tabelle 1. Die momentan verfügbare Datenlage (s. Tabelle 1 und (18)) wird ausführlich im Diskussionsteil beschrieben als auch einige bereits veröffentlichte Studien exemplarisch vorgestellt (s. Kapitel 4, insbesondere 4.7., 4.9., 4.13. und 5).

**Aktuelle Studien zu Aurorakinase-Inhibitoren und Angabe zur Datenlage**  
**(Stand: November 2014) (18)**

<b>Studienname</b>	<b>Sponsor</b>	<b>Status</b>	<b>Tumorentität</b>	<b>Phase</b>
A Phase I Study of AT9283 Given As a 24 Hour Infusion on Days 1 and 8 Every Three Weeks in Patients With Advanced Incurable Malignancy	NCIC Clinical Trials Group	abgeschlossen, veröffentlicht	solide Tumoren, Non-Hodgkin-Lymphome	I
A Phase I, Dose-escalation Study of AS703569 Given Orally to Subjects With Haematological Malignancies	EMD Serono	frühzeitig beendet bei hoher Toxizität, veröffentlicht (46)	hämatologische Neoplasien (AML, CML, NHL etc.)	I
A Phase I Pharmacologic Study of CYC116, an Oral Aurora Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors	Cyclacel Pharmaceuticals Inc.	(frühzeitig) abgebrochen/ beendet, nicht veröffentlicht	solide Tumoren, ausbehandelt	I
A Phase I Dose Escalation Study of MK0457 Evaluating the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a 24-Hour Continuous Infusion Given Every 21 Days in Patients With Advanced Cancer	Merck Sharp & Dohme Corp.	frühzeitig beendet, veröffentlicht (118)	solide Tumoren, ausbehandelt	I
A Phase I, Open Label, Multi-Center, Accelerated Dose-Escalation, Pharmacokinetic And Pharmacodynamic Trial Of The Oral Single Agent Aurora Kinase Inhibitor PF-03814735 In Patients With Advanced Solid Tumors For Whom No Standard Therapy Is Available	Pfizer Inc.	abgeschlossen, veröffentlicht (105)	solide Tumoren, ausbehandelt	I
A Phase I/IIa Study Evaluating the Safety/Tolerability, Pharmacokinetics, and Efficacy of MK0457 Administered as a 5-Day Continuous Infusion in Patients With Advanced Colorectal Cancer and Other Solid Tumors	Merck Sharp & Dohme Corp	frühzeitig abgebrochen/ beendet	solide Tumoren, ausbehandelt	I

A Phase 1, First-in-Human Study Evaluating the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Orally Administered AMG 900 in Adult Subjects With Advanced Solid Tumors	Amgen	aktiv, aber rekrutiert momentan nicht	solide Tumoren, ausbehandelt	I
A Phase I, Dose-escalation Study of a Combination AS703569 and Gemcitabine Given to Subjects With Advanced Malignancies	Merck KGaA	abgeschlossen, veröffentlicht (94)	solide Tumoren, fortgeschritten, Kombination mit Gemcitabin	I
Phase 1 Open-Label Multicenter, Dose-Escalating, Clinical Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of SNS-314, a Novel Aurora Kinase Inhibitor, Administered to Patients With Advanced Solid Tumors	Sunesis Pharmaceuticals	abgeschlossen	solide Tumoren, ausbehandelt	I
A CCLG/Cancer Research UK Phase I Trial of AT9283 (a Selective Inhibitor of Aurora Kinases) Given for 72 Hours Every 21 Days Via Intravenous Infusion in Children and Adolescents With Relapsed and Refractory Solid Tumors	Cancer Research UK	abgeschlossen, veröffentlicht (81)	solide Tumoren	I
An Open Phase I/IIa Trial to Investigate the Maximum Tolerated Dose, Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of BI 811283 in Combination With Cytarabine in Patients With Previously Untreated Acute Myeloid Leukaemia Ineligible for Intensive Treatment	Boehringer Ingelheim	abgeschlossen, nicht veröffentlicht	AML, ohne Option für intensive Therapie, Kombination mit Cytarabin (kontrolliert)	II
A Phase II Study of MLN8237 (IND# 102984), a Selective Aurora A Kinase Inhibitor in Children With Recurrent/ Refractory Solid Tumors and Leukemias	Children's Oncology Group	abgeschlossen, veröffentlicht (83)	ALL, solide Tumoren, Neuroblastome	I/

**Tab. 1:** Die Aufstellung kann nur eine Auswahl wiedergeben. Bei Recherche (Stand November 2014) wurden 48 laufende, bereits schon abgeschlossene oder abgebrochene klinische Studien gefunden. Für die wenigsten sind bisher Daten publiziert (clinicaltrials.gov ; Suchbegriffe: neoplasm, cancer, aurora, kinase).

Für den Einsatz konventioneller Zytostatika existieren auf Zellebene verschiedene

Angriffsziele. Eines davon ist der für die Zellteilung wichtige Spindelapparat.

Es gibt bereits mehrere Möglichkeiten, den Spindelapparat und damit die Zellteilung zu beeinflussen, u.a. über die bereits seit Jahren etablierten Taxane und Vincaalkaloide (116). Während die Vincaalkaloide den Spindelapparat eher destabilisieren, stabilisieren die Taxane jenen und führen damit zur Apoptose (90), (104).

Die Entdeckung, dass gerade die Aurorakinase B einen entscheidenden Anteil an der Steuerung und dem Aufbau des Spindelapparates besitzt und damit eventuell spezifischer wirkt, könnte zu einer neuen nebenwirkungsärmeren Behandlung führen (4).

## 1.2. Der Spindelapparat:

Grundlage jeder Zellteilung ist die Weitergabe der Chromosomen an die Tochterzellen. Dafür enthält jede Zelle den Spindelapparat, aufgebaut aus dünnen Spindelfasern, den sogenannten Mikrotubuli. Jeder Mikrotubulus besteht wiederum aus 13 in Längsrichtung parallel angeordneten Protofilamenten aus einer Kette von Tubulinmolekülen. Tubulin ist ein Heterodimer bestehend aus zwei polaren Untereinheiten,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Mittels spezieller Proteine – der Kinetochore – sind die Mikrotubuli mit den Centromerregionen der Chromosomen verbunden, über die diese auf die Tochterzellen verteilt werden.

Entsprechend der polaren Ausrichtung der Tubulinuntereinheiten besitzt auch der gesamte Mikrotubulusapparat ein „+“ und ein „-“ Ende. An diesen kann er dynamisch auf- als auch abgebaut werden.

Der Spindelapparat besitzt daher eine große Bedeutung für die Zellteilung und somit für antineoplastisch wirkende Stoffe. Neben Vincaalkaloiden sind dies das Colchicin und die Taxane. Eine neue Wirkgruppe, deren Wirkung auf den Spindelaufbau dem der Taxane ähnelt (s.u.), sind die Epothilone. Eines davon, Ixabepilone, wurde 2007 von der Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung taxanresistenter Mamma-Karzinome zugelassen (68), (27).

Mit der weiteren Erforschung der Aktivierung und Regulation des Spindelapparates rückten verschiedene Kontrollproteine in den Blickpunkt pharmakologischen Interesses, u.a. die Klasse der Aurorakinasen, einer Gruppe von Seronin-Threonin-Kinasen, die während der Mitose aktiviert werden und entscheidend für die Regulation der Zellteilung sind (s. Abb. 1), (37), (50).

Diese Arbeit soll den eventuellen Nutzen eines Einsatzes von so genannten „small-inhibitor-molecules“ der Aurorakinasen aufzeigen.

Während ein möglicher Einsatz bereits für Leukämiezelllinien sowie in Phase I-Studien an Patienten gezeigt werden konnte (s. Tab. 1), wurde dem möglichen Einsatz an pädiatrischen Tumorzelllinien bisher wenig Beachtung gezeigt. Diese Lücke soll durch diese Arbeit geschlossen werden.

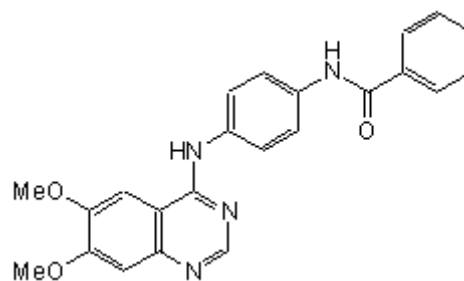
### 1.3. Verwendete Substanzen:

Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Substanzen kurz bezüglich ihrer Wirkungsweise (soweit bekannt), ihrer momentanen Anwendungsgebiete, ihrer Pharmakokinetik als auch ihrer beschriebenen relevanten Nebenwirkungen vorgestellt.

#### 1.3.1. Aurorakinase A/B-Inhibitor:

Der für diese Arbeit verwendete Inhibitor der Aurorakinasen gehört zur Gruppe der sogenannten „small molecule inhibitors“, einer Gruppe von Wirkstoffen die gezielt gesucht werden, um Enzyme bzw. größere Enzymkomplexe möglichst wirksam zu blockieren.

Für diese Arbeit wurde der Aurora-Kinaseinhibitor II = 4-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-Dimethoxyquinazoline von Calbiochem (EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA) verwendet. Wegen seiner hohen Proteinbindung im Serum und niedrigen Wasserlöslichkeit wird der hier verwendete Wirkstoff nur für in vitro-Anwendungen gebraucht (77). Zielstruktur der Substanz ist die ATP-Bindungsstelle der Kinase, welche kompetitiv gehemmt wird (50), (77).



**Abb. 2:** Strukturformel des für diese Arbeit verwendeten Aurora-Kinaseinhibitor II von Calbiochem (77)

#### Anwendungsgebiet:

Bisherige Anwendungsgebiete ergeben sich für die bereits vorhandenen Aurorakinase-Inhibitoren lediglich aus experimentellen Ansätzen bzw. Phase I-/II-Studien, für die teilweise noch Patienten rekrutiert werden (16), (18), (24), (25), (31), (61), (s. Tab.1).

Beispielsweise werden für eine selektive Patientenklientel von AML-Patienten Wirkstoffe verschiedener Hersteller bereits in Phase-I- und Phase-II-Studien getestet. Vielversprechende Daten existieren außerdem für therapierefraktäre Formen BCR-ABL positiver chronisch lymphatischer Leukämien (43), (44). Der Aurorakinaseinhibitor MK-0457 (VX680) wurde bereits an dieser Patientenklientel getestet. Hier zeigte sich bei drei bereits vorbehandelten Patienten eine hämatologische Remission (zwei Patienten mit CML, ein Patient mit Philadelphia-Chromosom-positiver ALL), die zuvor auf die Standardtherapie nicht mehr angesprochen hatten (41).

Derzeit werden mögliche Einsatzziele für verschiedene Inhibitoren der Aurorakinasen getestet, u.a. an soliden Tumoren (16), (24), (71).

#### Nebenwirkungen:

Bisher beschriebene Nebenwirkungen für verschiedene Inhibitoren der Aurorakinasen sind Neutropenie, Schwindel, Schwäche sowie eine Erhöhung der Serumtransaminasen (31), (33), (81), (83). Der Wirkstoff VX-680 von Vertex-Pharmaceuticals zeigte bei Patienten auch eine Verlängerung der QT-Zeit im EKG; eine Phase-II-Studie wurde daraufhin zunächst unterbrochen. In einer Phase I-Studie mit dem Wirkstoff AT9283 an 48 Patienten mit rezidivierten oder refraktären Leukämien oder myeloproliferativen Erkrankungen wurden als dosislimitierende Nebenwirkungen zusätzlich ein Tumorlysesyndrom bei zwei Patienten sowie Bluthochdruck, Kardiomyopathie (2 von 48 Patienten) und Multiorganversagen beobachtet. Ein Patient verstarb an einem Myocardinfarkt nach Beendigung der Infusion des Studienmedikamentes unter der höchsten Dosisstufe. Bezüglich des Myocardinfarktes wurde ein ursächlicher Zusammenhang mit der Studienmedikation vermutet (31).

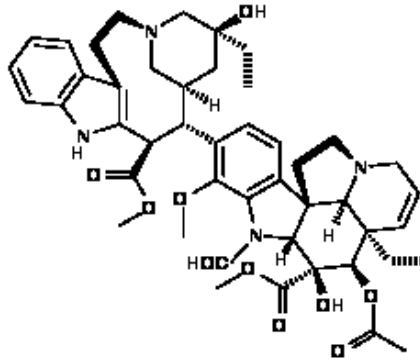
#### Pharmakokinetik:

Bezüglich der Pharmakokinetik liegen zu den verschiedenen AURKA/AURKB-Inhibitoren Daten aus Phase I-Studien vor, u.a. (31). Der für diese Arbeit verwendete Aurorakinaseinhibitor II = 4-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-Dimethoxyquinazoline von Calbiochem wurde nicht am Menschen getestet (77). Es liegen daher keine Daten vor.

### **1.3.2. Vincristin (Oncovin®):**

Vincristin gehört zu den Vincaalkaloiden und hemmt die Bildung des Spindelapparates, indem es die Anlagerung weiterer Tubulinuntereinheiten unterbindet (62). Dies führt zum

Arrest der Mitose und konsekutiv zum Zelltod. Vincristin wird halbsynthetisch aus der rosafarbenen Catharanthe (früher: *Vinca rosea*) gewonnen (107).



**Abb. 3:** Strukturformel Vincristin (107), (109)

#### Anwendungsgebiet:

In der Kombinationstherapie wird Vincristin bei folgenden Tumorentitäten angewandt: akute lymphatische Leukämie (ALL), Morbus Hodgkin, kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Mamma-Karzinom, Wilms-Tumor, Rhabdomyosarkom, Ewing-Sarkom, Neuroblastom (109).

#### Pharmakokinetik:

Vincristin wird bei oraler Gabe nicht ausreichend resorbiert, es wird daher intravenös appliziert. Ein Übertritt in den Liquor cerebrospinalis findet nahezu nicht statt. Die Elimination erfolgt triphasisch: Die initiale Halbwertszeit (HWZ) wird mit 5 min, die mittlere mit 2,3 h, die dritte mit 85 h angegeben (109).

Es besteht eine weite Intra- und Interpatientenvariabilität bezüglich der Gesamtkörperclearance, der Eliminationshalbwertszeit und der „Area under the curve“ (AUC) (80). In einer Studie zur Monotherapie mit Vincristin an zuvor unbehandelten Kindern mit ALL konnte eine Gesamtkörperclearance von 228 (Interquartilenspannweite von 128-360) ml/min/m<sup>2</sup>, ein Verteilungsvolumen im steady state von 262 (Interquartilenspannweite von 158-469) L/m<sup>2</sup> sowie eine AUC von 6,7 (4,2-12,3) mg/L/min bestimmt werden (47).

Vincristin wird zu ca. 75% an Plasmaproteine gebunden, die Elimination verläuft zu ca. 80% über die Leber, zu 20% über die Nieren. Da der hepatische Abbau v.a. über CYP3A4 erfolgt, kann es bei gleichzeitiger Anwendung von Medikamenten, die diesen

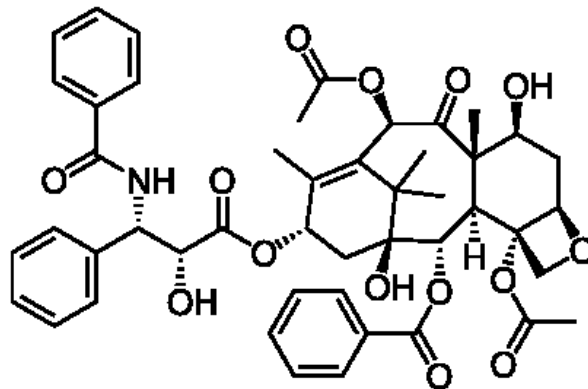
Enzymkomplex hemmen (z.B. Itraconazol, Voriconazol etc.), zu einer verstärkten Zytotoxizität kommen. Eine versehentliche intrathekale Applikation endet letal (53).

#### Nebenwirkungen:

Wie alle Chemotherapeutika besitzt Vincristin zahlreiche Nebenwirkungen, wie zum Beispiel: neuromuskuläre Störungen, Parästhesien, Ataxie, Lähmungen, Doppelbilder, Ulzerationen der Mundschleimhaut, Nieren- und Knochenmarkschädigung (109). Bei einer paravenösen Applikation (Paravasat) können schwere Hautnekrosen auftreten.

#### **1.3.3. Paclitaxel (Taxol®):**

Die Entdeckung der antineoplastischen Eigenschaften des Paclitaxels erfolgte bereits in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts, als das US-Department of Agriculture ein Programm zur Untersuchung von Pflanzen auf ihre antineoplastische Aktivität aufsetzte. Paclitaxel findet sich in Nadeln der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia* Nutt.). Es wird für den klinischen Einsatz in pflanzlichen Zellkulturen hergestellt.



**Abb. 4:** Strukturformel Paclitaxel (108), (109)

#### Wirkungsweise:

Die proliferationshemmende Wirkung des Paclitaxels beruht auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli durch die Bindung an der  $\beta$ -Tubulinuntereinheit. Es kommt zur funktionellen Schädigung des Spindelapparates. Die Krebszellen sterben daraufhin durch die Aktivierung der Apoptose ab (90), (104), z.B. über eine vermehrte Phosphorylierung von bcl2 (48).



Anwendungsbereich:

Bei erwachsenen Patienten kommt es beim Mamma-, Ovarial-, dem nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinom (NSCLC), Sarkomen als auch zur pharmakologischen Beschichtung von Stents bei der Koronarangiographie („drug eluting stents“) zur Anwendung (109). Bisher gibt es keine zugelassene Anwendung in der Kinderheilkunde. Innerhalb von Studienprotokollen oder in Form von Einzelfallberichten wird Paclitaxel in Polychemotherapieprotokollen bei Neuroblastomen, Keimzelltumoren, Gliomen, Sarkomen, Hepatoblastomen, Lymphomen und Leukämien verwendet (109).

Pharmakokinetik:

Paclitaxel kann nur i.v. verabreicht werden. Da es praktisch nicht löslich in Wasser und nur schwer löslich in organischen Lösungsmitteln ist, sind spezielle Lösungsvermittler zur Solubilisierung notwendig. Für die Stabilität der Lösung wird dem Paclitaxel daher ein auf Rizinusöl basierendes Multikomponentengemisch namens Cremophor® zugesetzt (9). Dies fungiert als nicht-ionischer Lösungsvermittler. Aufgrund einer Interaktion des Cremophors mit den in den handelsüblichen PVC-Infusionsbestecken befindlichen Weichmachern, welche lebertoxisch sind, dürfen nur PVC-freie Infusionsbestecke für die Applikation von Paclitaxel verwendet werden (9).

Paclitaxel wird besonders schnell in die extravasalen Räume verteilt (Verteilungsvolumen im steady state ( $V_{dss}$ ): 42-162 L/m<sup>2</sup>) (109). Der größte Teil wird proteingebunden im Plasma transportiert (ca. 90%). Die Elimination erfolgt v.a. hepatisch. Die terminale HWZ liegt zwischen 8-12 h je nach Quelle (108).

Wichtige Interaktionen sind für die Kombinationstherapie mit Anthrazyklinen und Cisplatin (verstärkte Myelosuppression) sowie mit Antikonvulsiva (Zunahme der Clearance) beschrieben (108).

Nebenwirkungen:

Häufig sind allergische Reaktionen, daher ist eine adäquate Prämedikation mit Antihistaminika und Kortikosteroiden notwendig. Darüber hinaus sind u.a. folgende Nebenwirkungen zu beachten: Knochenmarksuppression, Neuropathien, Myalgien, Haarausfall, Durchfall (109).

## 2. Material und Methoden:

### 2.1. Verwendetes Material:

Material	Ausführung/Beschreibung	Hersteller
<b>Geräte:</b>		
Mikroskop	Televal 3.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0 Heraeus	W. C. Heraeus GmbH Heraeusstr. 12-14 63450 Hanau, Deutschland
Werkbank	Lamin-Air, HBB 2448	W. C. Heraeus GmbH (s.o.)
Brutschrank	Sanyo-CO <sub>2</sub> -Incubator	SANYO Biomedical Produkte Rotrehre 26 31542 Bad Nenndorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte Hauptstraße 7-15 D-74246 Eberstadt, Deutschland
Heizung-Warmwasserbad	JuLabo, 5A	JULABO Labortechnik GmbH Einbahnstraße 45 77960 Seelbach, Deutschland

Eppendorf-Multipette	Multipette plus, 4163801	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 Hamburg, Deutschland
Photometer für MTT-Assays	Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman Street Waltham, MA 02454 , USA
Zellzähler	Casy® 1	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Analysator für RNA-Qualität und Quantität	2100-Bioanalyzer	Agilent Technologies Waldbronn, Deutschland
Real-time PCR-Gerät	ABI Prism 7700 sequence detection system	Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roboter zur Vorbereitung der real-time PCR	Tecan Genesis 150 robotic	Tecan Deutschland GmbH Crailsheim, Deutschland
Schüttler	Vibrax VXR basic Typ VX2 (Reagenzglasauflage)	IKA® Staufen, Deutschland
<b>Einmalbedarf:</b>		
Falcon-Tube	50ml, steril, 15ml, steril	Falcon-Becton Dickinson Labware, USA 353072
Combitips plus	1ml, 5ml Eppendorf Biopur	Eppendorf AG (s.o.)

OP-Abdecktuch		Klinidrape, Mölnlycke Health Care, Deutschland
Costar Stripette steril, non pyrogenic	1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Dow Corning Corporation 2200 W. Salzburg Road 48686-0994 Midland Michigan USA
Serological pipet, steril, non pyrogenic	1ml, Falcon, 357520	Falcon-Becton Dickinson Labware, USA
Einmaltücher	AS67	igefa, 15827 Dahlewitz, Deutschland
Einmalhandschuhe, puderfrei, Latex		Ansell. Thailand, Dermaclean
Microtest-Platte	Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel, aus Polystyren, steril	Falcon-Becton Dickinson Labware (s.o.)
Zellkulturflaschen-Cellstar Tissue culture flasks	25cm <sup>2</sup> , 50 ml, PS, red standard cap, steril	Greiser Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzenaufsätze	blau für 10µl – Pipette gelb für 100µl – Pipette blau groß für 1000µl – Pipette steril und nicht steril	
Eppendorf-Gefäße	1ml, steril	Eppendorf AG (s.o.)

**Reagenzien und Lösungen:**

RPMI 1640	Nährmedium, enthält zusätzlich: Antibiotic-Antimycotic; GibcoBRL, No.: 15240-062 (Penicillin G sodium 10.000 U/ml, Streptomycin sulphate 10.000 µg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml in 0,85% NaCl (5,5ml auf 500ml Medium)); FCS (fetales Kälberserum) 50ml auf 500ml Medium, GibcoBRL, No.: 10108-165; L-Glutamine (100x) 200 mM, GibcoBRL, No.: 25030-024	Gibco®, No.: 21875-034; Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, USA
GlutaMax	Nährmedium	Gibco®; Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA-Lösung; 0,5g Trypsin, 0,2g EDTA pro L in PBS; Lot-No.: H04121-254	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid; 5mg MTT pro ml in PBS (Phosphatgepufferte Saline, pH 7,4); M2128, Lot.:66H5033	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Lyse-Reagenz	20 g SDS (Sodiumdodecylsulfat), Sigma, gelöst in 50 ml Wasser und 50 ml DMF (N,N-Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 0,1 N	497,05 ml demineralisiertes Wasser + 2,95 ml Eisessig	Baker Chemicals Deventer, Niederlande
Ethanol 96%		Apotheke des Universitätsklinikums Münster, 48149 Münster, Deutschland
Desinfektionsmittel	100 g: 25g Ethanol (94%), 35 g Propanol	Antiinfect N Liquid, Schülke & Mayer GmbH, Wien
Collagen	Collagen1 Typ R, aus Rattenschwanz 6 mg/ml in 0,2% Essigsäure-Lösung, pH 3,2-4,0, verdünnt auf 0,2mg/ml 0,1 M Essigsäure	Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland, No.: Z-17C03-A
Demineralisiertes Wasser	Hergestellt mit Milli-Q-UF	Millipore, Eschborn, Deutschland

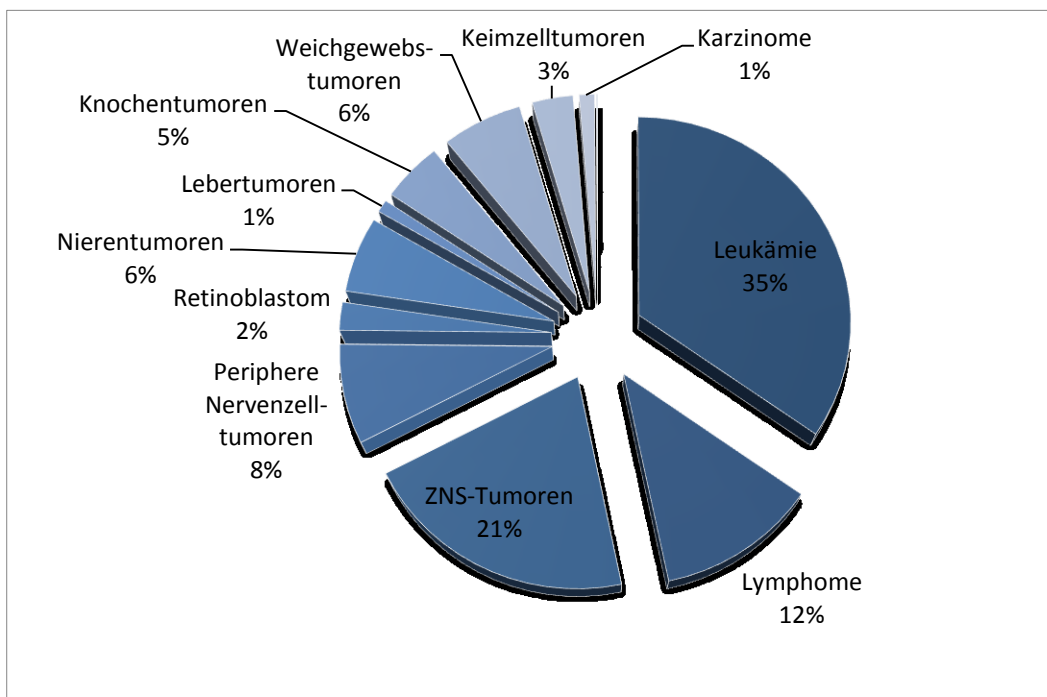
### Zytostatika:

Aurora-Kinaseinhibitor II = 4-(4'-Benzamidoanilino)- 6,7-Dimethoxyquinazoline	Bestellnummer: 189404	EMD Biosciences, Inc., San Diego, , CA 92121, USA
Vincristin (Oncovin®)	Produktnummer: V8388	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Germany
Paclitaxel (Taxol®)	Bestellnummer: 580556- 5MG	EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA

**Tab. 2: Auflistung der verwendeten Materialien, des Einmalbedarfs, der Reagenzien und Lösungen sowie der Zytostatika**

## 2.2. Vorstellung des Tumorzellpanels:

Die unterschiedlichen Versuche wurden an aus Tumoren etablierten permanenten Zellkulturen durchgeführt. Als Bezugsquellen dienten die „American Type Culture Collection“ (ATCC, Rockville, Md., USA, für DAOY, RD und IMR-5) und die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ, Braunschweig, für CCRF-CEM, MOLT-4, REH, HL-60, CADO-ES-1, SH-SY5Y und RH-30). MNNG-HOS, OST, SHEP und SMS-KCN wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. C. Poremba (Institut für Pathologie, Universität, Düsseldorf), UW228.2 von Herrn Professor Dr. Dr. M. Frühwald (ehemals Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Münster, jetzt Klinikum Augsburg) zur Verfügung gestellt, STA-ET-1, STA-ET-2.1 und VH-64 von Herrn Dr. rer. nat. F. van Valen (Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Münster). Die Zelllinien wurden gemäß der vom Anbieter empfohlenen Bedingungen kultiviert.



**Abb. 5: Diagramm zur Häufigkeit kindlicher Tumoren in Deutschland (Diagramm erstellt aus den Daten folgender Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister, Mainz, (65))**

Insgesamt standen für die Versuche 18 Zelllinien sechs unterschiedlicher Tumorentitäten zur Verfügung. Diese repräsentieren die häufigsten pädiatrischen Tumoren (65), (Abb. 5). Abgesehen von der AML-Zelllinie HL-60 wurden alle Zelllinien aus Tumoren pädiatrischer Patienten gewonnen. Die folgenden Angaben basieren auf den Daten der

unterschiedlichen Bezugsquellen der Zelllinien sowie den jeweils angegebenen Literaturangaben.

Tumor	Zelllinien			
Ewing-Sarkom	CADO-ES-1	STA-ET-1	STA-ET-2.1	VH-64
Osteosarkom	OST	MNNG-HOS		
Medulloblastom	DAOY	UW228.2		
Neuroblastom	IMR-5	SMS-KCN	SHEP	SH-SY5Y
Leukämie	CCRF-CEM	REH	MOLT-4	REH
Rhabdomyosarkome	RH-30	RD		

**Tab. 3: Auflistung der verwendeten Zelllinien nach Tumorart**

Nachfolgend werden in kurzer Form die einzelnen Zelllinien vorgestellt.

### 2.2.1. Ewing-Sarkom:

Nach dem Osteosarkom ist das Ewing-Sarkom bei Kindern und Jugendlichen der zweithäufigste Tumor des Knochens (65), (93). Besonders häufig sind die Diaphysen der Oberschenkelknochen befallen, daneben das Becken und platte Knochen (93).

Charakteristischerweise zeigen sich spezifische Chromosomentranslokationen, z.B.  $t(11;22)$ ,  $t(21;22)$ . Daraus resultieren Fusionsproteine mit onkogener Wirkung (6). Eine Chemotherapie ist wichtiger Bestandteil eines multimodalen Therapiekonzeptes. Dieses richtet sich in Deutschland i.d.R. nach dem Protokoll der Studie EURO-E.W.I.N.G (EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups – Ewing Tumour Studies 1999) bzw. des aktuellen EWING 2008-Protokolls (93), (112).

#### CADO-ES-1

Diese Tumorzelllinie wurde aus einem malignen Pleuraerguss eines 19-jährigen japanischen Mädchens gewonnen. Ursprünglich lag ein Tumor der rechten Gesäßhälfte vor. Die Zelllinie weist eine  $t(21;22)$  Translokation auf (66), (91).

#### STA-ET-1

STA-ET-1 konnte aus einem peripheren neuroektodermalen Tumor (PNET) im



Oberarmknochen eines 13-jährigen Mädchens kultiviert werden. Es findet sich hier eine t(11;22) Translokation (91). Die Generationszeit beträgt 40,7 h (1).

#### STA-ET-2.1

Diese Zelllinie trägt die typische t(21;22) Translokation, eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 sowie eine Deletion auf Chromosom 22 (del(22)(q12)) (91). Diese Tumorzellen stammen aus einem pPNET-Tumor eines 15-jährigen Jungen. Die Generationszeit beträgt etwa 60 h, eine P-gp-Expression zeigt sich bei etwa 20% der Zellen (1), (111).

#### VH-64

VH-64 konnte aus einem malignen Pleuraerguss eines 24 Jahre alten Patienten mit einem Ewing-Sarkom etabliert werden. Es zeigt sich die charakteristische t(11;22) Translokation (111), (119), (120).

### **2.2.2. Osteosarkom:**

Das Osteosarkom ist bei Kindern und Jugendlichen der häufigste maligne primäre Knochentumor. Es tritt insbesondere gelenknah an den großen Röhrenknochen auf. Bei der Diagnosestellung zeigen 20% der Patienten bereits Metastasen.

#### MNNG-HOS

Die MNNG-HOS-Zelllinie konnte aus dem Osteosarkom eines 13 Jahre alten Mädchens isoliert werden. Es ist eine chemisch transformierte Zelllinie. Als Ursprung diente die Zelllinie HOS, die mit dem karzinogenen Nitrosamin MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) behandelt wurde (97), (98).

#### OST

Es handelt sich um eine humane Zelllinie, die aus dem Femur eines 15-jährigen Mädchens isoliert wurde (7), (88).

### **2.2.3. Medulloblastom:**

Das Medulloblastom gehört zu den äußerst malignen Hirntumoren im Kleinkindesalter. Die Inzidenz liegt bei ca. 5/1000.000/Jahr. Es findet sich infratentoriell insbesondere um den vierten Ventrikel und den Kleinhirnwurm. Oft liegen bei Diagnosestellung schon Metastasen vor. Die Metastasierung erfolgt häufig als Abtropfmetastase in den Liquor cerebrospinalis. Da die momentane Fünfjahresüberlebensrate aller Patienten bei nur 50%, die Langzeitüberlebensrate bei nur 30% mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Retardierung im Wachstum und Entwicklung kognitiver Fähigkeiten liegt (60), sind neue Therapieansätze nötig.

Zur Standardtherapie gehören neben einer operativen Resektion eine Bestrahlung und stadienabhängig eine Chemotherapie.

#### DAOY

Diese Zelllinie konnte 1985 aus der hinteren Schädelgrube eines vierjährigen Jungen etabliert werden. Die angegebene Verdopplungszeit beträgt 34 Stunden (52), (59).

#### UW228.2

Es handelt sich hierbei um einen Subklon der Zelllinie UW228, welche aus einem Medulloblastom aus der Posteria fossa eines acht Jahre alten Mädchens gewonnen wurde. Es handelt sich um Zellen mit diploidem Chromosomensatz. Die Zellen sind teilweise für Synaptophysin und das sogenannte „glial fibrillary acidic protein“ positiv. Sie bilden Kolonien und wachsen einschichtig in der Zellkultur (64).

### **2.2.4. Neuroblastom:**

Das Neuroblastom macht unter den Tumoren des Kindesalters einen Anteil von ca. 8% aus. Es ist der häufigste extrakranielle solide Tumor (65). Es geht von embryonalen Zellen des Grenzstranges sowie der Paraganglien aus. Besonders häufig findet sich der Tumor in den retroperitonealen Ganglien.

#### IMR-5

IMR-5 wurde aus der Zelllinie IMR.32 gewonnen. Diese entstammt den Tumorzellen eines einjährigen kaukasischen Jungen. Charakteristischerweise zeigen sich eine N-MYC Amplifikation und eine Deletion auf Chromosom 1 (del 1p36) (67), (121).

### SMS-KCN

Bei der SMS-KCN-Zelllinie liegen ebenfalls die häufige N-MYC-Amplifikation sowie eine Deletion auf Chromosom 1 vor. Die Zelllinie wurde aus einer suprarenal gelegenen Tumormasse bei einem elf Monate alten kaukasischen Jungen vor Therapiebeginn isoliert (96).

### SH-SY5Y

Diese Zelllinie zeigt weder die typische N-MYC-Amplifikation noch eine Chromosomendeletion del 1p36. SH-SY5Y ist ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH (11), (101). Die ursprüngliche Zelllinie wurde nach bereits erfolgter Therapie aus Knochenmarkmetastasen eines vierjährigen Mädchens gewonnen (10).

### SHEP

SHEP ist ebenfalls ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH und zeigt auch keine N-MYC-Amplifikation (8).

#### **2.2.5. Leukämie:**

Die Leukämien sind die häufigsten Tumoren bei Kindern und Jugendlichen. Sie machen fast die Hälfte aller bösartigen Krebserkrankungen des Kindesalters aus (65). Man unterscheidet sehr grob akute von chronischen Verlaufsformen sowie abhängig vom Ursprung der Tumorzellen lymphatische und myeloische Leukämien. Weitere Unterklassifizierungen existieren und sind wichtig für die weitere Therapieplanung. Essentiell für die Therapie ist eine Kombinations-Chemotherapie teilweise unter Zuhilfenahme der Strahlentherapie. Weitere Therapieformen sind Hochdosistherapiekonzepte und die allogene Stammzelltransplantation.

Die Fünfjahresüberlebensrate konnte bei den kindlichen Leukämien durch Verbesserung dieser Therapieansätze in den letzten zwei Jahrzehnten auf über 80% gesteigert werden (36).

### CCRF-CEM

Ursprünglich lag für diese Zelllinie ein Rezidiv einer T-ALL eines dreijährigen kaukasischen Mädchens zugrunde. Die Linie wurde aus dem peripheren Blut gewonnen und ist die erste etablierte Zelllinie einer T-ALL (30).

#### MOLT-4

MOLT-4 konnte aus den Blasten eines 19-jährigen Mannes mit einer T-ALL etabliert werden. Eine Schwesterzelllinie ist MOLT-3 (79).

#### REH

Leukämische Blasten eines 15 Jahre alten nordafrikanischen Mädchens mit einer B-Vorläufer ALL waren die Grundlage für diese Zelllinie. Es findet sich eine t(12;21) Translokation, die zur Fusion der Gene TEL und AML1 führt (100).

#### HL-60

Diese Zelllinie ist myeloischen Ursprungs und entstammt einer 35 Jahre alten Frau, die an einer AML FAB M2 erkrankt war (20), (23), (35).

### **2.2.6. Rhabdomyosarkom:**

Rhabdomyosarkome sind maligne Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Man unterscheidet sie histologisch weiter in alveoläre, pleomorphe (adulte) und embryonale Subtypen. Sie machen etwa 5% der kindlichen Tumoren aus (65). Bei Erwachsenen findet man sie selten. Neben der anzustrebenden totalen chirurgischen Exzision besitzt die Chemotherapie ihren Stellenwert in der Therapie, z.B. als neoadjuvante Therapie, um eine chirurgische Therapie mit dem Ziel einer kompletten Resektion überhaupt erst zu ermöglichen.

#### RH-30

RH-30 konnte aus einer Knochenmarkmetastase eines alveolären Rhabdomyosarkom eines 17-jährigen Jungen etabliert werden. Die Zellen tragen eine p53-Mutation sowie eine t(2;13) Translokation, welche für das PAX3/FKHR – Fusionsprotein codiert (26), (39).

#### RD

Diese Zelllinie wurde aus einem embryonalen Rhabdomyosarkom eines sieben Jahre alten kaukasischen Mädchens isoliert (76).

### **2.3. Grundlagen der Zellkulturtechnik:**

#### **Zellkulturbedingungen**

Mit Ausnahme der leukämischen Zelllinien wuchsen alle anderen adhärent auf dem Boden der Zellkulturflaschen. Für die zuletzt genannten war daher vor einer Passage oder Beimpfung auf 96-Lochplatten eine vorherige Ablösung mit Trypsin/EDTA notwendig. Als spezielle Adhäsionshilfe benötigten Ewing-Sarkom-Zelllinien zuvor mit Collagen beschichtete Zellkulturflaschen.

Die Zellkultur erfolgte unter sterilen Kautelen im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

Als Medium wurde für alle Zelllinien, die Rhabdomyosarkome ausgenommen, RPMI 1640-Medium (Gibco®, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008, USA) mit 10% Zusatz von fetalem Kälberserum verwendet sowie ein Zusatz von Amphotericin B und Streptomycin zur mikrobiologischen Infektionsprophylaxe. Für die Rhabdomyosarkome wurde D-MEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit GlutaMax (Gibco®, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008, USA) gebraucht.

Die Pflege und Behandlung der Zellkulturen wurde gemäß der laborinternen Standardanweisungen (SOP-Zellkultur 1) der Arbeitsgruppe „Klinische Pharmakologie“ aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie durchgeführt (s. Anlage).

#### **Coating für die Ewing-Sarkom-Zelllinien:**

Für die Ewing-Sarkom-Zelllinien waren bestimmte Kulturbedingungen nötig. Um eine ausreichende Adhärenz der Zellen zu gewährleisten, mussten die Kulturflaschen zunächst mit Kollagen beschichtet werden, d.h. sie mussten einem „coating“ unterzogen werden.

Dazu wurden ca. 1,6 ml Kollagen, welches aus Rattenschwänzen gewonnen wurde, in ca. 48,4 ml Essigsäure gelöst. Unter sterilen Bedingungen wurden dann ca. 1,5 ml der Lösung in jede Zellkulturflasche gefüllt. Die für die Versuche benötigten 96-Lochplatten wurden mit jeweils 50 µl pro Vertiefung gefüllt. Schließlich trockneten die Kulturflaschen und die Lochplatten für zwei Tage in der eingeschalteten Werkbank. Überstände wurden steril

abgesaugt. Um eine mögliche mikrobielle Kontamination auszuschließen, wurde eine leere Flasche für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Waren keine augenscheinlichen Verunreinigungen aufgetreten, konnten die Flaschen und Lochplatten verwendet werden.

### **Passagieren und Teilen der Zellkulturen:**

Die Zellen wurden in 25 cm<sup>3</sup>-Flaschen gezüchtet. Verfärbte sich der Indikator Phenolrot des jeweiligen Mediums oder zeigte sich ein dichter Zellrasen im Mikroskop, wurden die Zellen passagiert.

Bei den adhärent wachsenden Zellen wurde dazu zunächst das Medium abgesaugt und daraufhin der gesamte Flaschenboden mit einer Trypsinlösung zur Adhäsiolyse benetzt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das Trypsin abgesaugt, eventuelle Reste mit Medium neutralisiert und die Zellen resuspendiert.

Je nach Dichte des Zellrasens konnten die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen in neue Flaschen überführt werden.

Für die in Suspension wachsenden Leukämiezellen war der vorherige Adhäsiolysevorgang mit Trypsin nicht notwendig. Diese Zellkulturen konnten sofort in neue Kulturflaschen überführt werden.

Nach maximal 20-25 Passagen wurden die Zellkulturen verworfen (s. Anhang, Kapitel 7).

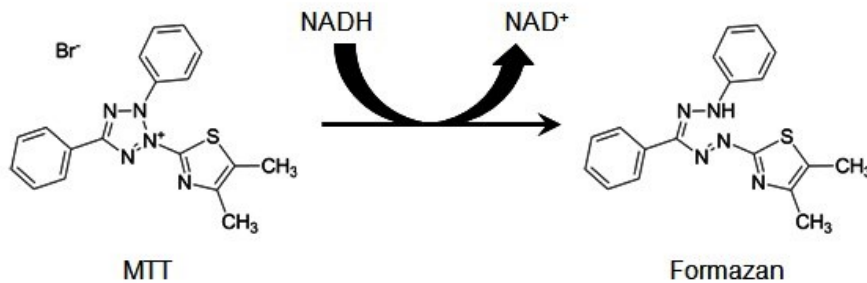
### **Das Beimpfen der Platten:**

Für die Versuche wurden die Zellen auf 96-Lochplatten beimpft. Als optimale Zellzahl pro Vertiefung (Well) wurde eine Zellzahl von 5000/μl Kulturlösung angenommen. Dazu wurden die Zellen einer Zellkulturflasche in ein Falcon-Tube® überführt, zentrifugiert, mit etwas Medium resuspendiert und somit konzentriert, um sie dann in einem Zellzählgerät (Casy® 1, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) auszuzählen. Jede Zählung erfolgte dreimalig. Es wurde jeweils der Mittelwert verwendet (s. Kapitel 2.9).

Die beimpften Platten wurden für 72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, um ein ausreichendes Anwachsen bzw. eine hinlängliche Adhärenz zu gewährleisten. Danach wurden die Testsubstanzen zugegeben (s. Kapitel 2.9.).

### 2.4. MTT-Assay:

Für die Überprüfbarkeit des Wachstumsverhaltens der Zellkulturen ohne bzw. mit Zusatz von zytotoxischen Substanzen wurde ein MTT-Test zu definierten Zeitpunkten während der Versuche durchgeführt.



**Abb. 6:** Illustration der Umwandlung des gelben MTT durch mitochondriale Reduktasen in das violette Formazan (89)

Ein MTT-Test ist ein standardisierter colorimetrischer Test zur Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Enzyme. Vitale Zellen können den gelben Farbstoff 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid zu violetten Formazan-Kristallen reduzieren (82). Durch das gebildete Formazan kann folglich ein Rückschluss auf verbliebene vitale Zellen im Kulturansatz gezogen werden (21).

Die Auswertung erfolgt durch eine Spektrophotometrie bei Wellenlängen von 500-650 nm. Bei dem für diese Arbeit verwendeten Gerät, einem Photometer für 96-Lochplatten (Multiskan Ascent von Thermo Fisher Scientific Inc., 81 Wyman Street, Waltham, MA 02454, USA), wurde als Referenzwellenlänge 650 nm und für die Auslesung der Proben eine Wellenlänge von 570 nm gewählt.

Auf diese Weise kann man die Formazan-Bildung unbehandelter Zellen gegenüber mit Zellgiften behandelten Zellkulturen messen und aus diesen Werten Dosis-Wirkungskurven erstellen.

**Durchführung des MTT-Assays:**

1. Beimpfen einer 96-Well-Platte mit etwa 5000 Zellen pro Well (s. Kapitel 2.9.)
2. 10µl-MTT-Lösung auf das jeweilige Well impfen
3. dreistündiges Inkubieren der Platte bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>
4. Absaugen der Wells, Formazan-Kristalle bleiben zurück
5. 100µL-Lyse-Reagenz zur Lösung der Kristalle auf das jeweilige Well geben
6. Platte für 15 min auf eine Schüttelplatte bei 600 Schüttelmanövern/Minute stellen, um eine gleichmäßige Resuspension zu ermöglichen
7. Auslesen der Platte bei 570 nm im Spektrophotometer

**2.5. RNA-Isolierung:**

Aus den verschiedenen Zelllinien wurde RNA isoliert, um der Frage nachzugehen, ob besonders für die Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II sensible Tumoren höhere Expressionsraten für Aurorakinasen besitzen als weniger sensible und damit der Höhe des Expressionslevels eine wichtige Bedeutung für die Wirkung der getesteten Substanzen zukommt.

Für die RNA-Isolierung wurde das QIamp-RNA-Kit von Quiagen (Quiagen GmbH, 40724 Hilden, Deutschland) verwendet.

Zur Vorbereitung für diese Versuche wurde jeweils ein Zellpellet jeder Zelllinie durch Überführen der jeweiligen Zellkultur in ein Falcon-Tube® und anschließende Zentrifugation hergestellt. Diese Zellpellets wurden für die weitere Verwendung zunächst bei -80°C eingefroren und gelagert. Dadurch sollte eine verfrühte Degredation der RNA durch zelleigene RNAsen verhindert werden.

Die Aufreinigung der RNA verlief unter sterilen Bedingungen über eine Säulenchromatographie, nachdem die Zellen zuvor mit 14,5 M β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Die Zugabe einer DNase-Lösung sollte eine spätere Verunreinigung mit DNA verhindern.

Die RNA-Isolation geschah gemäß den Benutzeranweisungen (QIAamp® RNA Blood Mini Handbook, Quiagen GmbH, 40724 Hilden, Deutschland, Version von Januar 1999) und für jede Zelllinie zweimalig.



Als Qualitätssicherung bzw. Quantifizierung der isolierten RNA dienten Extinktionsmessungen im Photometer (2100-Bioanalysator von Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260\text{nm}$  (basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, verantwortlich dafür sind die aromatischen Ringe der Basen) und bei  $\lambda=280\text{nm}$  (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste). Ein Verhältnis von  $A(260\text{nm})/A(280\text{nm})$  von 1,6-1,9 zeigte einen hohen Reinheitsgrad der RNA an.

### **2.6. Real-Time-PCR:**

Intention und damit grundsätzliche Fragestellung für diesen Versuch war, ob die besonders sensibel auf die Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II reagierenden Zelllinien mehr Aurorakinase exprimieren als die weniger sensiblen Zelllinien.

Dazu wurde die auf ihren Reinheitsgrad mittels Photometrie überprüfte und in cDNA umgeschriebene RNA (s. Kapitel 2.5.) extern mittels Real-Time-PCR im Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Münster vervielfältigt.

Für die Versuche wurde das Taq-Man<sup>®</sup> Gene Expression Assay der Firma Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, Ca 94404 USA) genutzt.

### **Grundlagen der Real-Time-PCR**

Um eine Aussage über den Grad der Expression bestimmter Gene, in diesem Fall der Gene für die Aurorakinasen, gewinnen zu können, wurde die Konzentration der entsprechenden Gentranskripte – die mRNA - gemessen. Dazu wurde zunächst die mRNA der in Frage kommenden Gene isoliert (s. Kapitel 2.5.) und diese in einem weiteren Schritt mittels einer spezifischen DNA-Polymerase, der Reversen Transskriptase, in einen DNA-Strang, die „complementary DNA“ (cDNA), überführt. Diese cDNA stand dann im zweiten Schritt für eine PCR zu Verfügung. Auf diese Art wurden nur diejenigen DNA-Abschnitte vervielfältigt, die auch momentan aktiv waren, d.h. exprimiert wurden (69).

Bei der Durchführung der Real-Time-PCR ist auf eine strenge Kontaminations-Prophylaxe mit Fremd-DNA zu achten. Bereits geringe Mengen von Erbsubstanz an der Hand des Experimentators können zu einer unerwünschten Amplifikation eigener DNA

führen. Daher muss streng steril gearbeitet werden.

Zur Vorbereitung der PCR muss, wie oben beschrieben, zuvor RNA aus den Tumorzelllinien isoliert werden (s. Kapitel 2.5.). Dem RNA-Isolat wird zum Schutz vor Selbstverdauung durch körpereigene Nukleasen ein RNA-Inhibitor sowie ein Puffer zugesetzt. Die RNA-Konzentration der Probe sollte zwischen 0,0002 und 0,2 µg/µl betragen. Der Anteil genomischer DNA sollte niedriger als 0,005% sein.

Die Real-Time-PCR besitzt Limitationen aufgrund ihrer Wirkungsweise. Es werden nur Fragmente bis zu 200 Basenpaaren vervielfältigt. Gerade für die Amplifikation viel größerer DNA-Transkripte ergibt sich dadurch häufig ein verzerrtes Ergebnis für die quantitative Auswertung. So werden auch kleine mRNA Fragmente, die z.B. durch RNAsen aus dem eigentlich vollständigen Transkript entstanden sind, durch die Real-Time-PCR vervielfältigt. Dadurch kann die eigentliche Menge an schließlich nicht nur transkribierter, sondern auch translatierter mRNA vollkommen falsch wiedergegeben werden.

Bei einer konventionellen PCR schließen sich bis zu 40 Zyklen an, in denen in einem ersten Schritt zunächst nur wenige Basen lange, spezifische DNA-Abschnitte, sogenannte Primer an den DNA-Elternstrang angelagert werden. Danach kann eine DNA-Replikation durch zugesetzte DNA-Polymerasen erfolgen. Der neu entstandene Doppelstrang dissoziiert bei Temperaturen über 96°C in zwei Tochterstränge, nach rascher Abkühlung des Probenansatzes kann sich der Primer erneut anlagern und es können wiederum DNA-Abschnitte repliziert werden. Auf diese Art können schon nach 40 Zyklen milliardenfache Kopien eines einzelnen DNA-Stranges hergestellt werden.

Für die PCR werden besonders hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, die bei Erwärmung des Probenansatzes nicht denaturieren, z.B. von dem an heißen Unterseequellen lebenden Bakterium *Thermophilus aquaticus*.

Eine Besonderheit der Real-Time-PCR ist die Möglichkeit zur quantitativen Auswertung der Expression von Genen zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus. Denn zum Probenansatz werden zusätzlich kleine spezifische DNA-Fragmente beigefügt, die komplementär zu dem zu vervielfältigenden cDNA Strang sind (TaqMan®-Sonden, bestehend aus einem Oligonucleotid mit einem „Quencher“ und einem Reporterteil). Sie können mit den DNA-Strängen an definierten Basenabfolgen hybridisieren. Diese Oligonucleotide werden bei der DNA-Replikation durch die Nukleaseaktivität der über den DNA-Strang laufenden DNA-Polymerase freigesetzt. Ein Teil des Schnipsels erzeugt am 5'-Ende (Reporter) bei räumlicher Trennung vom sich am 3'-Ende des DNA-Stranges befindlichen „Quencher“-

Teil ein Fluoreszenzsignal, das mit steigender Amplifikation anwächst. Die steigende Fluoreszenz der Probe gibt somit einen Hinweis auf die Menge des replizierten Zielabschnittes.

Der DNA-Schnipsel wird nur dann gespalten, wenn er zuvor mit der Zielregion hybridisieren konnte. So wird verhindert, dass nicht spezifisch-amplifizierte DNA-Stränge die Stärke der Fluoreszenz beeinflussen (69).

### **Durchführung der Real-Time-PCR**

In einem ersten Schritt der PCR wurde daher die zunächst einsträngige cDNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase in eine zweisträngige DNA übergeführt. Für verschiedene DNA-Abschnitte stehen kommerziell verfügbare Primer zur Verfügung, so dass nur im Fokus des Interesses stehende Gen-Transkripte vervielfältigt werden können. Andere DNA-Abschnitte werden auf diese Weise nicht vervielfältigt.

Die Herstellung der cDNA aus der zuvor isolierten RNA geschah mittels des *High-Capacity cDNA Archive Kit Protocol* gemäß Benutzeranweisungen (PN 4322169, Applied Biosystems).

Für die Versuche wurde die Expression der AURKA und AURKB untersucht. Hierfür standen kommerzielle Primer zur Verfügung. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH durchgeführt; außerdem wurden Negativkontrollen mit reinem Wasser mitgeführt. Die cDNA-Proben wurden jeweils zweimalig angesetzt und analysiert.

Die eigentliche Real-Time-PCR wurde extern im Zentrallabor des Uniklinikums Münster gemäß Benutzeranweisungen (TaqMan® Gene Expression Assays Protocol, Part Number 4333458 Rev. E, Applied Biosystems, 2004) durchgeführt. Dabei konnten die PCR-Daten durch die Sequence Detection Software (SDS2.2, Applied Biosystems) erfasst und ausgewertet werden.

### **2.7. Western Blot:**

Neben der Real-Time-PCR wurde aufgrund der oben beschriebenen Limitationen zur genaueren quantitativen Erfassung der letztendlich durch die Zellen produzierten Proteinmenge an Aurora A und Aurora B für jede Zelllinie ein Western Blot durchgeführt.

#### **Wirkungsweise des Western Blots:**

Ein Western Blot dient der Auftrennung eines Proteingemisches in unterschiedliche Fraktionen und der anschließenden Identifikation der Proteine (95), (117). Das Proteingemisch wird dafür auf eine Trägermatrix, i.d.R. Polyacrylamid, gegeben. Senkrecht dazu wird ein elektrisches Feld angelegt. Die im Gemisch enthaltenen Proteine wandern dann gemäß ihrer Größe und Ladung über das Gel und können daraufhin in verschiedene Banden aufgeteilt auf eine Membran übertragen werden (Blotting genannt, z.B. auf Nitrocellulose).

Hiernach sind die Proteinbanden für eine Immundetektion über spezifische, kommerziell erwerbliche Antikörper zugänglich. So können gezielt einzelne Proteine einer Lösung detektiert werden. In einem weiteren Schritt wird eine zweite Antikörperlösung auf die Probe gegeben. Diese bindet spezifisch den Fc-Teil des ersten Antikörpers. Der zweite Körper kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen werden, um die gebundenen Proteine sichtbar zu machen und quantitativ auszuwerten.

In der Medizin hat der Western Blot weite Anwendung gefunden, z.B. beim Nachweis multipler Antikörper im Patientenserum (Serologie).

### 2.8. Herstellung der Verdünnungsreihen:

Die Tumorzelllinien wurden unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika ausgesetzt. Dazu wurden die Testsubstanzen gemäß Herstellerangaben in nicht-toxischen Lösungsmitteln gelöst, die Testlösungen wurden dann mit Zellkulturmedium weiter verdünnt.

Weiterhin wurde jeweils eine Mischung des Aurora-Kinaseinhibitors II mit Vincristin und in einem zweiten Ansatz mit Paclitaxel in den unten genannten Konzentrationen hergestellt. In den Kombinationsversuchen wurden die Substanzen somit gleichzeitig und nicht in einer bestimmten Reihenfolge zu den Zelllinien gegeben. Es wurde also nicht untersucht, ob ggfs. die Reihenfolge der Applikation einen Einfluss auf die Chemosensitivität aufweist.

Zunächst wurden folgende Konzentrationen verwendet:

#### **Aurora-Kinaseinhibitor**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
50	10	5	1	0,5	0,1	0,05

#### **Vincristin**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
5	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,01

#### **Aurora-Kinaseinhibitor/Vincristin**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
50/5	10/1	5/0,5	1/0,1	0,5/0,05	0,1/0,01	0,05/0,01

Da jedoch nach den initialen Versuchen mit der Medulloblastom-Zelllinie UW228.2 und der Osteosarkomzelllinie OST keine  $GI_{50}$ -Werte für den Aurora-Kinaseninhibitor II dokumentiert werden konnten, wurden für die weiteren Versuche höhere Konzentrationen gewählt:

#### **Aurora-Kinaseinhibitor**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
100	50	10	5	1	0,5	0,1

#### **Vincristin**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001

**Paclitaxel**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
0,10	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001

Für die Versuche, in denen der Aurora-Kinaseinhibitor mit Vincristin bzw. Paclitaxel verwendet wurde, wurden nachstehende Konzentrationen ausgewählt.

**Aurora-Kinaseinhibitor/Vincristin**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
100/1	50/0,5	10/0,1	5/0,05	1/0,01	0,5/0,005	0,1/0,001

**Aurora-Kinaseinhibitor/Paclitaxel**

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]						
100/0,10	50/0,05	10/0,01	5/0,005	1/0,001	0,5/0,0005	0,1/0,0001

**2.9. Versuchsdurchführung:**

Vor Beginn der Versuche wurden die Zellkulturen aufgetaut und nach Benutzeranweisungen bzw. der gültigen SOP inkubiert sowie auf eine mögliche Kontamination durch Mycoplasmen getestet (s. Anhang, Kapitel 7).

Die Zelllinien wurden dann auf 96-Lochplatten beimpft. Es wurde eine optimale Zellzahl von 5000 pro einzelner Well angenommen (s. Kapitel 2.3). Die Zellen wurden in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension suspendiert. Daraufhin erfolgte über 72h zunächst eine Inkubation der Platten im Brutschrank bei 37°C und 5%-CO<sub>2</sub>-Konzentration, um die Zellen anwachsen zu lassen. Danach wurden die Zellen an dem als T=0 definierten Zeitpunkt mit 100 $\mu\text{l}$  der unterschiedlichen Testsubstanzen bzw. deren Kombination in aufsteigender Konzentration für weitere 72 h inkubiert. Für jede Konzentrationsstufe wurden jeweils vier Wells verwendet (s. Abb. 7). Daneben wurde eine Reihe lediglich mit 100 $\mu\text{l}$  Kulturmedium beimpft, um später eine Aussage über das Wachstumsverhalten ohne mutmaßliche Beeinflussung durch die Testsubstanzen treffen zu können (s. Abb. 7). Zu dem als T=0 definierten Zeitpunkt wurde darüber hinaus eine Platte, die als Nullprobe diente, mittels eines MTT-Assays auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Später gewonnene Daten aus den mit den Testsubstanzen inkubierten Platten konnten auf diese

Nullprobe zurückgerechnet werden. Nach 72 h Bebrütung mit den Testsubstanzen erfolgte mit Hilfe eines MTT-Assays eine Auswertung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien auf den einzelnen Platten (s. Kapitel 2.4.).

		Testsubstanz 1				Testsubstanz 1 + Testsubstanz 2				Testsubstanz 2			
		C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0	C0
<b>Konzentration der Testlösungen</b>	C1	C1	C1	C1	C1	C1 <sub>Lsg.1</sub> +	C1 <sub>Lsg.1</sub> +	C1 <sub>Lsg.1</sub> +	C1 <sub>Lsg.1</sub> +	C1	C1	C1	C1
						C1 <sub>Lsg.2</sub>	C1 <sub>Lsg.2</sub>	C1 <sub>Lsg.2</sub>	C1 <sub>Lsg.2</sub>				
	C2	C2	C2	C2	C2	C2 <sub>Lsg.1</sub> +	C2 <sub>Lsg.1</sub> +	C2 <sub>Lsg.1</sub> +	C2 <sub>Lsg.1</sub> +	C2	C2	C2	C2
						C2 <sub>Lsg.2</sub>	C2 <sub>Lsg.2</sub>	C2 <sub>Lsg.2</sub>	C2 <sub>Lsg.2</sub>				
	C3	C3	C3	C3	C3	C3 <sub>Lsg.1</sub> +	C3 <sub>Lsg.1</sub> +	C3 <sub>Lsg.1</sub> +	C3 <sub>Lsg.1</sub> +	C3	C3	C3	C3
						C3 <sub>Lsg.2</sub>	C3 <sub>Lsg.2</sub>	C3 <sub>Lsg.2</sub>	C3 <sub>Lsg.2</sub>				
	C4	C4	C4	C4	C4	C4 <sub>Lsg.1</sub> +	C4 <sub>Lsg.1</sub> +	C4 <sub>Lsg.1</sub> +	C4 <sub>Lsg.1</sub> +	C4	C4	C4	C4
						C4 <sub>Lsg.2</sub>	C4 <sub>Lsg.2</sub>	C4 <sub>Lsg.2</sub>	C4 <sub>Lsg.2</sub>				
C5	C5	C5	C5	C5	C5 <sub>Lsg.1</sub> +	C5 <sub>Lsg.1</sub> +	C5 <sub>Lsg.1</sub> +	C5 <sub>Lsg.1</sub> +	C5	C5	C5	C5	
					C5 <sub>Lsg.2</sub>	C5 <sub>Lsg.2</sub>	C5 <sub>Lsg.2</sub>	C5 <sub>Lsg.2</sub>					
C6	C6	C6	C6	C6	C6 <sub>Lsg.1</sub> +	C6 <sub>Lsg.1</sub> +	C6 <sub>Lsg.1</sub> +	C6 <sub>Lsg.1</sub> +	C6	C6	C6	C6	
					C6 <sub>Lsg.2</sub>	C6 <sub>Lsg.2</sub>	C6 <sub>Lsg.2</sub>	C6 <sub>Lsg.2</sub>					
C7	C7	C7	C7	C7	C7 <sub>Lsg.1</sub> +	C7 <sub>Lsg.1</sub> +	C7 <sub>Lsg.1</sub> +	C7 <sub>Lsg.1</sub> +	C7	C7	C7	C7	
					C7 <sub>Lsg.2</sub>	C7 <sub>Lsg.2</sub>	C7 <sub>Lsg.2</sub>	C7 <sub>Lsg.2</sub>					

**Abb. 7:** Darstellung der Belegung einer 96-Lochplatte (Mikrotest Platte, Falcon – Becton Dickinson Labware, USA)

Erklärung:

C0 = Zellkulturmedium ohne Zusatz der Testsubstanz

C1-C7 = Substanzkonzentrationen in aufsteigender Reihenfolge, C1<C2<C3<C4<C5<C6<C7

### 2.10. Datenverarbeitung:

Für jeden Versuch wurden jeweils drei Ansätze durchgeführt. Innerhalb jeden Ansatzes wurden für jede Konzentrationsstufe jeweils vier Messwerte erhoben (s. Abb. 7). Da der Aurora-Kinaseinhibitor jeweils in den Testreihen mit Paclitaxel und Vincristin koinkubiert wurde (als Testsubstanz 1, s. Mikrotest-Plattenbelegung, Abb.7), liegen für die Testungen mit dem Aurora-Kinaseinhibitor allein sogar sechs Versuchsansätze vor. Aus diesen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der Variationskoeffizient, der GI<sub>50</sub>- und der LC<sub>50</sub>-Wert errechnet. Sowohl die Datensammlung als auch die Datenverarbeitung erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel von Microsoft

(Microsoft Deutschland GmbH, 85716 Unterschleißheim), die graphische Darstellung sowie die statistischen Tests durch das Programm Sigma Plot 11 (Systat Software GmbH, 40699 Erkrath).

Die PCR-Daten wurden durch die Sequence Detection Software (SDS2.2, Applied Biosystems) erfasst und ausgewertet.

Für die spätere Beurteilung einer möglichen Wirksamkeit der unterschiedlichen Testsubstanzen wurden der GI<sub>50</sub>- und der LC<sub>50</sub>-Wert herangezogen.

### **GI<sub>50</sub>-Wert:**

Der GI<sub>50</sub>-Wert (= Growth inhibition of 50%) wird an derjenigen Stelle der Wachstumskurve ermittelt, an der im Vergleich zum jeweiligen Messpunkt aus der Wachstumskurve der unbehandelten Zellen (s.2.9.) eine 50%ige Wachstumshemmung über den Beobachtungszeitraum auftritt. Die Bestimmung erfolgt entweder graphisch oder rechnerisch:

Ausgehend von der Geradengleichung in logarithmischer Form

$$1.) y = m \cdot \log(x) + b$$

kann die Steigung m zwischen zwei Punkten (y<sub>1</sub>/y<sub>2</sub> und x<sub>1</sub>/x<sub>2</sub>) errechnet werden:

$$2.) m = \frac{dy}{d \log(x)}$$

Der GI<sub>50</sub>-Wert ist derjenige, bei dem y den Wert 50 annimmt. Daraus ergibt sich mit den Umstellungen aus 1.) und 2.)

$$3.) GI_{50} = 10^{\log(x_1) - \frac{y_1 - y_{50}}{y_1 - y_2} \cdot [\log(x_1) - \log(x_2)]}$$

### **LC<sub>50</sub>-Wert:**

Beim LC<sub>50</sub>-Wert wird die 50%ige Reduktion des Wachstumsverhalten im Vergleich zum Zeitpunkt T=0 dargestellt. Der LC<sub>50</sub>-Wert wird logarithmisch ermittelt.

Für die spätere Darstellung der Ergebnisse wird sich im Wesentlichen auf den GI<sub>50</sub>-Wert bezogen, da er ein besseres biologisches Äquivalent darstellt. In die statistische Auswertung ist der LC<sub>50</sub>-Wert aber jeweils mit eingeflossen. Daten zu den LC<sub>50</sub>-Werten finden sich im Anhang (Kapitel 7).

### **Dosis-Wirkungs-Kurven:**

Für die Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde eine logarithmische Form



gewählt. Anhand der Ordinaten lässt sich das relative Wachstum bezogen auf das Wachstum der unbehandelten Zellen ablesen, anhand der Abszissen die jeweilige Testkonzentration in  $\mu\text{M}$ . Als Testpunkte wurden jeweils die Mittelwerte aus den für jeden Ansatz durchgeführten Messungen mit den Standardabweichungen als senkrechte Balken aufgetragen.

### Kombinations-Index:

Die zytotoxischen Effekte der Testsubstanzkombinationen bezüglich möglicher synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte wurden nach Chou und Talaly berechnet (19). Werte  $<0,9$  wurden als synergistisch, Werte von  $0,9-1,1$  wurden in der jeweiligen Kombination als additiv und  $>1,1$  als antagonistisch erachtet.

Es existieren weitere Abstufungen:

<b>CI-Bereich:</b>	<b>Bedeutung:</b>
$<0,1$	sehr starker Synergismus
$0,1-0,3$	starker Synergismus
$0,3-0,7$	Synergismus
$0,7-0,85$	mäßiger Synergismus
$0,85-0,9$	schwacher Synergismus
$0,9-1,1$	additive Wirkung
$1,1-1,2$	schwacher Antagonismus
$1,2-1,45$	mäßiger Antagonismus
$1,45-3,3$	Antagonismus

Die Werte wurden anhand des Median-Effekts nach folgender Gleichung berechnet (19):

$$\text{CI} = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} + \alpha \frac{(D)_1(D)_2}{(Dx)_1(Dx)_2}$$

Erklärung zur Formel:

(D): Dosis; (D)<sub>1</sub>: Dosis von Substanz 1, die eine Inhibition von x in Kombination mit Substanz 2 bedingt; (D)<sub>2</sub>: Dosis von Substanz 2, die eine Inhibition von x in Kombination mit Substanz 1 bedingt; (D<sub>x</sub>)<sub>1</sub>: Dosis von Substanz 1, die eine Inhibition von x als Einzelsubstanz bedingt; (D<sub>x</sub>)<sub>2</sub>: Dosis von Substanz 2, die eine Inhibition von x als Einzelsubstanz bedingt;  $\alpha=1$ , falls die Wirkmechanismen der beiden Substanzen sich unterscheiden (non-exklusiv), sonst gilt  $\alpha=0$  (exklusiv) (19)

### Reproduzierbarkeit der Ergebnisse:

Im Allgemeinen arbeitet man mit Populationen von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen können

schwanken, weshalb insbesondere bei phasenspezifischen Testsubstanzen die Wirksamkeit beeinflusst werden kann (s. Kapitel 4.3.). Nach dem Aussiedeln der Zellen wurden diese zuerst 72 h inkubiert, bevor die Testsubstanzen zugegeben wurden, damit speziell die adhärennten Zellen nach dem Aussiedeln wieder anwachsen und in die Proliferationsphase übergehen konnten.

Doch auch wenn die Testsubstanzen zu den Zellen gegeben wurden, kann der Anteil der gut angewachsenen, proliferierenden Zellen zwischen den einzelnen Versuchen schwanken, ebenso die anteilige Verteilung der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen.

Hierdurch können Variabilitäten auftreten, so dass es unvermeidbar ist, die Versuche mehrfach zu wiederholen, um sicherzustellen, dass die erhobenen Ergebnisse reproduzierbar sind. Die einzelnen Versuche wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt. Insgesamt zeigte sich eine weitgehend gute Übereinstimmung der Werte (s. dazu die verschiedenen Wachstumskurven in Kapitel 3).

### **3. Ergebnisse:**

Im nachfolgenden Teil werden die Ergebnisse der Versuche am oben vorgestellten Zellpanel dargestellt. Die Auswertung der durchgeführten MTT-Assays sowie der Expressionsanalysen erfolgt im Weiteren getrennt nach den einzelnen Tumorentitäten bzw. den getesteten Substanzen.

Grundsätzlich zeigte sich ein sigmoider Verlauf der Wachstumskurven: Es musste zunächst eine bestimmte Substanzkonzentration auf die Zellen einwirken, um eine darstellbare toxische Wirkung auf diese zu erzielen. Bei weiter ansteigender Substanzkonzentration nahm die Wachstumshemmung zu und die Kurven fielen immer steiler ab, bis ein Sättigungseffekt eintrat. Ab diesem Punkt verliefen die Kurven nahezu horizontal, d.h. durch weitere Substanzkonzentrationserhöhung konnte kein weiterer Effekt bzgl. einer Wachstumshemmung mehr beobachtet werden. Die  $GI_{50}$ -Werte wurden jeweils als Hilfslinie mittels einer Parallelen zur Abszisse auf Höhe der 50%igen Wachstumshemmung, wie unter Kapitel 2.10. beschrieben, graphisch dargestellt.

Die Werte wurden jeweils als Mittelwerte dargestellt, zusätzlich die Standardabweichungen als senkrechte Balken über den jeweiligen Messpunkten. Für die graphische Darstellung wurde eine logarithmische Form gewählt. Für jede Konzentration wurden jeweils Messwerte aus drei verschiedenen Versuchsansätzen erhoben (s. Kapitel 2.10.). Weil der Aurora-Kinaseinhibitor II jeweils in den Testreihen mit Paclitaxel und Vincristin koinkubiert wurde, existieren für die Versuche mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II sogar Messwerte aus sechs Versuchsansätzen (s. Kapitel 2.10.).

Zusammenfassend werden danach die  $GI_{50}$ -Werte noch einmal für alle Tumorentitäten aufgelistet (s. Tabelle 4). Die numerische Angabe der  $GI_{50}$ -Werte erfolgt in nM aufgrund der besseren Vergleichbarkeit.

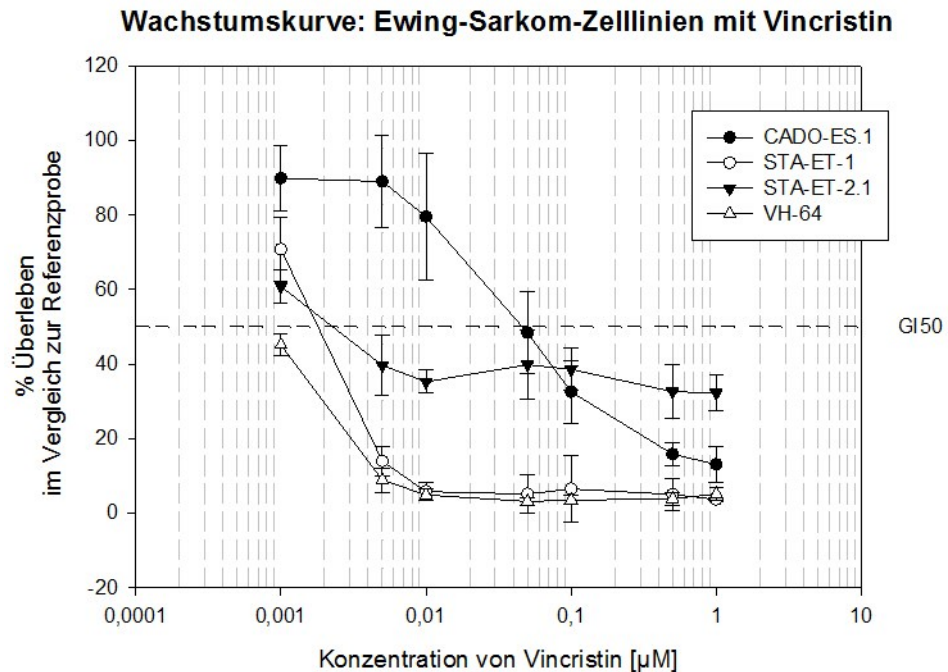
#### **3.1. Inkubation mit Vincristin:**

Zuerst werden die einzelnen Wachstumskurven der verschiedenen Tumorentitäten vorgestellt. Schließlich erfolgt zusammenfassend eine Gesamtansicht aller ermittelten  $GI_{50}$ -Werte für die mit Vincristin behandelten Zellen (s. Abb. 14).

**Ewing-Sarkom-Zelllinien:**

Bei allen Ewing-Sarkom-Zelllinien zeigte Vincristin eine gute Wirkung. Es ist eines der Standardmedikamente bei der chemotherapeutischen Behandlung des Ewing-Sarkoms (s. 1.3.2.). Bei VH-64 reduzierte bereits die niedrigste Vincristin Testkonzentration die Vitalität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mehr als 50%.

Die  $GI_{50}$ -Werte reichten von 0,91 nM für die besonders sensible Zelllinie VH64 bis zu einem Wert von 51,8 nM für die Zelllinie CADO-ES-1.



**Abb. 8:** Wachstumskurve der Ewing-Sarkom-Zelllinien unter Vincristingabe

**Leukämie-Zelllinien:**

Auch für verschiedene Leukämieformen im Kindesalter ist Vincristin ein Standardchemotherapeutikum (s. Kapitel 1.3.2.). Die Zelllinien zeigten sich daher besonders sensibel auf einen Zusatz von Vincristin zum Kulturmedium. Eine  $GI_{50}$  wurde bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen von Vincristin erreicht. Exemplarisch war die  $GI_{50}$  für die Zelllinie REH 0,42 nM und damit an Rang 1 im Vergleich zum Gesamtpanel. Die AML-Zelllinie HL-60 wies eine  $GI_{50}$  von 1,98 nM auf und war damit bereits diejenige, welche am wenigsten sensibel reagierte.

Insgesamt zeigten die Zelllinien unabhängig von ihrem Ursprung und genetischem Profil vergleichbare Toxizitätskurven unter Zugabe von Vincristin.

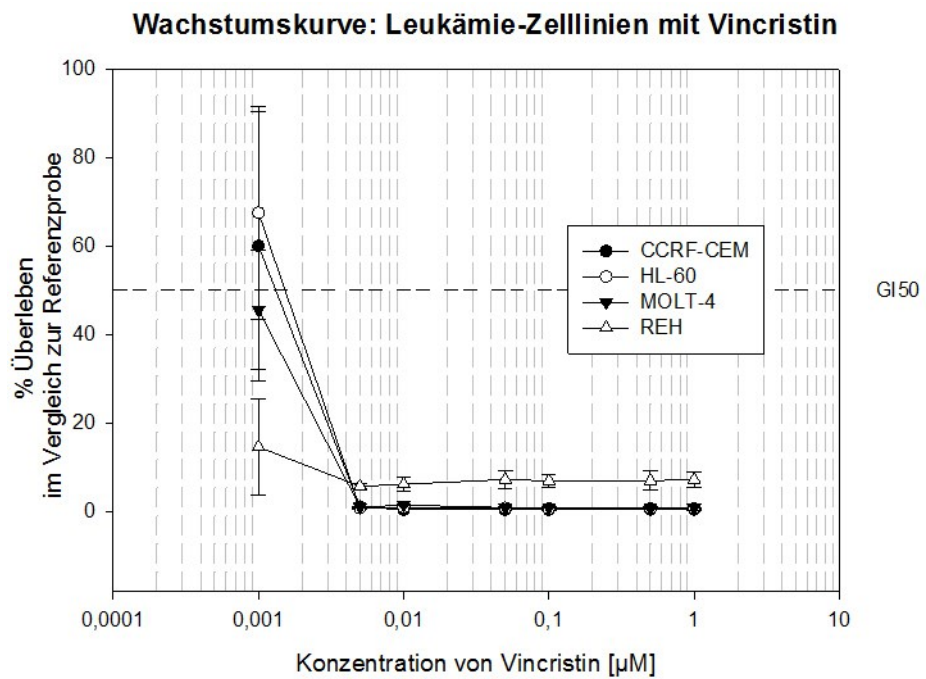


Abb. 9: Wachstumskurve der Leukämie-Zelllinien unter Vincristingabe

**Medulloblastom-Zelllinien:**

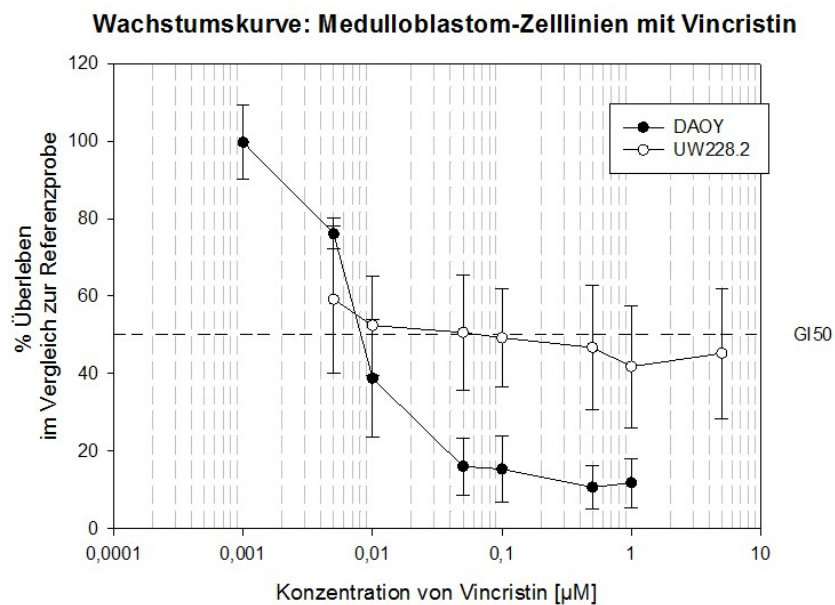
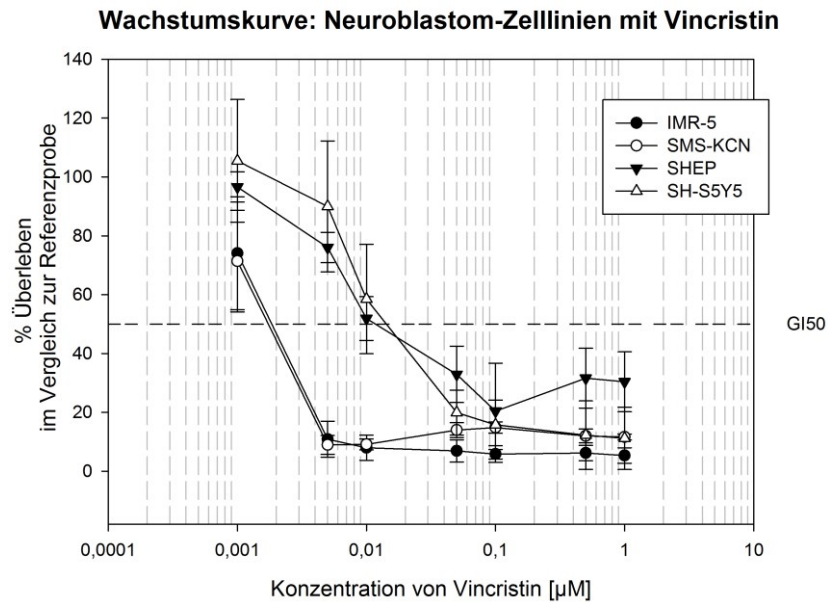


Abb. 10: Wachstumskurve der Medulloblastom-Zelllinien unter Vincristingabe

Die Zelllinie DAOY zeigte sich bei einer Koinkubation mit Vincristin relativ sensibel. Es wurde ein GI<sub>50</sub>-Wert von 8,59 nM erreicht. Die Zelllinie UW228.2 demonstrierte dagegen nur ein schlechtes Ansprechen. Für die Versuche mit der Zelllinie UW228.2 wurden höhere Vincristin-Konzentrationen verwendet (s. Kapitel 2.8.): Die minimale

Konzentration lag bei 0,005  $\mu\text{M}$ , die maximale bei 5  $\mu\text{M}$ . Ein  $\text{GI}_{50}$ -Wert konnte hier erst bei einer mittleren Vincristin-Konzentration von 366 nM ermittelt werden. Damit war UW228.2 die im Vergleich zum Gesamtpanel am wenigsten sensible Zelllinie bezüglich einer Exposition gegenüber Vincristin.

### Neuroblastom-Zelllinien:

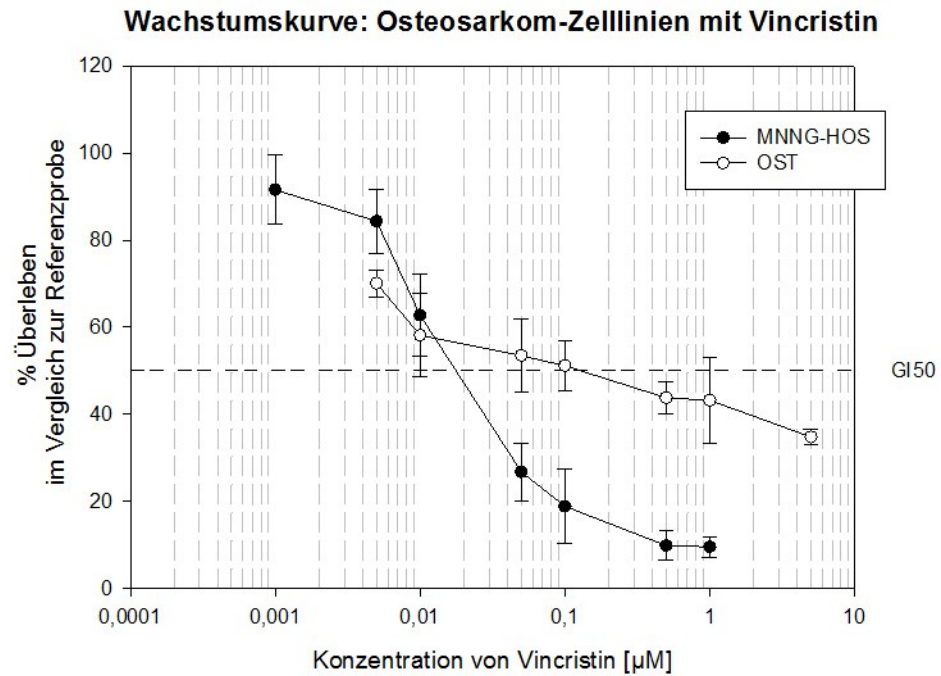


**Abb. 11:** Wachstumskurve der Neuroblastom-Zelllinien unter Vincristingabe

Alle Neuroblastom-Zelllinien zeigten eine deutliche Einschränkung ihres Wachstums unter Exposition mit Vincristin, welches in der Therapie des Neuroblastoms routinemäßig eingesetzt wird (s. Kapitel 1.3.2.). Die  $\text{GI}_{50}$ -Werte verteilten sich wie folgt:  $\text{GI}_{50}$  (IMR-5) 1,83 nM;  $\text{GI}_{50}$  (SMS-KCN) 2,22 nM;  $\text{GI}_{50}$  (SHEP) 14,8 nM;  $\text{GI}_{50}$  (SH-SY5Y) 26,3 nM.

### Osteosarkom-Zelllinien:

Die getesteten Osteosarkom-Zelllinien wiesen eine bezogen auf Vincristin unterschiedliche Sensibilität auf. Während sich die Zelllinie MNNG-HOS mit einem  $\text{GI}_{50}$ -Wert von 23,6 nM relativ sensibel zeigte, wurde bei der Zelllinie OST erst bei einer höheren Vincristin-Konzentration eine Hemmung des Wachstums beobachtet. Hier lag der  $\text{GI}_{50}$ -Wert bei 159 nM, welches Rang 17 im Gesamtpanel bedeutete bei allerdings hohen Standardabweichungen der Daten. Für die Zelllinie OST wurden höhere Vincristin-Konzentrationen (s. auch Kapitel 2.8.) verwendet. Die minimale Konzentration betrug 0,005  $\mu\text{M}$ , die maximale 5  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 12:** Wachstumskurve der Osteosarkom-Zelllinien unter Vincristingabe

### Rhabdomyosarkom-Zelllinien:

Die Rhabdomyosarkom-Zelllinien erwiesen sich beide auf eine Vincristingabe sehr sensibel und zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten. Daher lagen durch die logarithmische Darstellung die Kurvenanfänge bereits unterhalb der  $GI_{50}$ -Hilfslinie. Die  $GI_{50}$ -Werte lagen für die Zelllinie RD bei 0,88 nM und für RH-30 bei 1,16 nM. Vincristin ist ein Standardtherapeutikum in der Behandlung der Rhabdomyosarkome (s. Kapitel 1.3.2.).

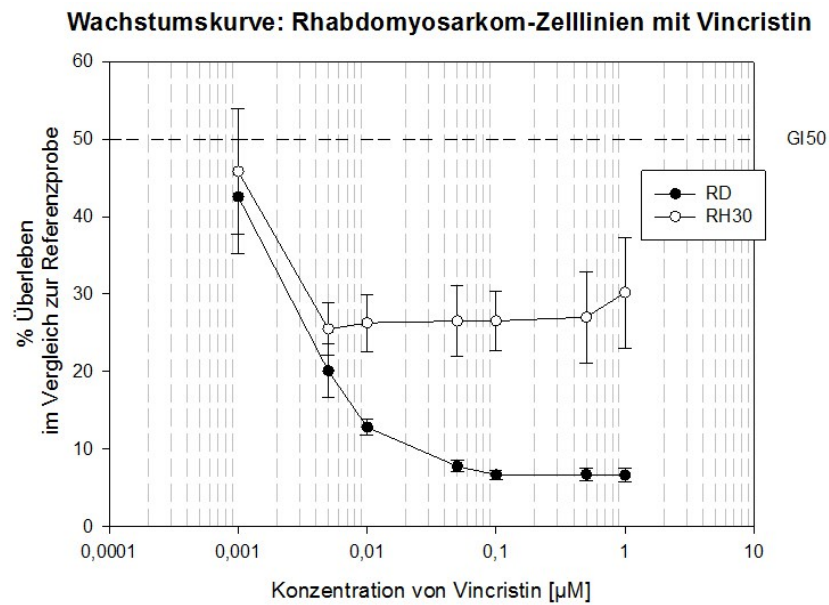


Abb. 13: Wachstumskurve der Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Vincristingabe

**Zusammenfassung der GI<sub>50</sub>-Werte:**

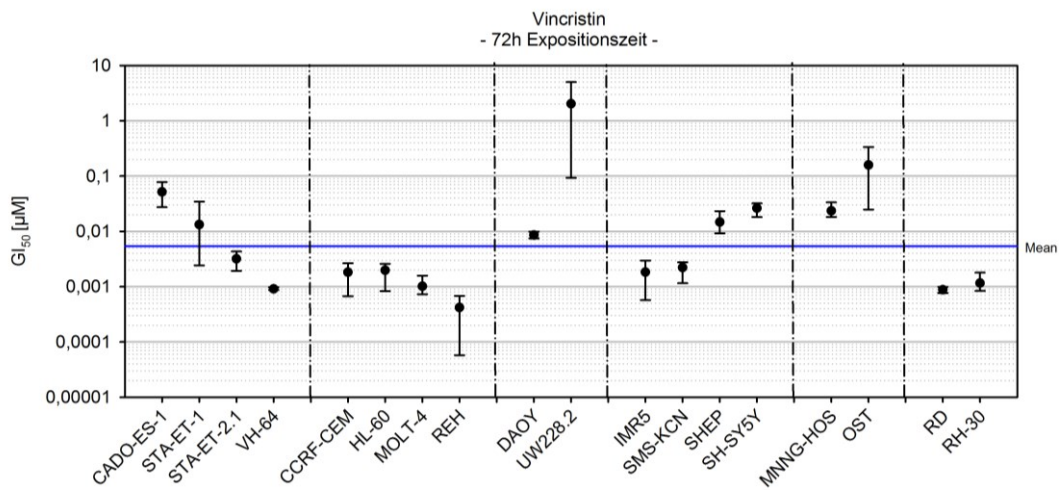


Abb. 14: GI<sub>50</sub>-Werte in logarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit Vincristin behandelten Zelllinien. Die schwarzen Punkte repräsentieren die gemessenen Mittelwerte der jeweiligen GI<sub>50</sub>-Werte für die einzelnen Zelllinien. Die senkrechten Linien geben die Streubreite der Werte an, der obere waagrechte Balken den höchsten gemessenen GI<sub>50</sub>-Wert, der untere waagrechte Balken den minimalen GI<sub>50</sub>-Wert. Als Hilfslinie ist der durchschnittliche Mittelwert („Mean“) aller GI<sub>50</sub>-Werte als blaue waagrechte Linie eingezeichnet.

Bei der Auswertung der GI<sub>50</sub>-Werte ist festzustellen (s. Abb. 14), dass ein besonders niedriger Wert eine erhöhte Sensibilität einer Zelllinie gegenüber der verwendeten Substanz zeigt, d.h. es tritt schon bei einer sehr niedrig gewählten Dosierung eine



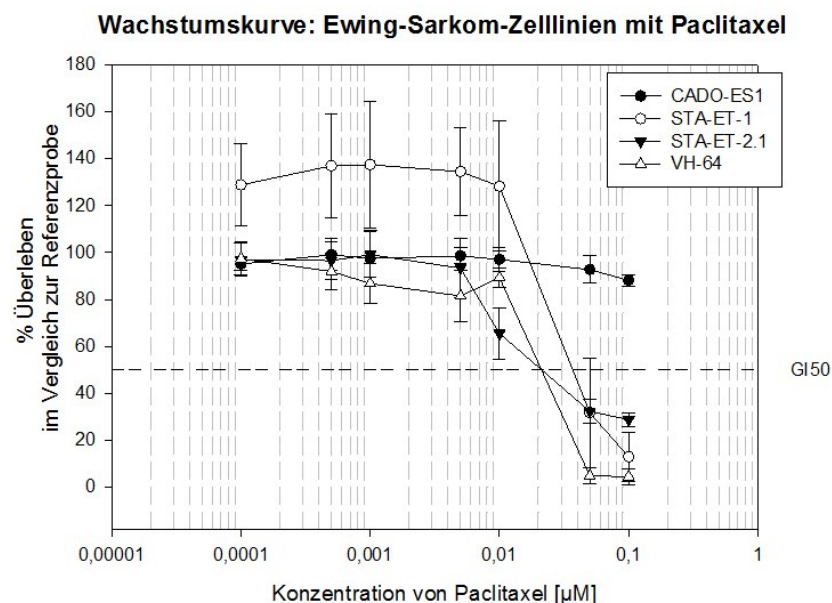
Wirkung auf. Zusätzlich markiert eine Hilfslinie parallel zur Abszisse den durchschnittlichen  $GI_{50}$ -Wert des Gesamtpanels. Zelllinien mit  $GI_{50}$ -Werten oberhalb dieser Geraden wurden im Vergleich zum Gesamtpanel der Zelllinien als relativ resistent gewertet, unterhalb dieser Geraden als relativ sensibel.

Es zeigte sich, dass Vincristin unterschiedlich auf die verschiedenen Zelllinien wirkte: Als besonders sensibel erwiesen sich die Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET-2.1 und VH64, sämtliche Leukämie-Zelllinien, die Neuroblastom-Zelllinien IMR-5 und SMS-KCN als auch die beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien (s. Abb. 14).

### 3.2. Inkubation mit Paclitaxel:

Nachfolgend werden die Wachstumskurven der verschiedenen Tumorentitäten nach Behandlung mit Paclitaxel vorgestellt. Die einzelnen graphisch abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die aus drei zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Versuchen gewonnen wurden (s. Einleitung zu Kapitel 3). Für die graphische Darstellung aller Kurven wurde eine logarithmische Form gewählt. Als Hilfslinie wurde wiederum der  $GI_{50}$ -Wert eingezeichnet.

#### Ewing-Sarkome:

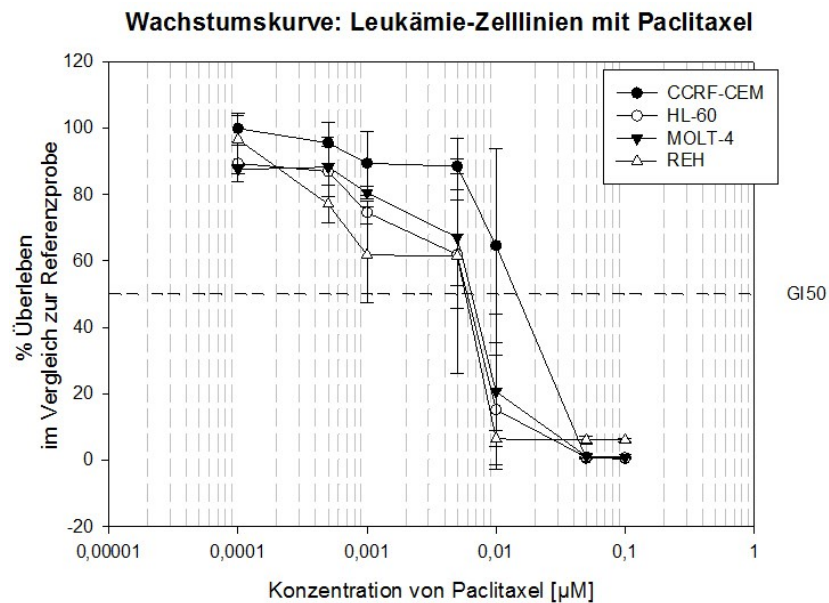


**Abb. 15:** Wachstumskurve der Ewing-Sarkom-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

Bei den Ewing-Sarkomzellen zeigte sich erst unter sehr hohen Dosen ein Ansprechen auf

eine alleinige Behandlung mit Paclitaxel ( $GI_{50}$  bei 45,2 nM für STA-ET-1, 27,4 nM STA-ET-2.1 und 28,6 nM für VH-64). Die Zelllinie CADO-ES-1 verhielt sich resistent gegenüber den gewählten Dosierungen. Es wurde keine  $GI_{50}$  erreicht.

### Leukämie-Zelllinien:

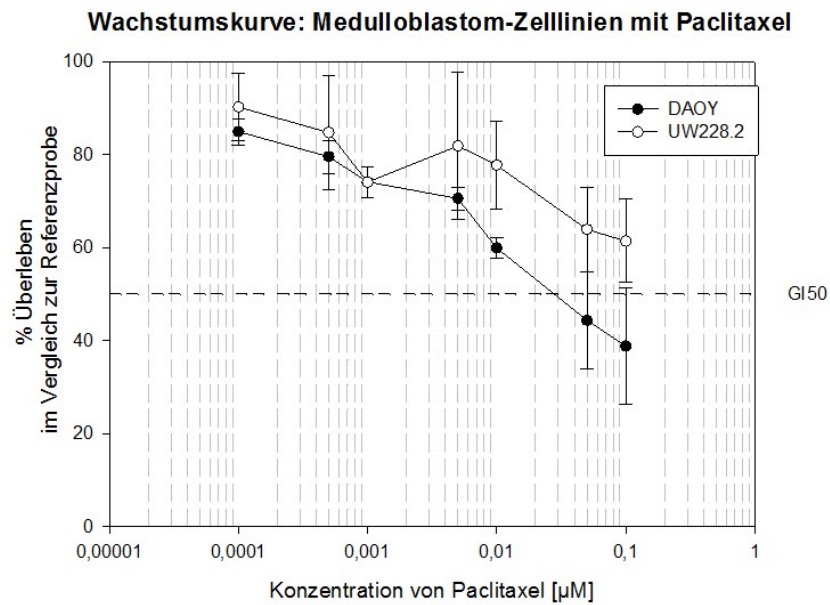


**Abb. 16:** Wachstumskurve der Leukämie-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

Die Leukämie-Zelllinien sprachen relativ gut auf eine Gabe von Paclitaxel an. Für alle Zelllinien zeigte sich eine ähnliche Abnahme des Wachstums bei höheren Paclitaxelkonzentrationen. Für die Zelllinie CCRF-CEM ergab sich ein  $GI_{50}$ -Wert von 19,3 nM, für die restlichen Kulturen  $GI_{50}$ -Werte von 4,95 – 7,12 nM.

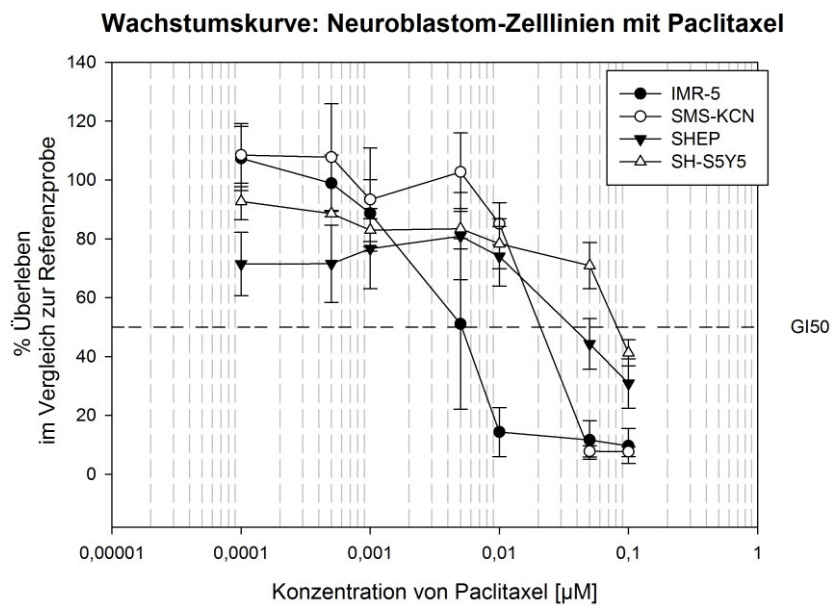
### Medulloblastom-Zelllinien:

Für die Medulloblastom-Zelllinien fiel bei der Mono-Behandlung mit Paclitaxel ein ernüchterndes Bild auf: Die Zelllinie UW228.2 verhielt sich resistent gegenüber den gewählten Konzentrationen, der  $GI_{50}$ -Wert der DAOY-Zellkulturen lag im Mittel bei 45,7 nM.



**Abb. 17:** Wachstumskurve der Medulloblastom-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

**Neuroblastom-Zelllinien:**

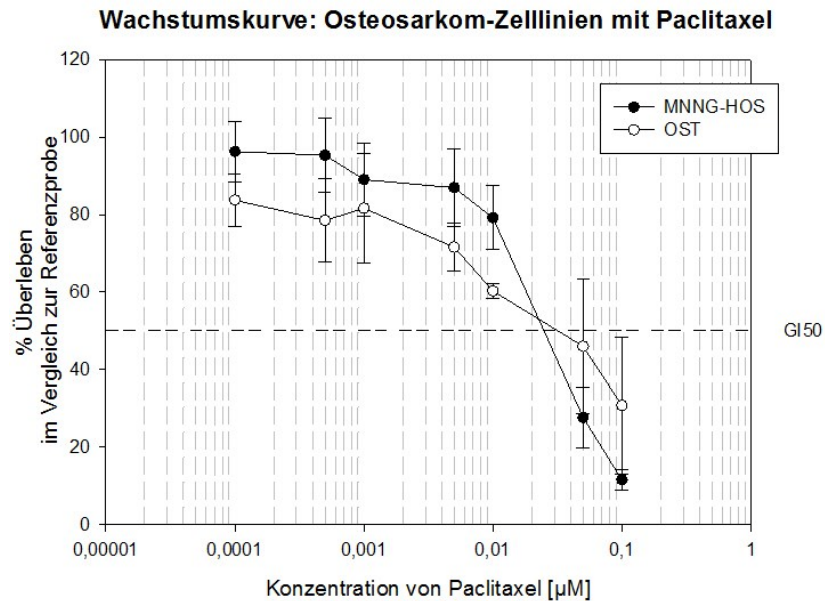


**Abb. 18:** Wachstumskurve der Neuroblastom-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

Bei den Neuroblastom-Zelllinien ergab sich ein heterogenes Bild: Die Zelllinien IMR-5 ( $GI_{50}$ : 5,53 nM) und SMS-KCN ( $GI_{50}$ : 28,1 nM) offenbarten sich als relativ sensibel (Mittelwert der  $GI_{50}$ -Werte im Gesamtpanel für Paclitaxel 27,8 nM). Beide weisen eine Amplifikation des Onkogens N-MYC auf. Ein  $GI_{50}$ -Wert wurde bei den Zelllinien SHEP (43,3 nM) und SH-SY5Y (84,6 nM) erst unter höheren Paclitaxel-Dosierungen erreicht. SH-SY5Y gehört damit bezogen auf die Paclitaxelgabe zu den am wenigsten sensiblen

Zelllinien im Panel (Rang 16, für CADO-ES1 und UW228.2 konnte keine  $GI_{50}$  ermittelt werden).

### Osteosarkom-Zelllinien:



**Abb. 19:** Wachstumskurve der Osteosarkom-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

Die beiden eingesetzten Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST ließen erst bei höher gewählten Paclitaxel-Dosierungen eine Hemmung des Wachstums erkennen. Für MNNG-HOS ergab sich im Mittel eine  $GI_{50}$  von 32,7 nM und für die Zelllinie OST eine von 54,6 nM (Rang 15). Allerdings wiesen die  $GI_{50}$ -Werte für OST im höheren Konzentrationsbereich eine starke Schwankungsbreite auf.

### Rhabdomyosarkom-Zelllinien:

Bei der Paclitaxel-Monobehandlung stach eine relative Sensibilität der gewählten Zellkulturen gegenüber dem Chemotherapeutikum hervor. Für die Zelllinie RD konnte ein  $GI_{50}$ -Wert von 4,35 nM, für RH-30 einer von 7,06 nM ermittelt werden.

Innerhalb des Panels war RD damit bezüglich der Paclitaxelwirkung die sensibelste Zelllinie (Rang 1).

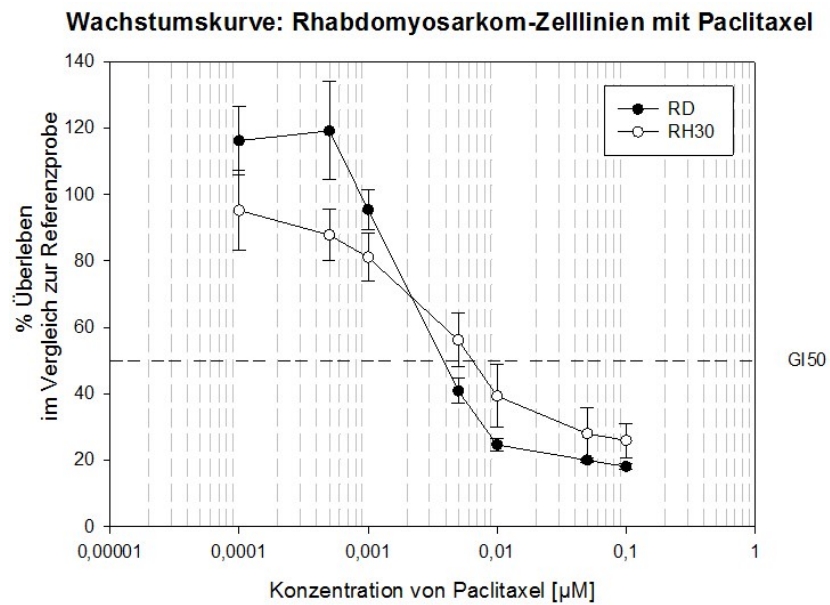


Abb. 20: Wachstumskurve der Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Paclitaxelgabe

**Zusammenfassung der GI<sub>50</sub>-Werte für die Behandlung mit Paclitaxel:**

In folgender Gesamtansicht (Abb. 21) werden noch einmal alle GI<sub>50</sub>-Werte gemeinsam graphisch dargestellt.

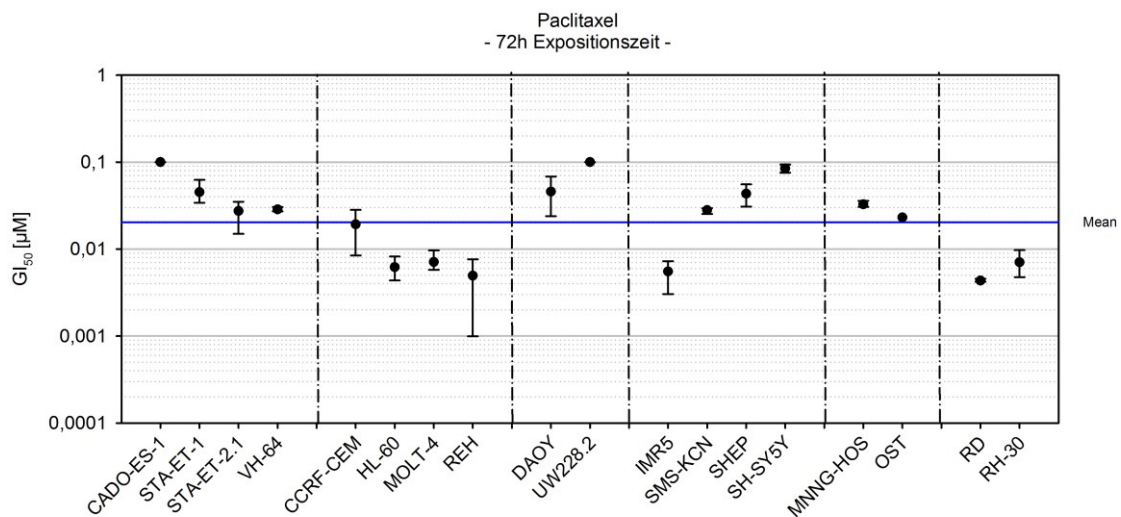


Abb. 21: GI<sub>50</sub>-Werte in logarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit Paclitaxel behandelten Zelllinien, Erklärung zur Darstellungsweise s. Abb. 14.

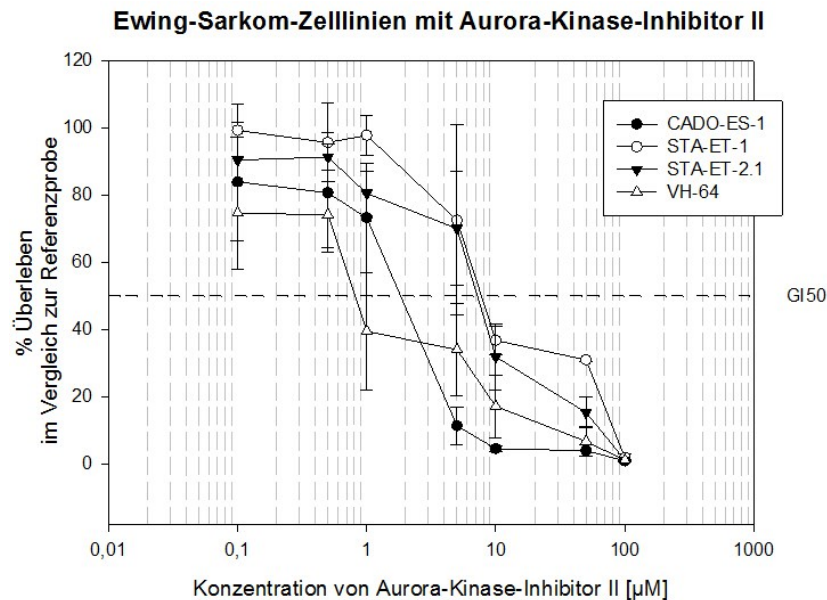
Bei einer Behandlung mit Paclitaxel, das bisher bei pädiatrischen Tumoren v.a. innerhalb von Studienprotokollen Anwendung findet, zeigte sich eine zytotoxische Wirkung für die Leukämie-Zelllinien bis auf CCRF-CEM und für die Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD

und RH-30. Die Ewing-, Medulloblastom- und Osteosarkom-Zelllinien erwiesen sich als relativ unempfindlich einer Paclitaxel-Monobehandlung gegenüber, ebenso die Neuroblastom-Zelllinien, abgesehen von der Linie IMR-5 (s. Abb. 21).

### 3.3. Inkubation mit Aurorakinase-Inhibitor II:

Nach einer kurzen graphischen Darstellung der Ergebnisse der Inkubationsversuche mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II, erfolgt eine graphische Zusammenfassung der ermittelten  $GI_{50}$ -Werte. Zur besseren Übersicht wurde für die Diagramme eine logarithmische Darstellung verwendet. Für die numerische Darstellung wurden die  $GI_{50}$ -Werte in  $\mu\text{M}$  (statt in nM wie unter Kapitel 3.1 und 3.2.) angegeben, da nach den ersten Experimenten eine deutlich höhere Dosierung notwendig erschien (s. auch Kapitel 2.8.). Für die Auswertung der Versuche standen jeweils sechs Messwerte zur Verfügung (s. Kapitel 2.10.).

#### Ewing-Sarkom-Zelllinien:



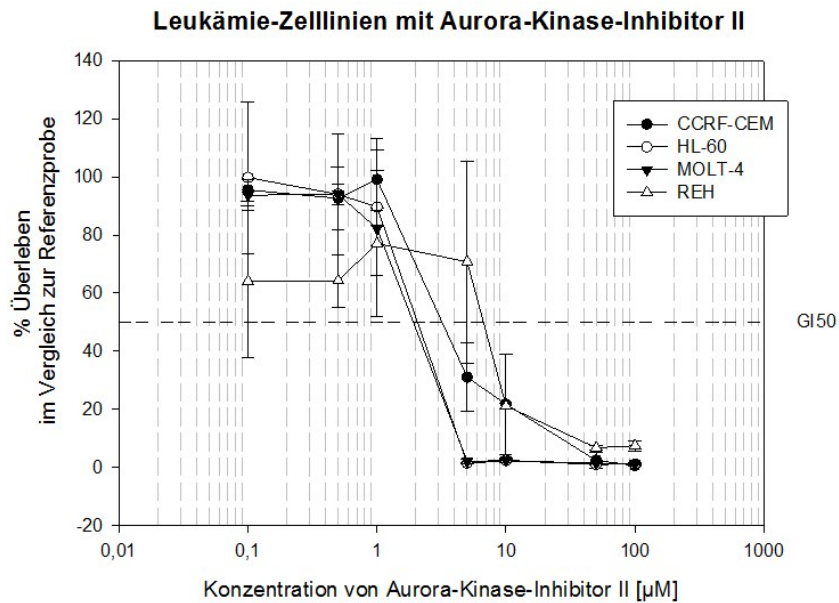
**Abb. 22:** Wachstumskurve der Ewing-Sarkom-Zelllinien unter Gabe des Aurora-Kinaseinhibitors II

Alle Ewing-Sarkom-Zelllinien zeigten sich sensibel für eine Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II. Allerdings unterschieden sich die  $GI_{50}$ -Werte je nach Zelllinie deutlich. Während der  $GI_{50}$ -Wert bei der besonders sensiblen Zelllinie VH-64 bei 2,33  $\mu\text{M}$  lag (und damit Rang 1 im Gesamtpanel), wies die vergleichsweise resistente Zelllinie



STA-ET-1 erst bei einem  $GI_{50}$ -Wert von  $8,21 \mu\text{M}$  eine 50%ige Wachstumshemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf.

### Leukämie-Zelllinien:



**Abb. 23:** Wachstumskurve der Leukämie-Zelllinien unter Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II

Bei den Leukämie-Zelllinien offenbarte sich ebenfalls eine durchgehend hohe Sensibilität unter einer Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II. Die  $GI_{50}$ -Werte lagen hier für die einzelnen Zelllinien bei  $2,38 \mu\text{M}$  für die Zelllinie MOLT-4 bis  $7,31 \mu\text{M}$  bei der Zelllinie REH. Aufgrund einer hohen Streubreite innerhalb der Messergebnisse für die Zelllinie REH sind die Aussagen hier nur von bedingter Aussagekraft.

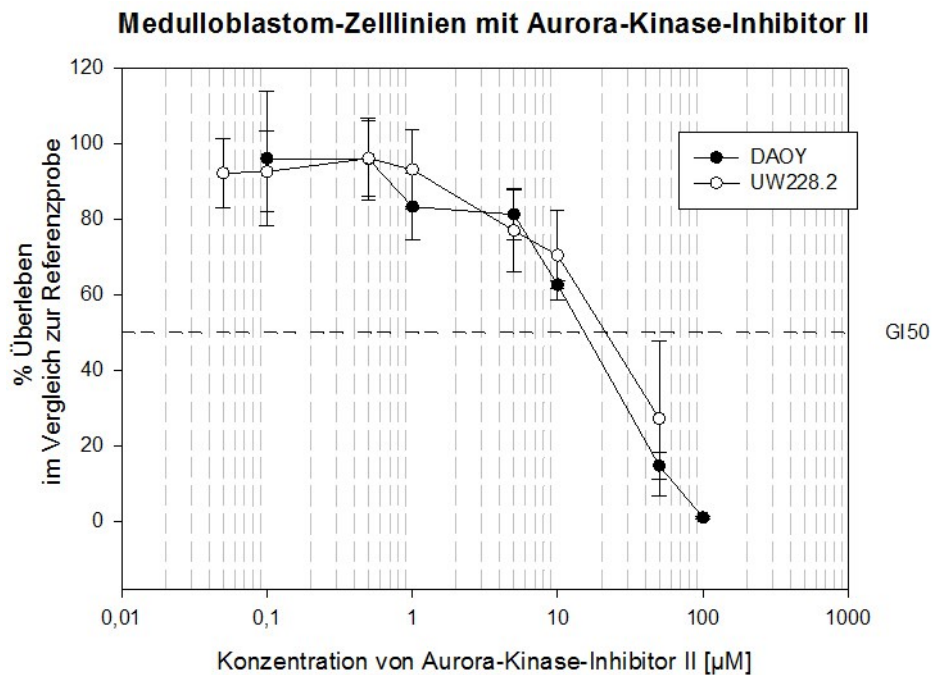
Dies kann u.a. durch die submaximale zytotoxische Wirkung im gewählten Konzentrationsbereich und den damit einhergehenden Limitationen des MTT-Tests erklärt werden (s. auch Kapitel 4.4.).

### Medulloblastom-Zelllinien:

Die beiden eingesetzten Medulloblastom-Zelllinien zeigten erst bei höheren Aurora-Kinaseinhibitor II-Konzentrationen eine Wachstumshemmung. Der  $GI_{50}$ -Wert für DAOY lag bei  $22,0 \mu\text{M}$ , der für UW228.2 bei  $36,2 \mu\text{M}$ . Da die Versuche mit der Zelllinie UW228.2 bereits am Anfang der Experimente durchgeführt wurden, sind im Gegensatz zu den anderen Zelllinien noch weitere Testkonzentrationen eingesetzt worden. Die minimale Testkonzentration betrug hierbei  $0,05 \mu\text{M}$ , die maximale  $50 \mu\text{M}$  (s. auch unter

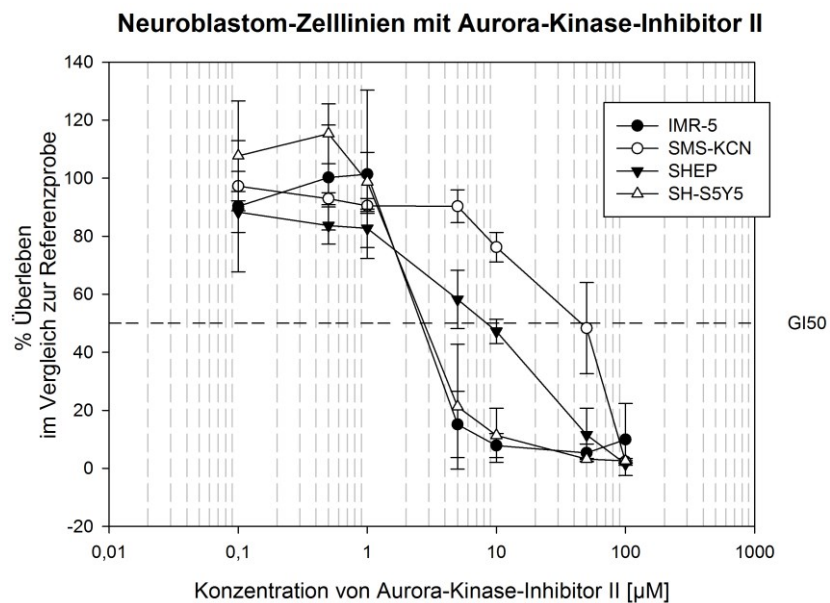
Kapitel 2.8.).

Im Vergleich zum Gesamtpanel präsentierten sich diese beiden Zelllinien wie auch schon bei den anderen beiden Testsubstanzen im Vergleich als besonders resistent (DAOY Rang 16, UW228.2 Rang 17).



**Abb. 24:** Wachstumskurve der Medulloblastom-Zelllinien unter Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II

**Neuroblastom-Zelllinien:**



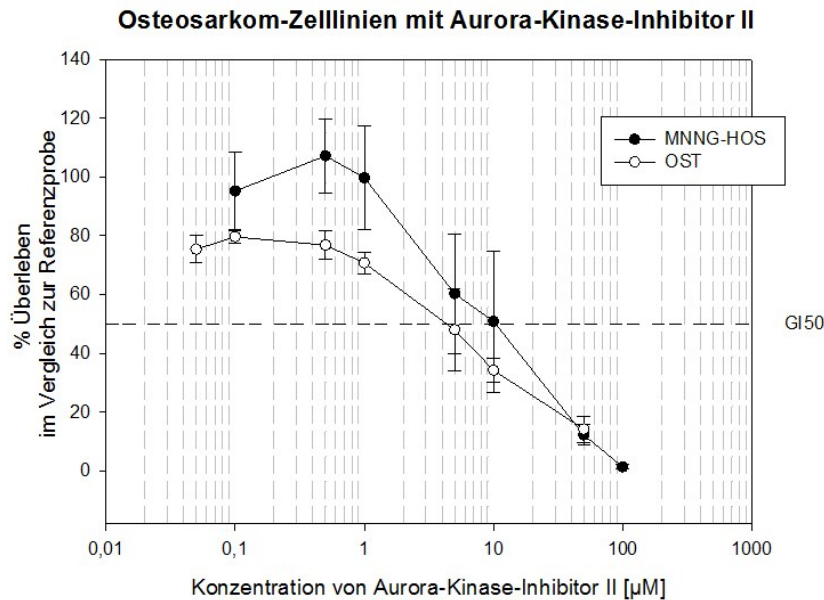
**Abb. 25:** Wachstumskurve der Neuroblastom-Zelllinien unter Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II

Die Inkubation mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II ergab bei den Neuroblastom-Zelllinien



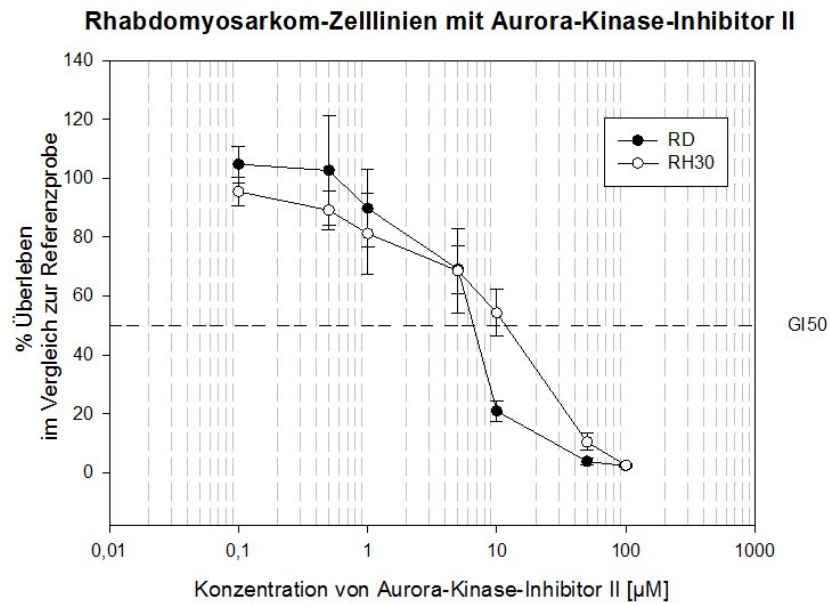
ein heterogenes Bild: Während die Zelllinie IMR-5 besonders sensibel reagierte, zeigte SMS-KCN erst bei hohen Konzentrationen eine Wachstumshemmung. Die einzelnen  $GI_{50}$ -Werte waren  $3,22 \mu\text{M}$  für IMR-5,  $8,94 \mu\text{M}$  für SH-SY5Y,  $3,18 \mu\text{M}$  für SHEP und  $45,8 \mu\text{M}$  für SMS-KCN. SMS-KCN ist damit die am wenigsten sensibelste Zelllinie im Gesamtpanel (Rang 18).

### Osteosarkom-Zelllinien:



**Abb. 26:** Wachstumskurve der Osteosarkom-Zelllinien unter Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II. Anmerkung: Für die Osteosarkomzelllinie OST konnte nur in 1/6 Versuchen eine  $GI_{50}$  innerhalb der gewählten Testkonzentrationen ermittelt werden, so dass für die weitere Auswertung keine  $GI_{50}$  angegeben wird.

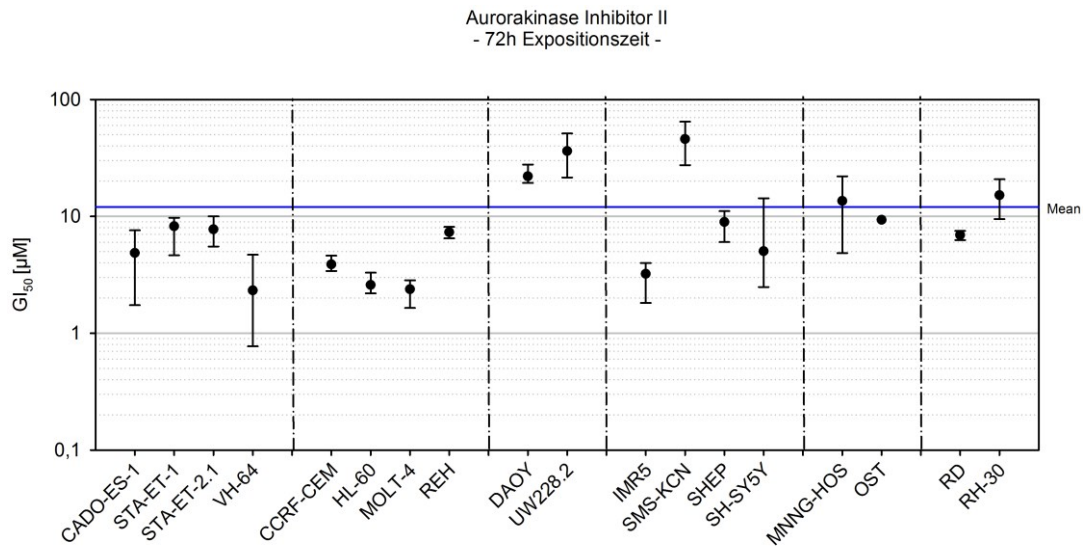
Die Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST reagierten mäßig sensibel auf einen Aurora-Kinaseinhibitor II-Zusatz zum Medium. Der  $GI_{50}$ -Wert war für OST bei  $7,94 \mu\text{M}$  (s. Anmerkung unter Abb. 26) und für MNNG-HOS bei  $13,6 \mu\text{M}$  zu ermitteln. Für die Zelllinie OST sind noch andere Testkonzentrationen verwendet worden. Die minimale Testkonzentration lag hier bei  $0,05 \mu\text{M}$ , die maximale bei  $50 \mu\text{M}$  (s. auch unter Kapitel 2.8.). Die Daten für OST sind für die späteren Auswertungen (s. Diagramme Abb. 28 und Abb. 64) und auch weitergehenden statistischen Berechnungen nicht mit einbezogen worden, da sich ein nur mangelhaftes Wachstum nach 72 h gegenüber der unbehandelten Kontrolle (mit negativen Generationszeiten) ergab bei allerdings in sich konsistenten Daten (s. Abb. 26). Die Zellen in der Kontrolle nach 72 h waren gegenüber der Nullprobe teilweise abgestorben bzw. nicht gewachsen.

**Rhabdomyosarkom-Zelllinien:**

**Abb. 27:** Wachstumskurve der Rhabdomyosarkom-Zelllinien unter Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II

Bei der Betrachtung der zytotoxischen Potenz des Aurora-Kinaseinhibitors II auf die beiden Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD (Rang 8) und RH-30 (Rang 15) fiel eine mäßige Sensibilität im Vergleich zum Gesamtpanel auf (Mittelwert der GI<sub>50</sub>-Werte im Gesamtpanel für den Aurora-Kinaseinhibitor II 11,2 µM). Der GI<sub>50</sub>-Wert für RD betrug 6,92 µM und für RH-30 15,2 µM.

### Zusammenfassung der GI<sub>50</sub>-Werte:



**Abb. 28:** GI<sub>50</sub>-Werte in logarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit dem Aurorakinase-Inhibitor II behandelten Zelllinien, Erklärung zur Darstellungsweise s. Abb. 14.  
Anmerkung: Für die Osteosarkomzelllinie OST konnte nur in 1/6 Versuchen eine GI<sub>50</sub> innerhalb der gewählten Testkonzentrationen ermittelt werden, s.o.  
Die LC<sub>50</sub>-Werte befinden zum Vergleich im Anhang, Kapitel 7.

Das Diagramm verdeutlicht, dass besonders die Leukämiezellen sensibel auf die Behandlung mit dem Aurorakinase-Inhibitor reagierten (Abb. 28). Weiterhin zeigte sich auch eine relative Sensibilität bei den Ewing-Sarkom- und bei den Neuroblastom-Zelllinien IMR-5, SHEP und SH-SY5Y mit Ausnahme der Zelllinie SMS-KCN.

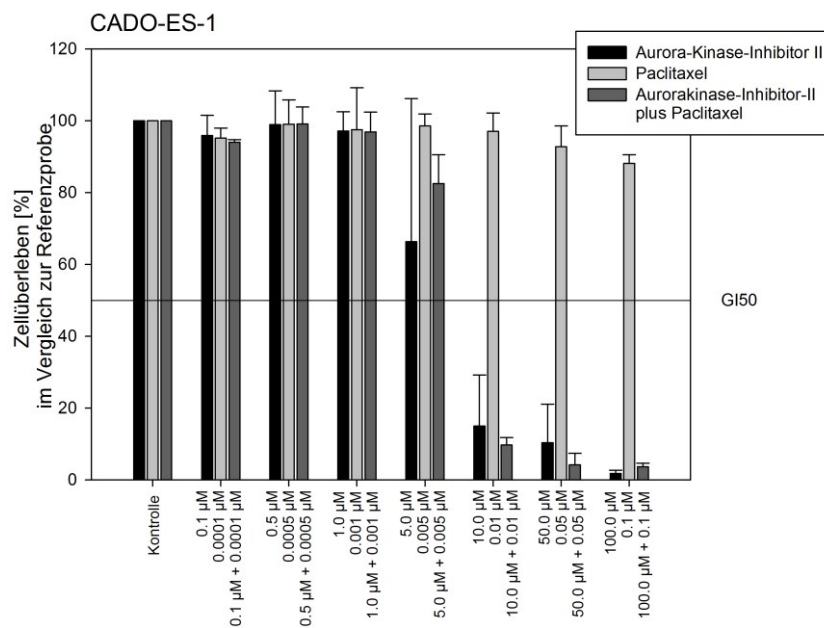
### 3.4. Inkubation mit einer Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Paclitaxel:

Für die Darstellung der Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen wurde eine Gegenüberstellung der gewonnenen Daten aus drei Messreihen im Säulendiagramm gewählt, um Unterschiede in der Wirksamkeit anschaulich darstellen zu können. Zusätzlich wird die Streubreite der Werte mittels der Standardabweichung illustriert. Die Intention der Versuche war, nach möglichen additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten in der Kombinationsanwendung der beiden Substanzen im Vergleich zur Einzelanwendung zu suchen. Eine weiterführende Diskussion der Daten erfolgt unter Kapitel 4.9. Für die statistische Auswertung wurde der Kombinationsindex

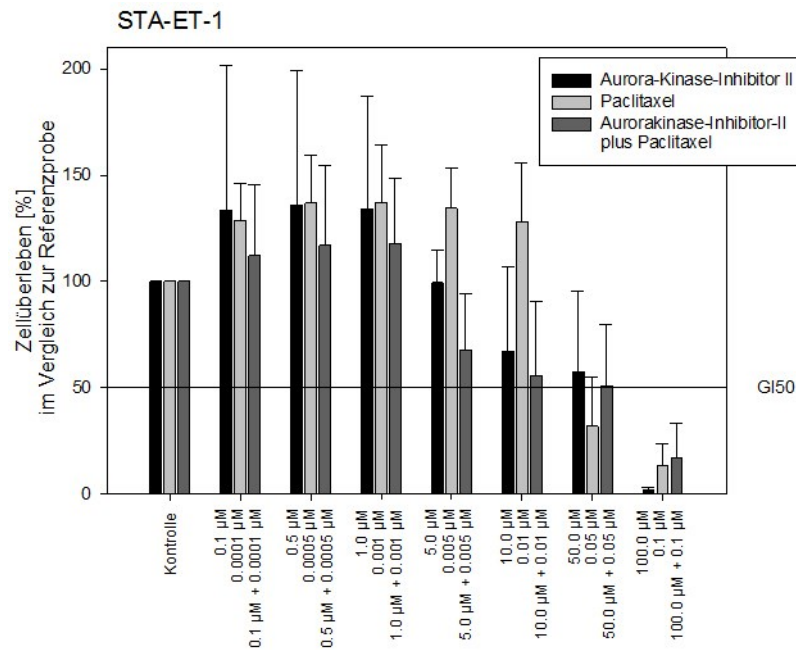
nach Chou und Talaly berechnet. In der jeweiligen Kombination wurden Werte  $<0,9$  als synergistisch, Werte von  $0,9-1,1$  als additiv und  $>1,1$  als antagonistisch erachtet (19), (s. Kapitel 2.10.). Zur Belegung der 96-Lochplatten (s. Abb. 7) und Versuchsdurchführung sei auf Kapitel 2.9. verwiesen.

### Ewing-Sarkom-Zelllinien:

Die Zelllinie CADO-ES1 zeigte sich relativ resistent gegenüber einer Paclitaxel-Gabe, ein additiver Effekt war bei der phänomenologischen Betrachtung der Kombinationsgabe beider Substanzen nicht auszumachen. Der CI-Wert für die Kombination betrug 1,52 (antagonistischer Effekt).

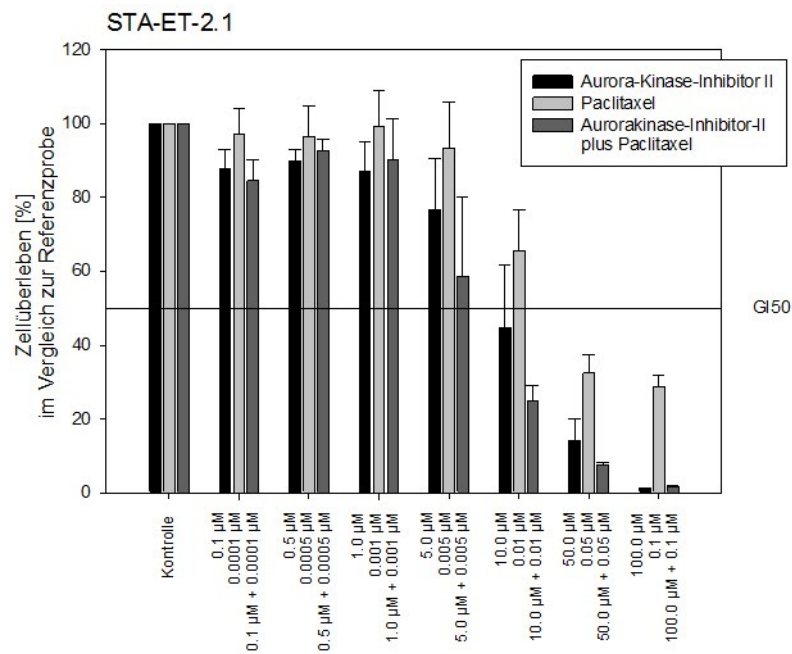


**Abb. 29:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie CADO-ES-1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel



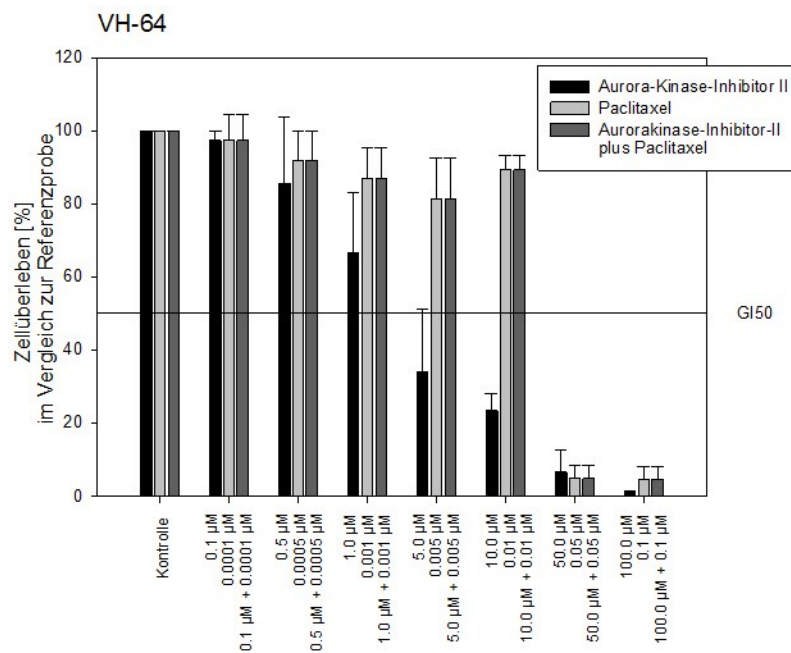
**Abb. 30:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie STA-ET-1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die Zelllinie STA-ET-1 kristallisierte sich ein ähnliches Bild heraus: STA-ET-1 zeigte ein mäßiges Ansprechen auf eine Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II, ein relativ schlechtes auf Paclitaxel. In der Kombinationsanwendung wurde visuell ein additiver Effekt bei mittleren Konzentrationen deutlich, während es bei höheren Konzentrationen umgekehrt war: Es überlebten mehr Zellen als man es hinsichtlich der Wirkung beider Einzelstoffe erwartet hätte. Bei der Betrachtung der Streubreite der Werte offenbarte sich eine überdurchschnittliche Standardabweichung, was eine Analyse erschwerte. Rechnerisch ergaben sich antagonistische Effekte bei einem CI-Wert von 1,56.



**Abb. 31:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie STA-ET-2.1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

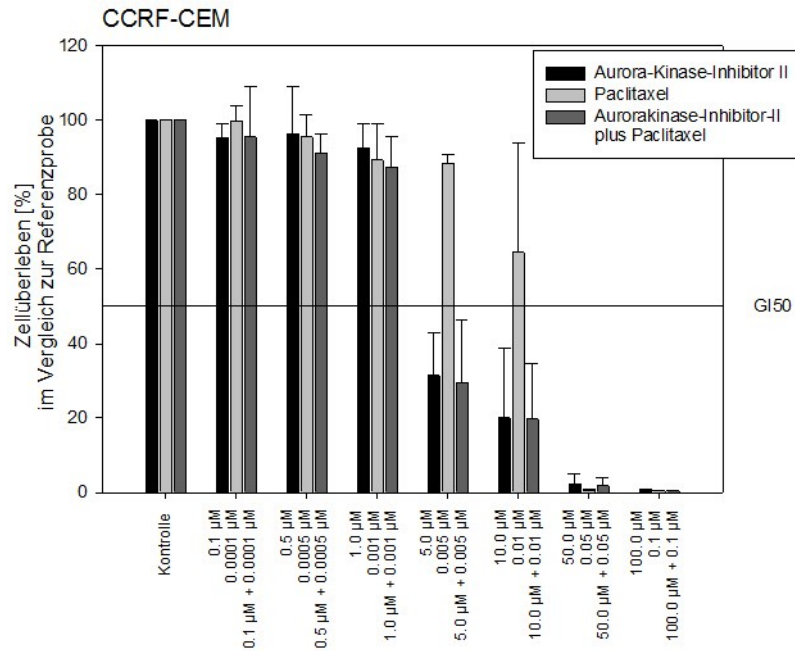
Eine gänzlich andere Beobachtung traf für die Zelllinie STA-ET-2.1 zu. Es vollzogen sich hier additive Effekte. Rechnerisch ergab sich ein CI-Wert von 0,93. Während die Zellen eher mäßig sensibel auf Paclitaxel reagierten, verursachte eine Kombination beider Substanzen in Bezug auf die Absterberate der Zellen einen größeren Effekt.



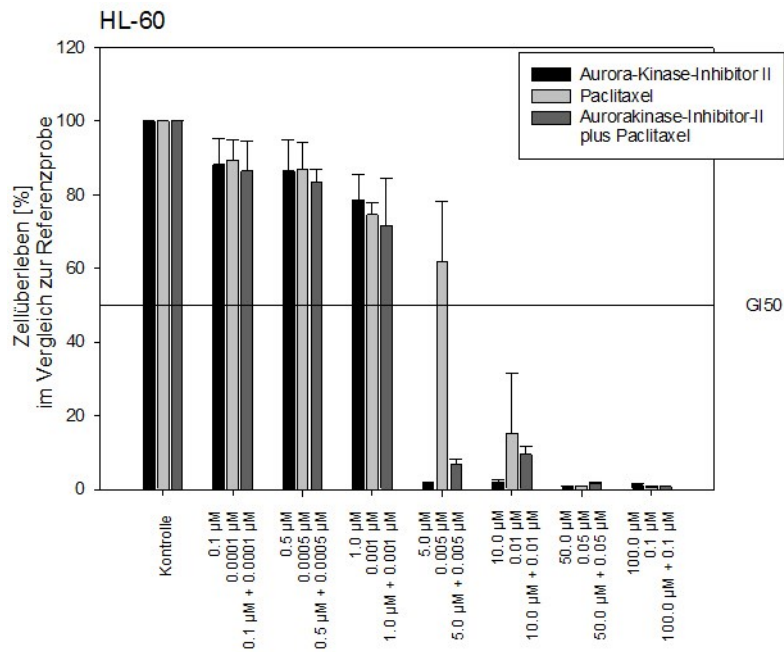
**Abb. 32:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie VH-64 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Bei der Zelllinie VH-64 zeigten sich keine additiven Effekte. Es offenbarte sich in der Kombinationsanwendung bei den gewählten Konzentrationen ein schlechteres Ansprechen als auf die Behandlung mit dem Aurorakinase-Inhibitor II allein (CI-Wert 1,51, s. Tabelle 5).

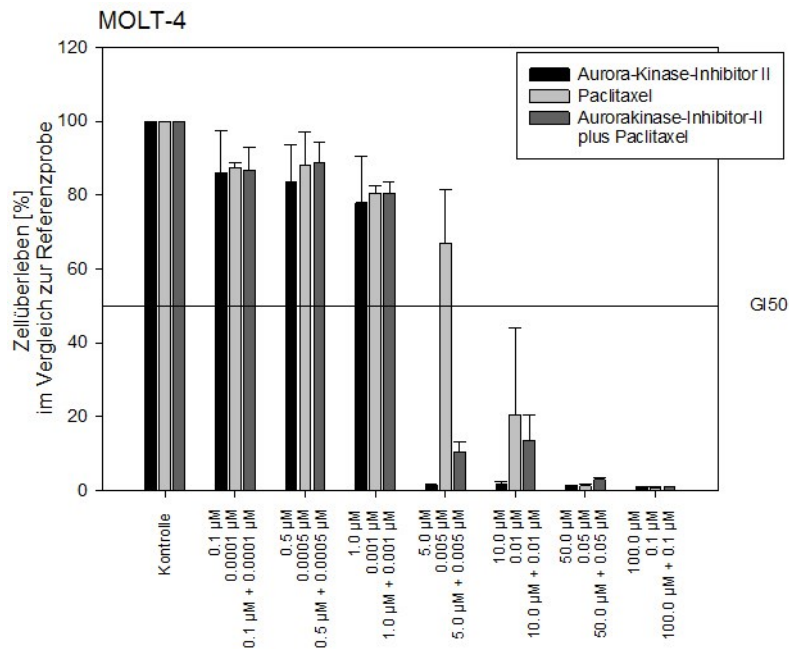
### Leukämie-Zelllinien:



**Abb. 33:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie CCRF-CEM nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel



**Abb. 34:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie HL-60 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel



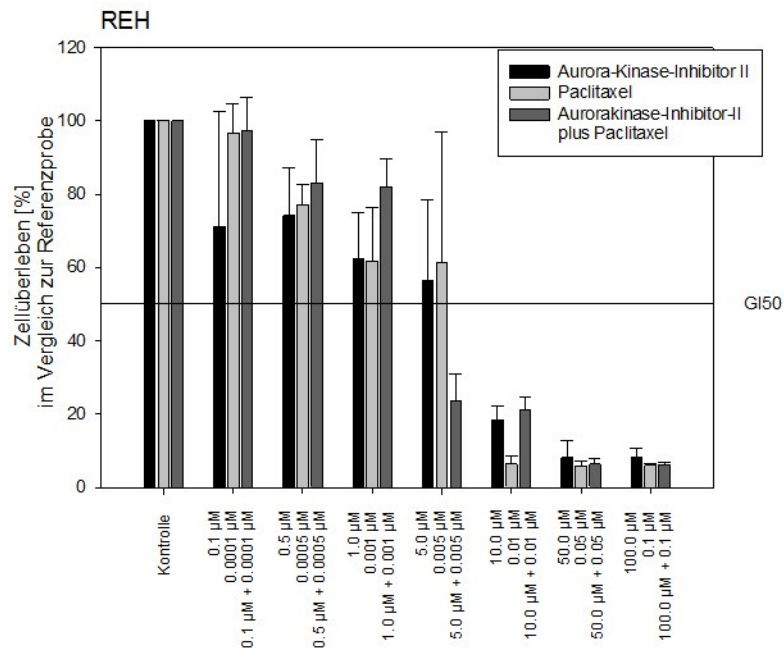
**Abb. 35:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie MOLT-4 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Nach einer zusammenfassenden Betrachtung der Leukämie-Zelllinien CCRF-CEM, HL-60 und MOLT-4 ließ sich innerhalb der gewählten Konzentrationsbereiche (soweit



vergleichbar) ein relativ gutes Ansprechen auf den Aurorakinase-Inhibitor II im Gegensatz zu Paclitaxel konstatieren. In einer Kombinationsanwendung beider Stoffe zeigten sich phänomenologisch keine wesentlichen additiven Effekte. Rechnerisch bestanden antagonistische Effekt für die Kombinationsanwendung (s. Tabelle 5).

In der Einzelanwendung für die beiden Substanzen gehörten die Leukämiezelllinien wie bereits erwähnt zu den vergleichsweise sensiblen (s. Abb. 21 und 28).



**Abb. 36:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie REH nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Daneben wurde zumindest bei den Versuchen mit der Zelllinie REH in bestimmten Konzentrationsbereichen (5,0 µM Aurorakinase-Inhibitor II plus 0,005 µM Paclitaxel) visuell ein additiver Effekt bei der Kombinationsanwendung erzeugt. Allerdings wurde gerade bei Betrachtung dieser Werte eine große Standardabweichung innerhalb der Werte deutlich. Rechnerisch bestand auch für diese Zelllinie ein antagonistischer Effekt (CI-Wert 2,48, STABW +/- 2.53, s. Tabelle 5).

Medulloblastom-Zelllinien:

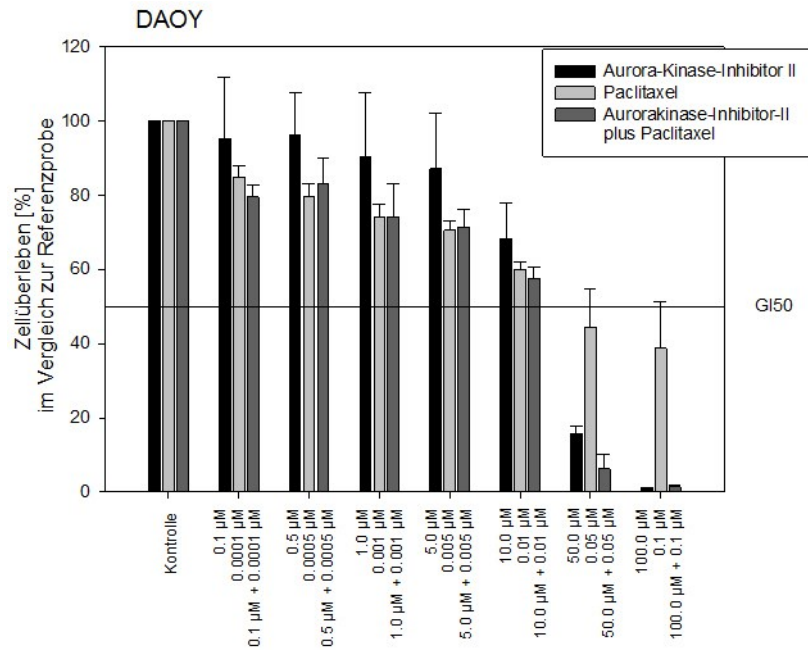


Abb. 37: Anteil vitaler Zellen der Zelllinie DAOY nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

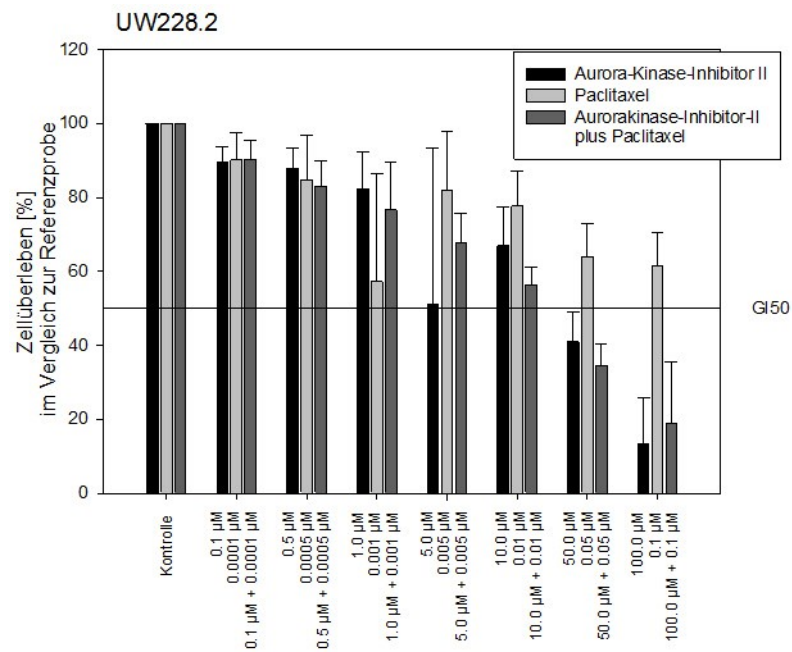


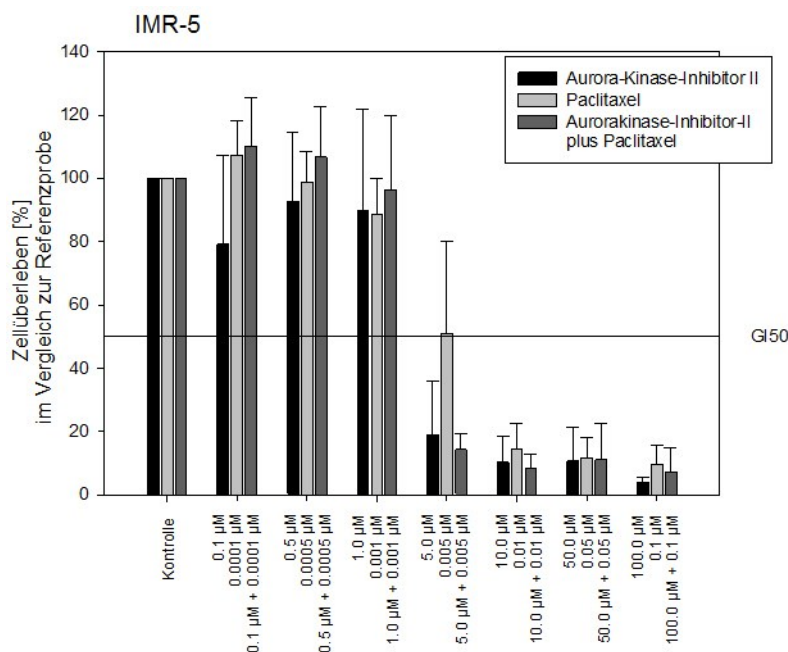
Abb. 38: Anteil vitaler Zellen der Zelllinie UW228.2 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Schaut man sich die Ergebnisse für die beiden Medulloblastom-Zelllinien DAOY und

UW228.2 an, fällt insgesamt eine hohe Resistenz gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika auf. Additive Effekte in der Kombinationsanwendung zeigten sich visuell-phänomenologisch nur bei bestimmten Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  Aurora-Kinaseinhibitor II plus 0,01  $\mu\text{M}$  Paclitaxel und 50  $\mu\text{M}$  Aurora-Kinaseinhibitor II plus 0,05  $\mu\text{M}$  Paclitaxel). Allerdings blieb dieser Effekt bei den anderen gewählten Konzentrationen aus.

Die rechnerisch ermittelten CI-Werte ergaben für DAOY einen Wert von 1,38 und für UW228.2 von 5,31 (STABW +/- 7,45), so dass insgesamt antagonistische Effekte für die Kombinationsanwendung konstatiert werden müssen.

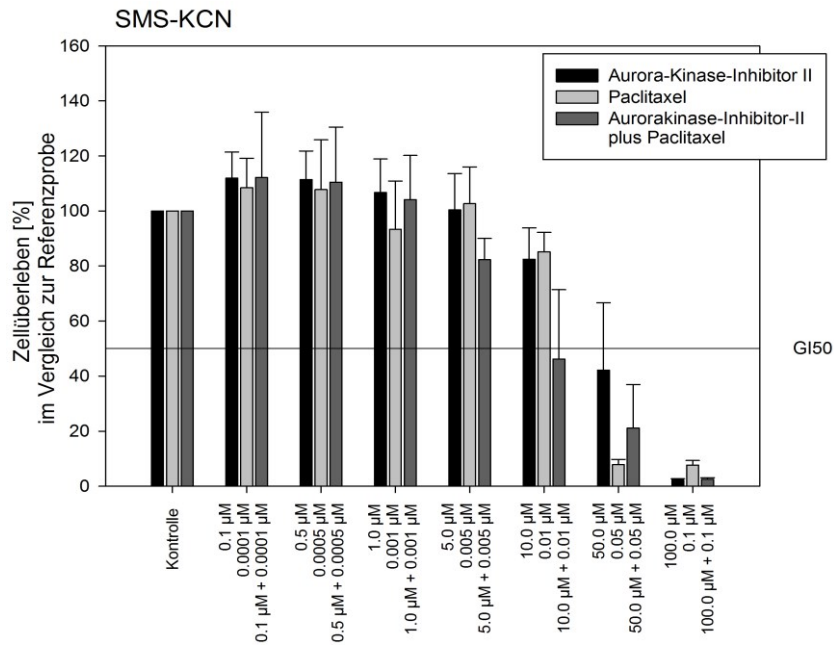
### Neuroblastom-Zelllinien:



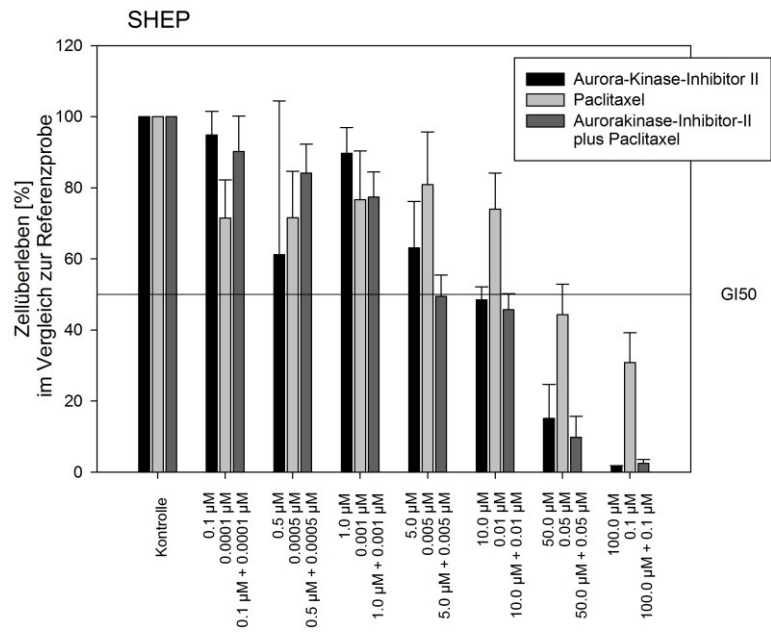
**Abb. 39:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie IMR-5 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

Bei den Neuroblastom-Zelllinien reagierten insbesondere die Zelllinien IMR-5 und SH-SY5Y sensibel auf den Aurora-Kinaseinhibitor II, IMR-5 daneben auch zusätzlich auf Paclitaxel. In der Gesamtansicht zeigten sich visuell keine nennenswerten additiven Effekte, außer bei der Linie SMS-KCN in bestimmten Konzentrationsbereichen (5  $\mu\text{M}$  Aurora-Kinaseinhibitor II plus 0,005  $\mu\text{M}$  Paclitaxel und 10  $\mu\text{M}$  Aurora-Kinaseinhibitor II plus 0,01  $\mu\text{M}$  Paclitaxel).

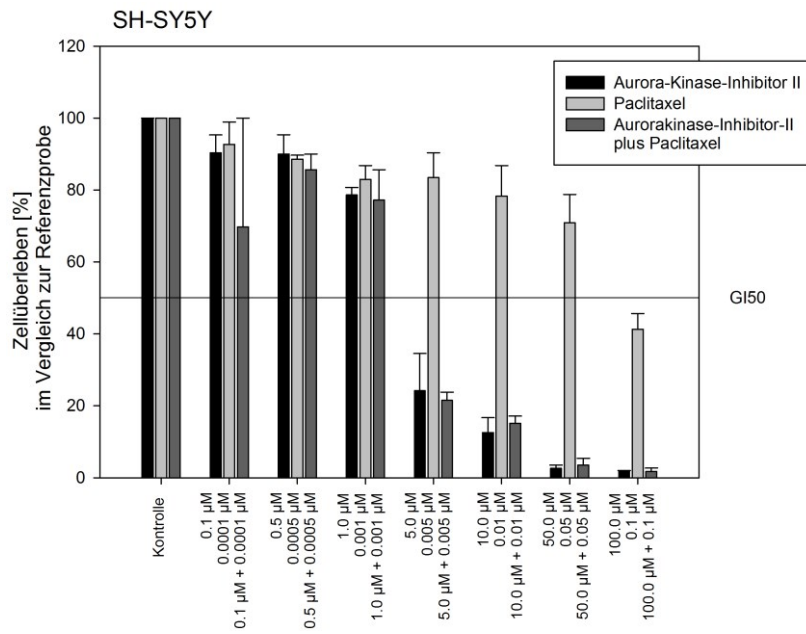
Als Kombinationsindices konnten für die Zelllinie SMS-KCN ein Wert von 0,81 und für SHEP von 0,88 errechnet werden, so dass synergistische Wirkungen für die gemeinsame Anwendung bestanden. Für IMR-5 bestanden rechnerisch antagonistische Effekte bei einem CI-Wert von 1,38, für SH-SY5Y rechnerisch additive Effekte bei einem CI-Wert von 1,07.



**Abb. 40:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SMS-KCN nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

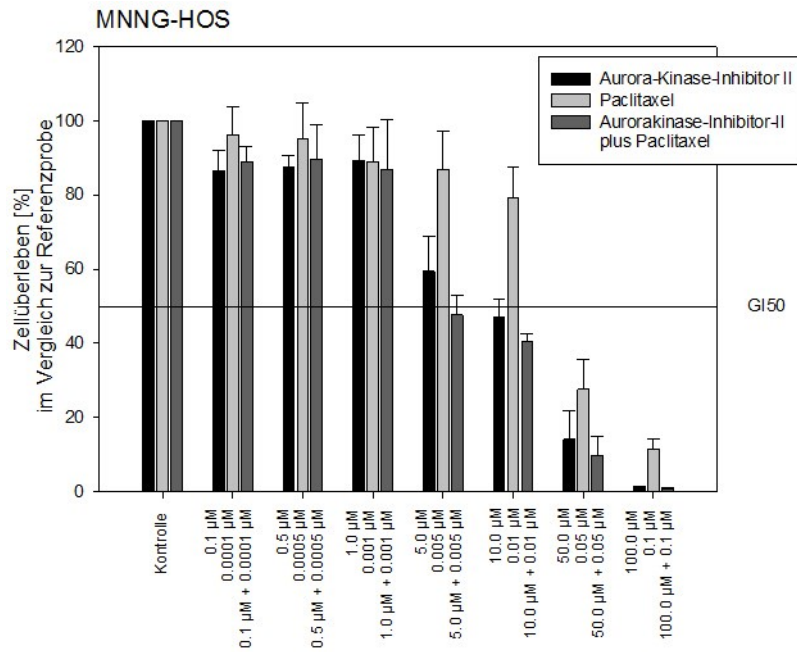


**Abb. 41:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SHEP nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

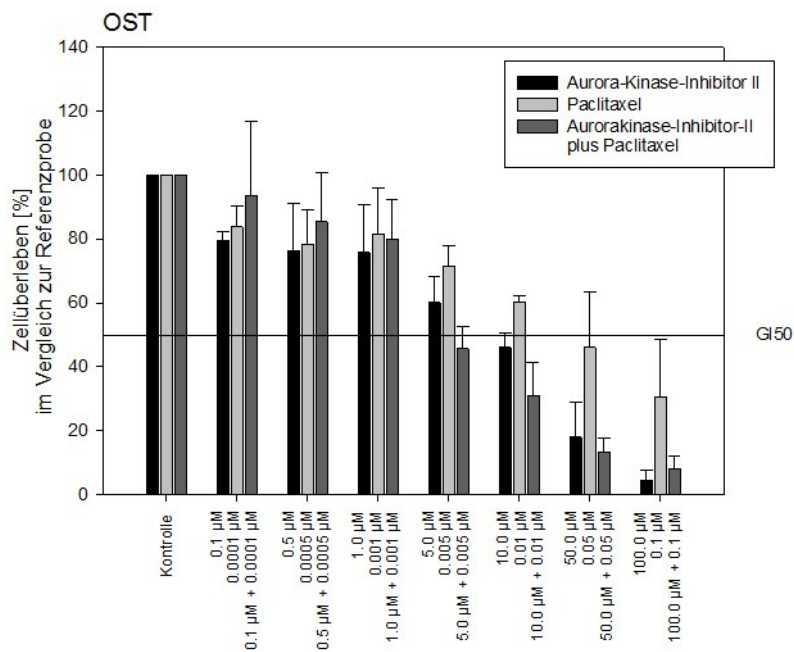


**Abb. 42:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SH-SY5Y nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

**Osteosarkom-Zelllinien:**



**Abb. 43:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie MNNG-HOS nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel



**Abb. 44:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie OST nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

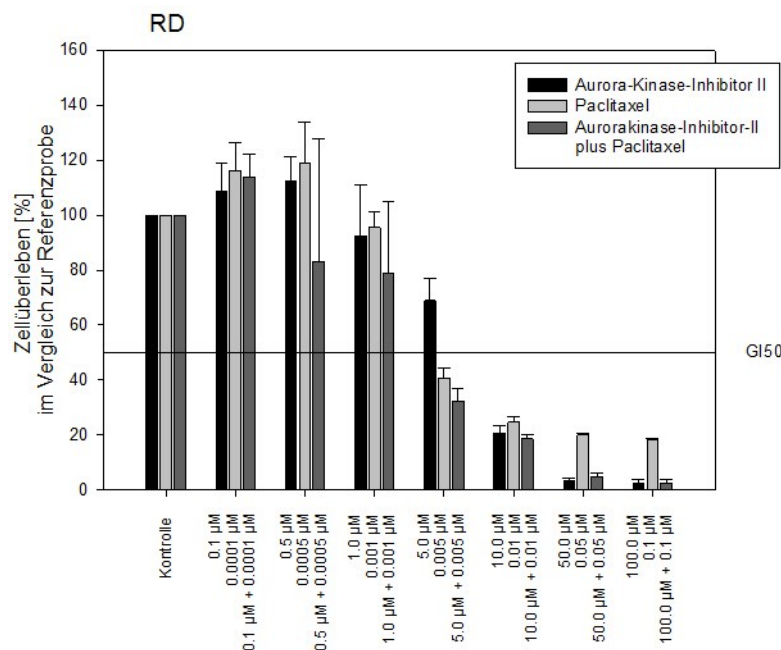
Die untersuchten Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST wiesen beide eine relative Resistenz gegenüber Paclitaxel auf. Kombinierte man Paclitaxel mit dem

Aurorakinase-Inhibitor II, zeigten sich visuell ab einem bestimmten Konzentrationsbereich (5  $\mu\text{M}$  Aurora-Kinaseinhibitor II plus 0,005  $\mu\text{M}$  Paclitaxel) synergistische Effekte. Es starben mehr Zellen ab als bei einer jeweiligen Einzelanwendung zu erwarten war.

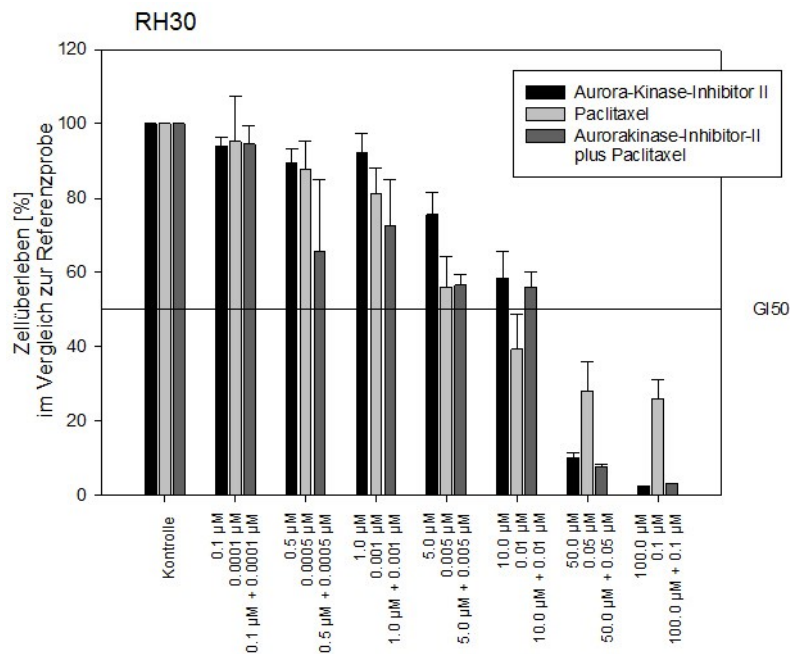
Es wurde für die Zelllinie MNNG-HOS ein CI-Wert von 0,84 und für OST einer von 0,74 bestimmt.

### Rhabdomyosarkom-Zelllinien:

Die beiden gewählten Rhabdomyosarkom-Zelllinien RD und RH-30 zeigten beide sowohl auf den Aurorakinase-Inhibitor II als auch auf das Paclitaxel bei höheren Konzentrationen eine gewisse Sensibilität ( $\text{GI}_{50}$ -Werte s. unter 3.2., 3.3. und 3.6.). Bei der Kombinationsanwendung offenbarten sich visuell zwar tendenziell additive Effekte in bestimmten Konzentrationsbereichen (s. Abb. 45 und 46), rechnerisch ergaben sich aber für beide Zelllinien CI-Werte passend zu einem antagonistischen Effekt (CI-Wert RD bei 1,11 und CI-Wert von RH-30 bei 3,15, s. Tabelle 5). Einschränkend für die graphische Beurteilung war die hohe Standardabweichung bei den Kombinationsversuchen gerade in dem relevanten Konzentrationsbereich.



**Abb. 45:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie RD nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel



**Abb. 46:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie RH-30 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Paclitaxel

### 3.5. Inkubation mit einer Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Vincristin:

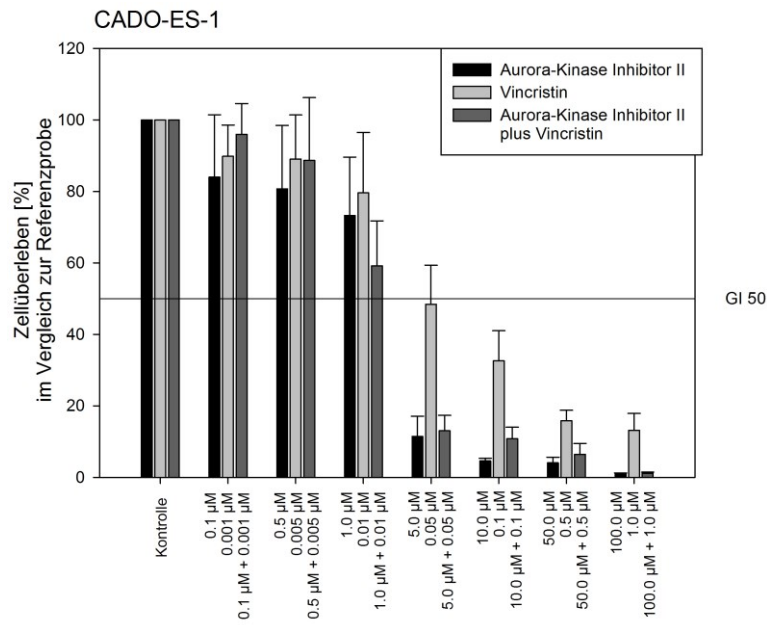
Für die Auswertung der Kombinationsanwendung des Aurora-Kinaseinhibitors II mit Vincristin wurde die gleiche Darstellung wie unter 3.4. gewählt. Dies diente ebenfalls dem Auffinden möglicher additiver oder antagonistischer Effekte durch die Kombinationsanwendung. Jeder Versuch wurde dreimalig durchgeführt.

#### **Ewing-Sarkom-Zelllinien:**

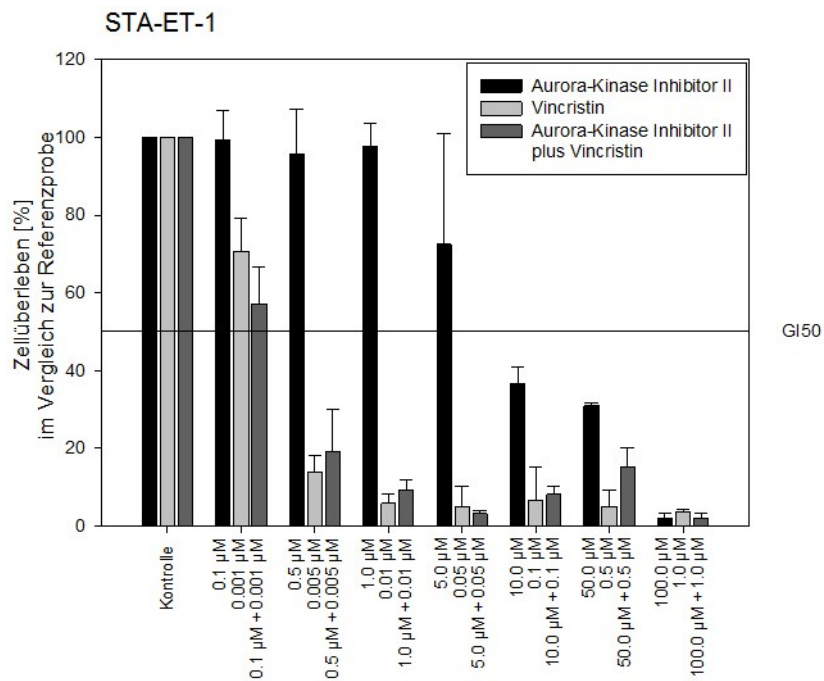
Der Aurora-Kinaseinhibitor II zeigte ein relativ gutes Ansprechen auf alle vier gewählten Ewing-Sarkom-Zelllinien, ebenso Vincristin. Kombinierte man beide Medikamente, präsentierten sich bei der Zelllinie VH-64 additive Effekte (CI-Wert 1,03).

Bei der Zelllinie STA-ET-2.1 wurden sogar synergistische Effekte ermittelt (CI-Wert 0,68). Bei den beiden anderen Zelllinien waren rechnerisch antagonistische Effekte zu beobachten (s. Tabelle 5).

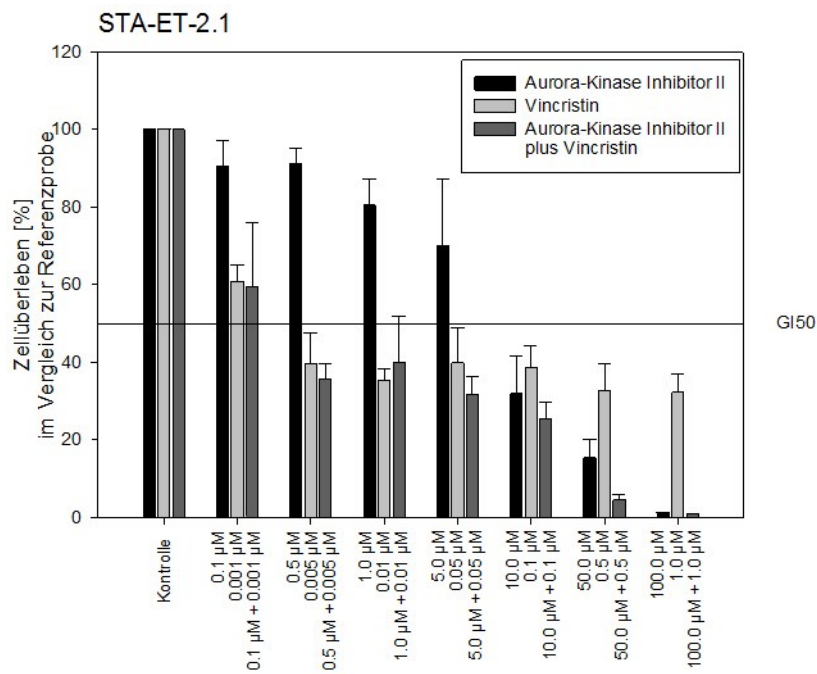




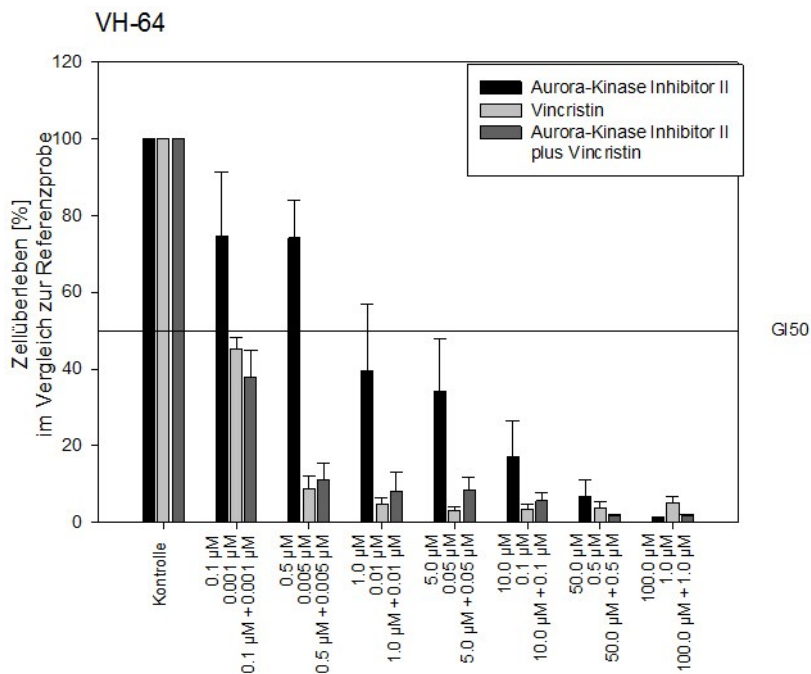
**Abb. 47:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie CADO-ES-1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 48:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie STA-ET-1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 49:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie STA-ET-2.1 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



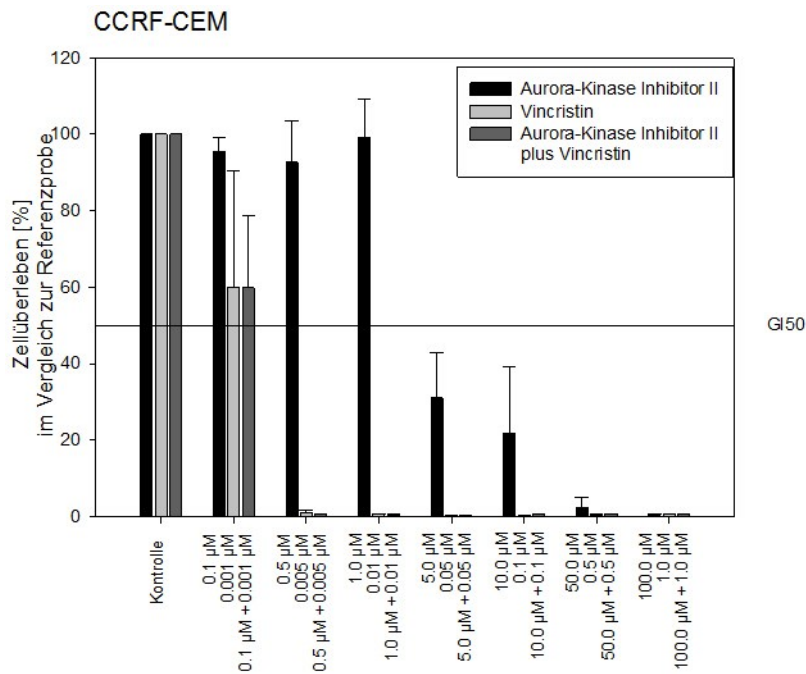
**Abb. 50:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie VH-64 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

**Leukämie-Zelllinien:**

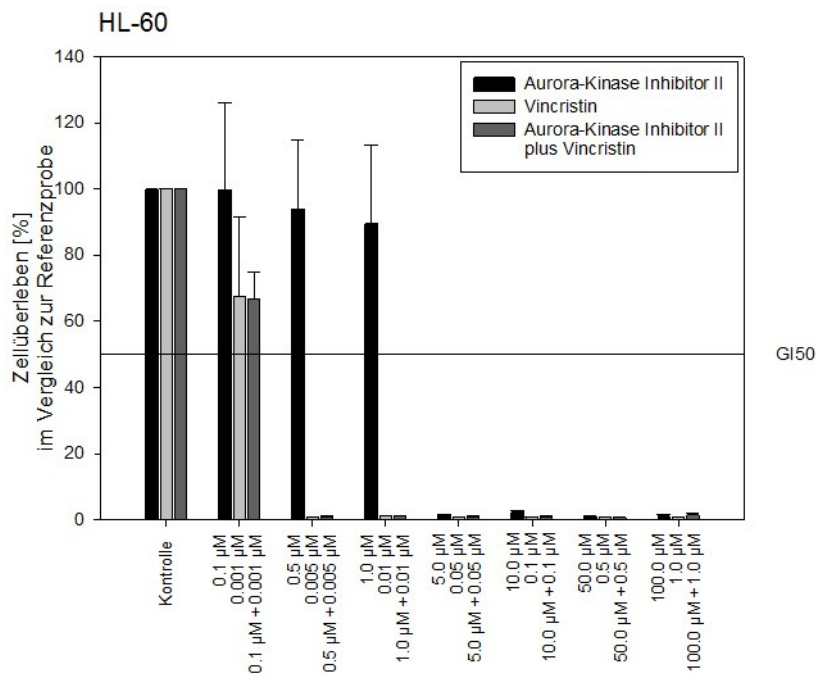
Als ebenfalls bemerkenswert wirkungsvoll erwies sich der Aurora-Kinaseinhibitor II, wie

bereits unter Kapitel 3.3. angeführt, bei den gewählten Leukämie-Zelllinien. Dieses galt ebenfalls für das in der Therapie der Leukämien eingesetzte Vincristin. Zusätzliche (allerdings minimale) additive Effekte ergaben sich nur im Fall der Zelllinie CCRF-CEM (CI-Wert 1,09).

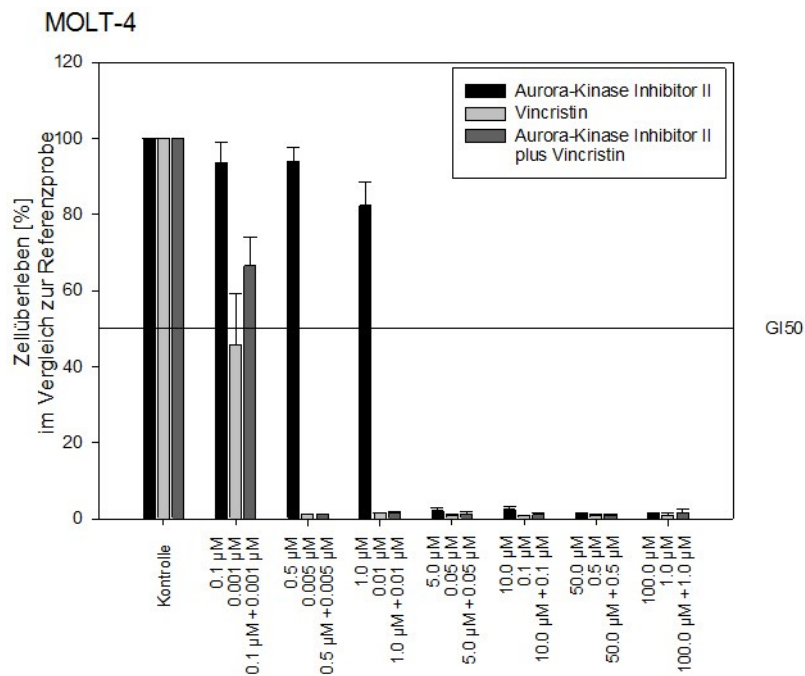
Rechnerisch wurden sonst für die Kombination aus dem Aurorakinase-Inhibitor II und Vincristin bei den Zelllinien MOLT-4 (CI-Wert 2,42), HL-60 (CI-Wert 1,37) und REH (CI-Wert 3,93, STABW +/- 5,17) antagonistische Effekte ermittelt.



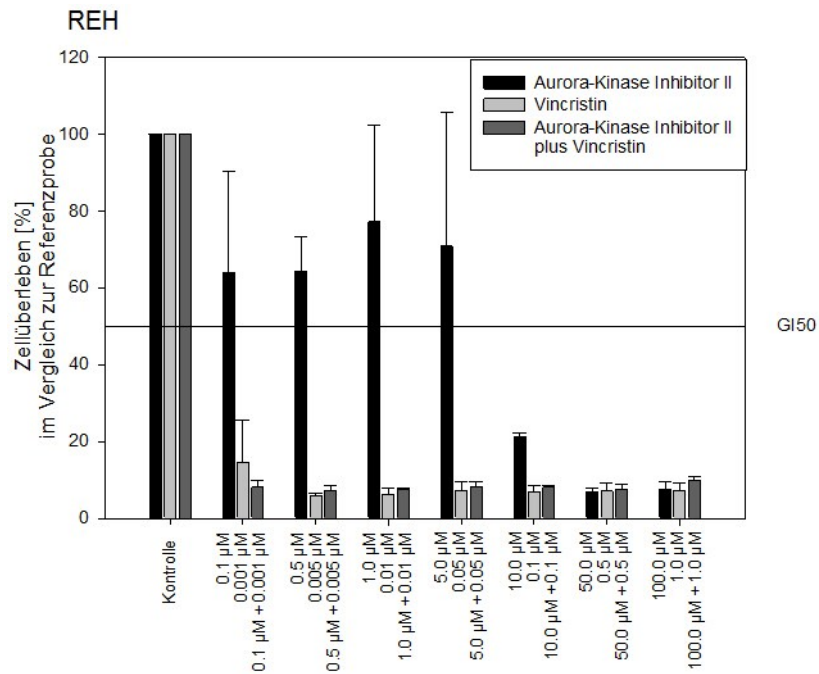
**Abb. 51:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie CCRF-CEM nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 52:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie HL-60 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



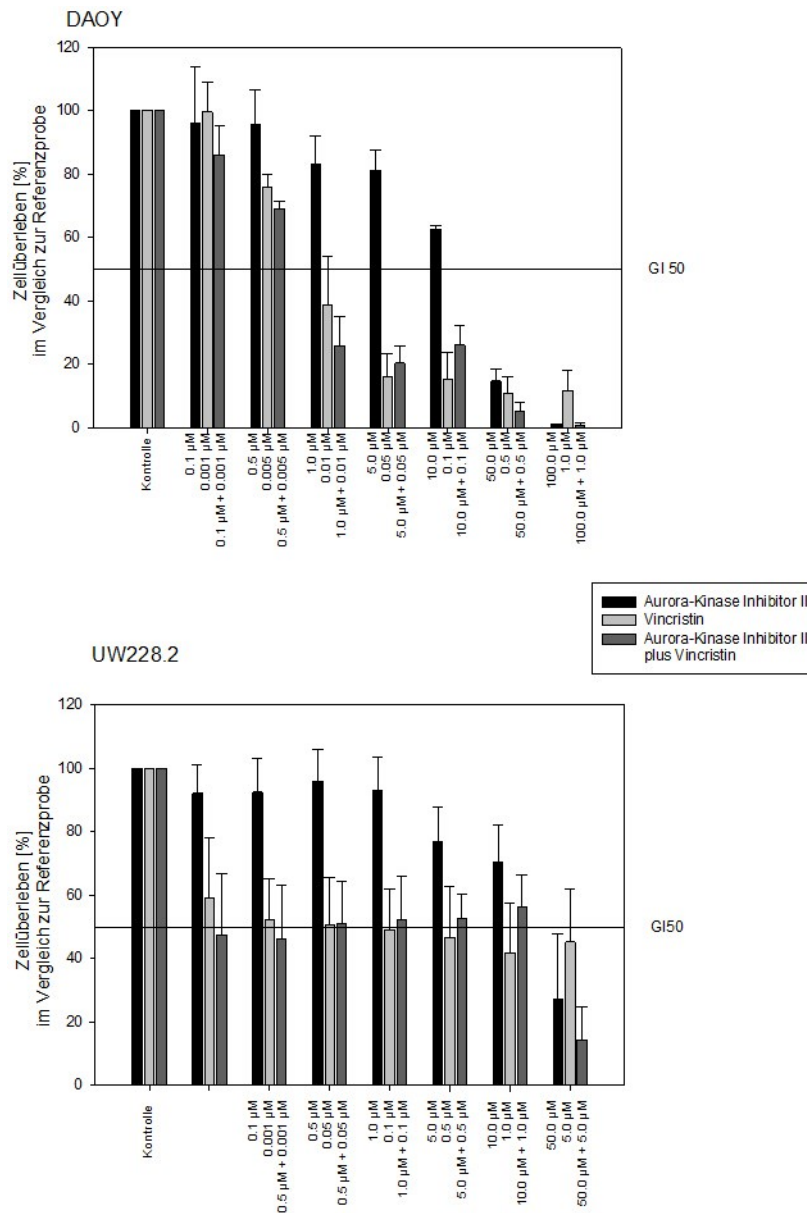
**Abb. 53:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie MOLT-4 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 54:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie REH nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

### Medulloblastom-Zelllinien:

Während sich die Medulloblastom-Zelllinie UW228.2 weitgehend resistent bei einer Behandlung mit den beiden Substanzen zeigte und antagonistische Effekte in der Kombinationsanwendung zu beobachten waren (CI-Wert 37,7 bei einer hohen STABW von +/- 65,9), präsentierte sich die Zelllinie DAOY deutlich sensibler in der Kombination gegenüber den beiden Substanzen (GI<sub>50</sub>-Werte s.o.). Rechnerisch traten bei DAOY bei einer Kombinationsanwendung additive Effekte zu Tage (CI-Wert 0,92; s. Tabelle 5).



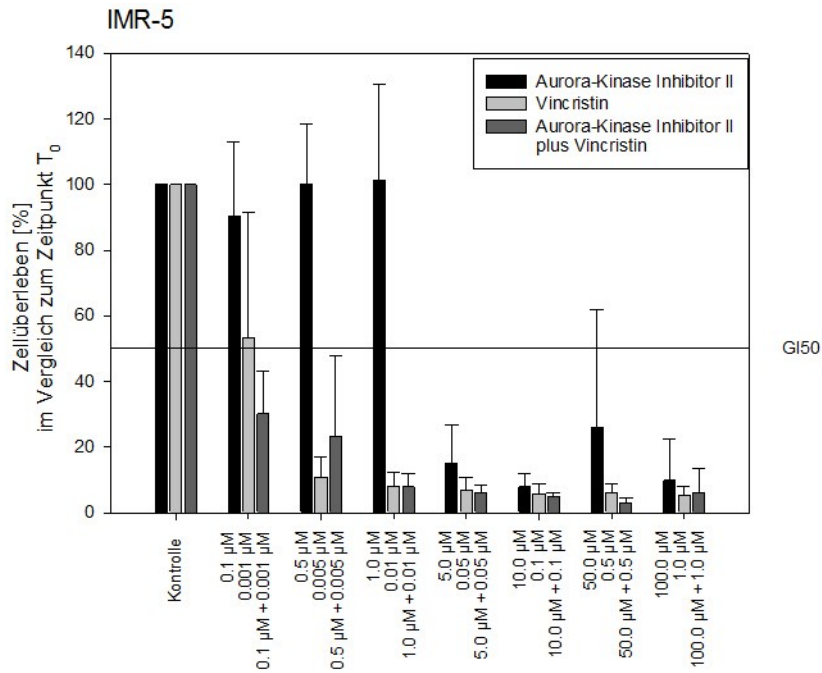
**Abb. 55:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinien DAOY und UW228.2 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

**Neuroblastom-Zelllinien**

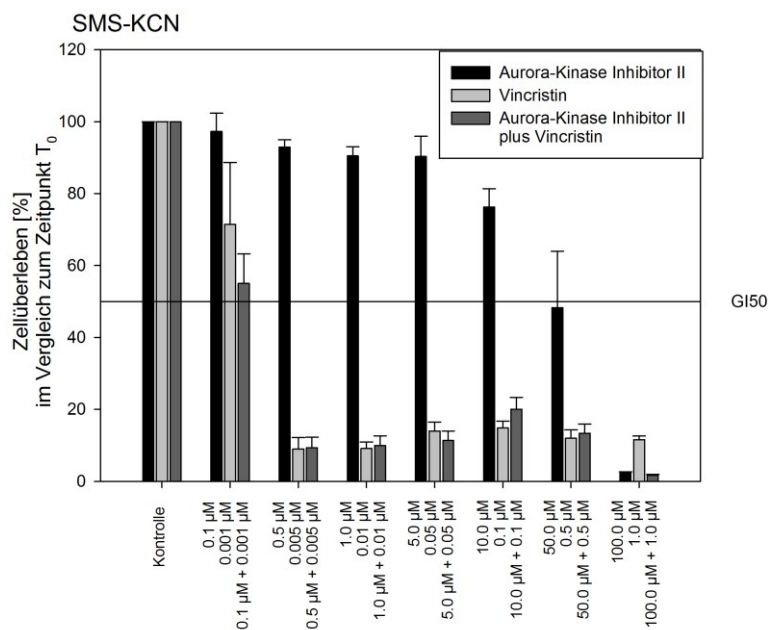
Alle Neuroblastom-Zelllinien zeigten erwartungsgemäß durchgehend eine hohe Sensibilität bei einer Anwendung von Vincristin, welches ein Standardtherapeutikum in der Chemotherapie des Neuroblastoms ist. Besonders sensibel auf den Aurorakinase-Inhibitor II zeigten sich wiederum nur die Zelllinien IMR-5 und SH-SY5Y (s. dazu auch Kapitel 3.3.).

Mögliche additive Effekte einer Kombinationsbehandlung waren für die Neuroblastom-Zelllinien, außer für die Zelllinie SHEP und SH-SY5Y in bestimmten

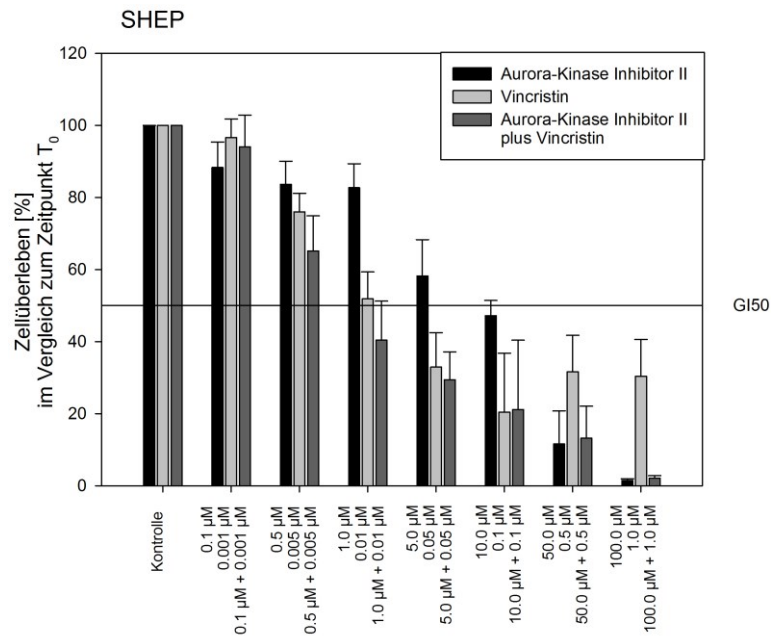
Konzentrationsbereichen (s. Abb. 58 und 59), visuell-deskriptiv nicht zu erkennen. Rechnerisch ergaben sich folgende CI-Werte: IMR-5 0,72, SMS-KCN 0,69, SHEP 0,71 und SH-SY5Y 0,47. Insgesamt ergeben sich rechnerisch somit synergistische Effekte in der Kombinationsanwendung für die gewählten Konzentrationsbereiche.



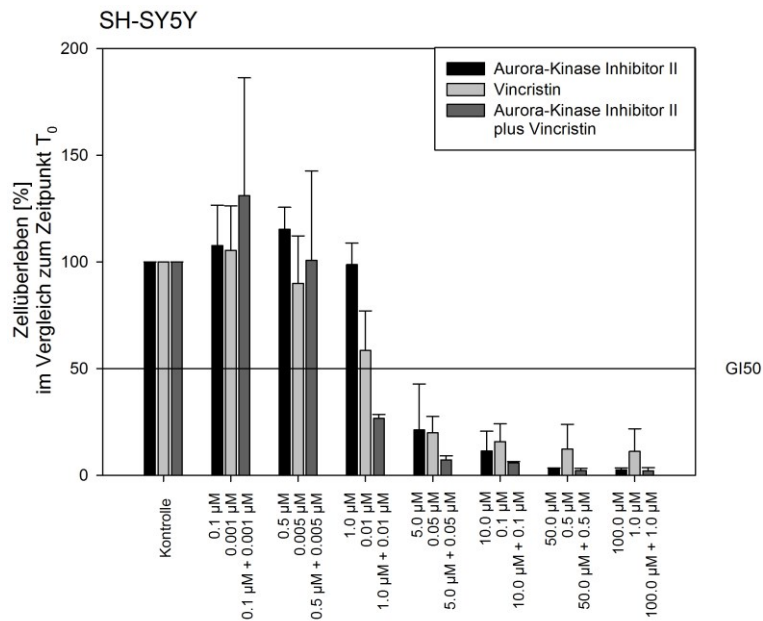
**Abb. 56:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie IMR-5 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 57:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SMS-KCN nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



**Abb. 58:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SHEP nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin



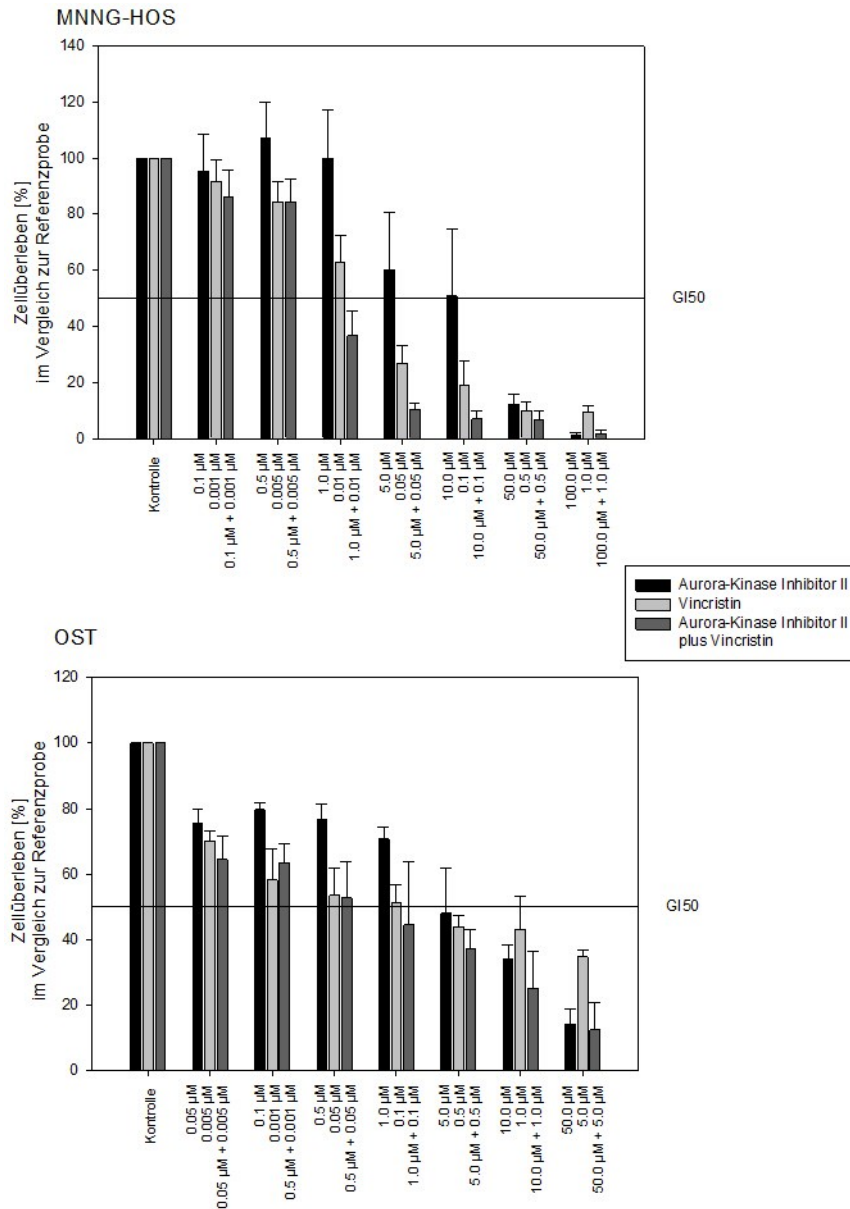
**Abb. 59:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinie SH-SY5Y nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

**Osteosarkom-Zelllinien:**

Für die gewählten Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST erwies sich der Aurorakinase-Inhibitor II nur schwach potent hinsichtlich seiner Zytotoxizität. Kombinierte man diesen mit Vincristin, traten visuell ab jeweils einem mittleren Konzentrationsbereich (1 µM Aurorakinase-Inhibitor II plus 0,01 µM Vincristin) synergistische Effekte auf. Rechnerisch ergaben sich CI-Werte für die Zelllinie OST von



0,68 und für MNNG-HOS von 0,52 (s. Tabelle 5).

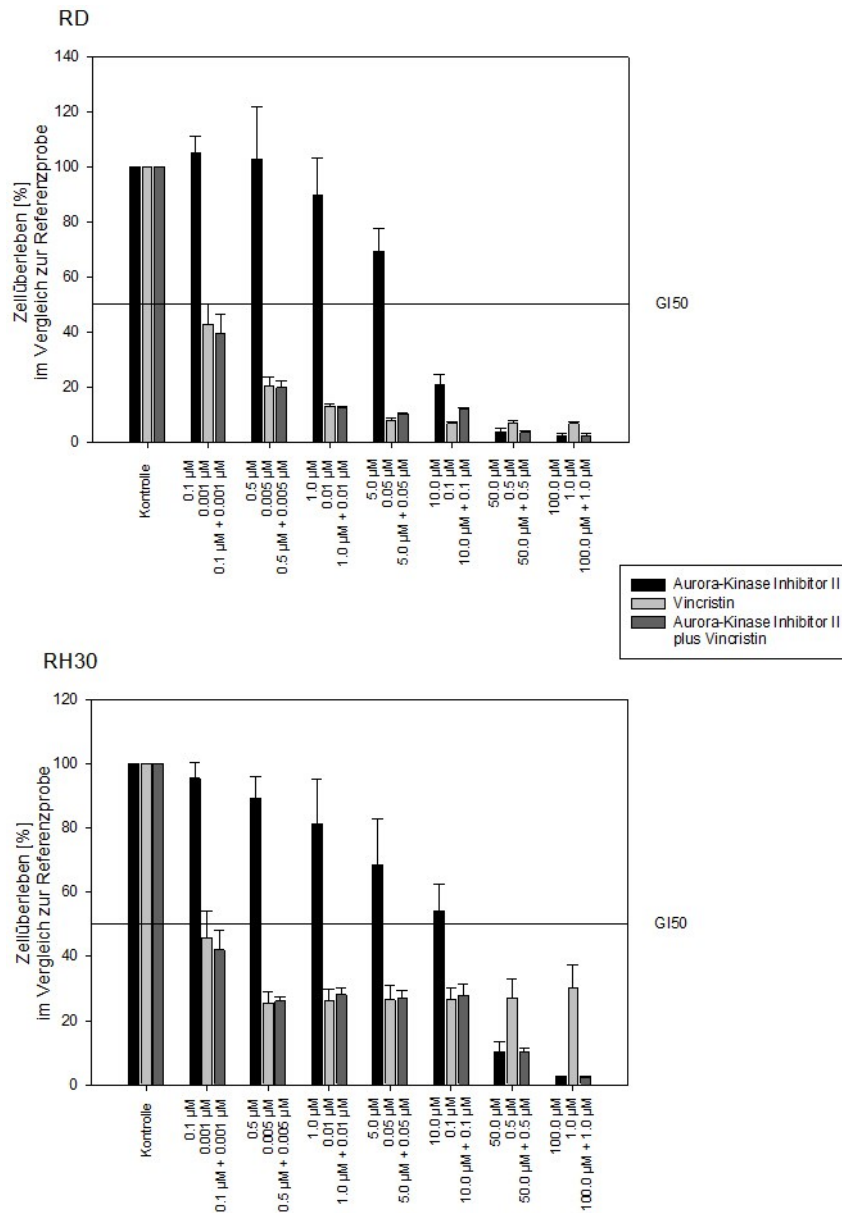


**Abb. 60:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinien MNNG-HOS und OST nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

**Rhabdomyosarkom-Zelllinien:**

Vincristin wies als eines der Standardmittel bei der Chemotherapie von Rhabdomyosarkomen (95) bereits bei niedrig gewählten Konzentrationen eine gute Wirksamkeit auf. In Kombination mit dem sich in der Einzelanwendung als wenig wachstumshemmend im Vergleich zum Gesamtpanel wirkenden Aurora-Kinaseinhibitor II waren visuell keine wesentlichen additiven Effekte zu beobachten. Die Ermittlung der Kombinationsindizes ergab Hinweise auf eine additive Wirkung bei RD (CI-Wert 0,97)

und auf einen mäßigen Synergismus bei RH-30 (CI-Wert 0,83).



**Abb. 61:** Anteil vitaler Zellen der Zelllinien RD und RH-30 nach Gabe des Aurorakinase-Inhibitors II in Kombination mit Vincristin

### 3.6. Zusammenfassung der ermittelten GI<sub>50</sub>-Werte und der Kombinationsindices:

Für die einzelnen Tumorentitäten sind jeweils die Mittelwerte für den GI<sub>50</sub>-Wert sowie die Standardabweichung (STABW) angegeben. Für jeden Versuch wurden jeweils drei Messreihen durchgeführt, bei den Versuchen mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II sechs (s.

Kapitel 2.10.). Aufgelistet sind die entsprechenden Mittelwerte.

**Angabe der GI<sub>50</sub>-Werte:**

Tumor- entität	Zelllinie	Aurorakinase- Inhibitor II		Vincristin		Paclitaxel	
		GI <sub>50</sub> [nM]	STABW [nM]	GI <sub>50</sub> [nM]	STABW [nM]	GI <sub>50</sub> [nM]	STABW [nM]
<b>Ewing- Sarkom</b>	CADO- ES1	4854	2736	51,8	25,2	x	x
	STA- ET-1	8213	2398	2,60	0,25	45,2	15,2
	STA-ET- 2.1	7735	1854	3,19	1,20	27,4	10,9
<b>Leukämie</b>	VH-64	2325	1735	0,91	0,05	28,6	1,67
	CCRF- CEM	3880	574	1,83	1,03	19,3	10,0
	HL-60	2585	404	1,98	0,96	6,19	1,93
<b>Medullo- blastom</b>	MOLT-4	2378	475	1,02	0,49	7,12	2,20
	REH	7308	710	0,42	0,32	4,95	3,50
	DAOY	22003	2931	8,59	1,23	45,7	22,2
<b>Neuro- blastom</b>	UW228.2	36168	11495	366	551	x	x
	IMR-5	3215	886	1,83	1,21	5,53	2,21
	SMS- KCN	45808	14901	2,22	0,92	28,1	2,36
<b>Osteo- sarkom</b>	SHEP	8944	2075	14,8	7,43	43,3	12,3
	SH- SY5Y	3177	627	26,3	6,16	84,6	9,07
	MNNG- HOS	13554	7278	23,6	8,59	32,7	2,73
<b>Rhabdo- myosarkom</b>	OST	x	x	159	159	54,6	27,5
	RD	6917	498	0,88	0,11	4,35	0,19
	RH-30	15171	5329	1,16	0,54	7,06	2,52
<b>Mittelwerte:</b>		<b>11232</b>	<b>± 3354</b>	<b>37,1</b>	<b>± 42,6</b>	<b>27,8</b>	<b>± 7,90</b>

**Tab. 4:** Darstellung der GI<sub>50</sub>-Werte (Angabe der GI<sub>50</sub>-Werte in nM) der Einzelsubstanzen, getrennt nach Zelllinien mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung (STABW).

Anmerkung für die Osteosarkomzelllinie OST konnte nur in 1/6 Versuchen eine GI<sub>50</sub> innerhalb der gewählten Testkonzentrationen ermittelt werden.

<b>Kombinationsindices:</b>			
		<b>Kombination Paclitaxel / Aurorakinase- Inhibitor II</b>	<b>Kombination Vincristin / Aurorakinase-Inhibitor II</b>
<b>Tumorentität</b>	<b>Zelllinie</b>	MW ± STABW	MW ± STABW
<b>Ewing- Sarkom</b>	CADO- ES1	1,52 ± 0,76	1,23 ± 0,47
	STA-ET-1	1,56 ± 0,78	1,44 ± 1,51
	STA-ET- 2.1	0,93 ± 0,55	0,68 ± 0,54
	VH-64	1,51 ± 0,51	1,03 ± 0,06
<b>Leukämie</b>	CCRF- CEM	1,18 ± 0,04	1,09 ± 0,13
	HL-60	1,28 ± 0,18	1,37 ± 0,64
	MOLT-4	1,56 ± 0,24	2,42 ± 0,67
	REH	2,48 ± 2,53	3,93 ± 5,17
<b>Medullo- blastom</b>	DAOY	1,38 ± 0,52	0,92 ± 0,06
	UW228.2	5,31 ± 7,45	37,7 ± 65,9
<b>Neuroblastom</b>	IMR-5	1,83 ± 1,06	0,72 ± 0,60
	SMS- KCN	0,81 ± 0,42	0,69 ± 0,18
	SHEP	0,88 ± 0,29	0,71 ± 0,26
	SH-SY5Y	1,07 ± 0,21	0,47 ± 0,39
<b>Osteosarkom</b>	MNNG- HOS	0,84 ± 0,32	0,52 ± 0,23
	OST	0,74 ± 0,22	0,68 ± 0,19
	RD	1,11 ± 0,54	0,97 ± 0,03
<b>Rhabdo- myosarkom</b>	RH-30	3,15 ± 0,57	0,83 ± 0,24

**Tab. 5:** Darstellung der Interaktion des Aurora-Kinaseinhibitors II in Kombination mit Paclitaxel oder Vincristin anhand von Mittelwerten (MW) der Kombinationsindices. Zusätzlich wurden die Standardabweichungen (STABW) angegeben. In der jeweiligen Kombination wurden Kombinationsindices <0,9 als synergistisch (grün dargestellt), Werte von 0,9–1,1 (schwarz dargestellt) als additiv und >1,1 (rot dargestellt) als antagonistisch erachtet (s. Kapitel 2.10.).

Es existieren weitere Abstufungen (s. Kapitel 2.10.):

CI-Bereich	Bedeutung
<0,1	sehr starker Synergismus
0,1-0,3	starker Synergismus
0,3-0,7	Synergismus
0,7-0,85	mäßiger Synergismus
0,85-0,9	schwacher Synergismus
0,9-1,1	additive Wirkung
1,1-1,2	schwacher Antagonismus
1,2-1,45	mäßiger Antagonismus
1,45-3,3	Antagonismus
3,3-10	starker Antagonismus
>10	sehr starker Antagonismus

### 3.7. Vergleich der zytostatischen Potenz der untersuchten Wirkstoffe:

Die drei eingesetzten Chemotherapeutika zeigten eine unterschiedliche Wirkung auf die verschiedenen Tumorentitäten (Abb. 62, 63, 64), auch innerhalb der Zelllinien selbst. Für die Darstellung wurde der Abstand der GI<sub>50</sub>-Werte der jeweiligen Zelllinie vom Mittelwert aller GI<sub>50</sub>-Werte in einem Box-Plot-Diagramm gewählt. Als besonders resistent werden Zellkulturen angesehen, die eine negative Abweichung vom Mittelwert aufweisen, als sensibel diejenigen mit einer positiven Abweichung.

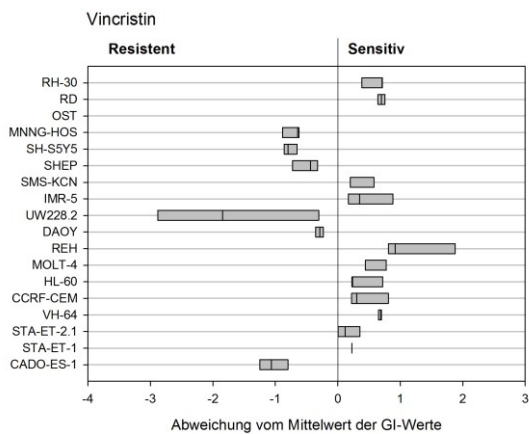


Abb. 62: Übersicht für Inkubation mit Vincristin

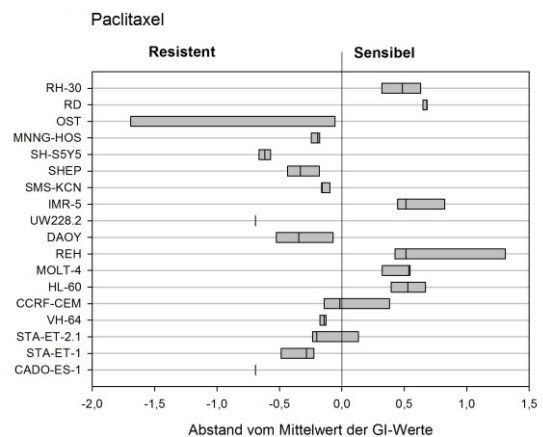
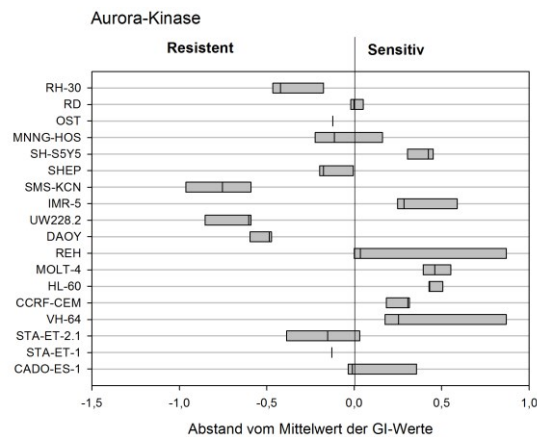


Abb. 63: Übersicht für Inkubation mit Paclitaxel

Während sich Vincristin beim Ewing-Sarkom mit Ausnahme der Zelllinie CADO-ES-1, den Leukämien, besonders bei der Zelllinie MOLT-4, den Neuroblastomzelllinien IMR-5 und SMS-KCN sowie den Rhabdomyosarkomen als effektiv erweist, reagieren auf das Paclitaxel nur die Leukämiezelllinien, die Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 sowie die

Rhabdomyosarkome relativ sensibel im Vergleich zum Gesamtpanel. Als besonders resistent stechen bei beiden Substanzen die Medulloblastom- und die Osteosarkom-Zelllinien wie auch die beiden Neuroblastom-Zelllinien SHEP und SH-SY5Y hervor. Zusätzlich wirkt Paclitaxel nur mäßig zytotoxisch auf die Ewing-Sarkome.



**Abb. 64:** Übersicht für Inkubation mit Aurora-Kinaseinhibitor II.  
Anmerkung: Für die Osteosarkomzelllinie OST konnte nur in 1/6 Versuchen eine  $GI_{50}$  innerhalb der gewählten Testkonzentrationen ermittelt werden.

Der Aurora-Kinaseinhibitor II bietet ein ähnliches Wirkspektrum wie die beiden etablierten Mitosegifte (Abb. 64). Vor allem die Ewing-Sarkome, speziell die Linien VH-64 und CADO-ES-1, und die getesteten Leukämie-Zelllinien, aber auch die Neuroblastom-Zelllinien IMR-5 und SH-SY5Y zeigen eine größere Sensibilität. Anders als Vincristin wirkt der Aurora-Kinaseinhibitor II auch relativ zytotoxisch auf die Zelllinie CADO-ES-1 im gewählten Konzentrationsbereich. Als relativ resistent erweisen sich die Neuroblastom-Zelllinie SMS-KCN, die Medulloblastome, mäßig resistent die Osteosarkome. Bei den Rhabdomyosarkomen stellt sich der Aurorakinase-Inhibitor II im gewählten Konzentrationsbereich in Bezug auf das Gesamtpanel vergleichsweise weniger wirksam als die beiden konventionellen Spindelgifte dar.

### 3.8. Auswertung der RNA-Expression-Tests:

Der Versuch wurde getrennt für die beiden Aurorakinasen A und B an allen Zelllinien durchgeführt. Die Messdaten dazu finden sich im Anhang (Kapitel 7; zur Durchführung und internen Kontrolle s. Kapitel 2.6.). Für die Versuche waren zuvor Zellpellets hergestellt und für die spätere RNA-Isolation tiefgefroren worden (s. Kapitel 2.5). Es wurde jeweils die basale mRNA-Expression vor Zugabe der Testsubstanzen gemessen.

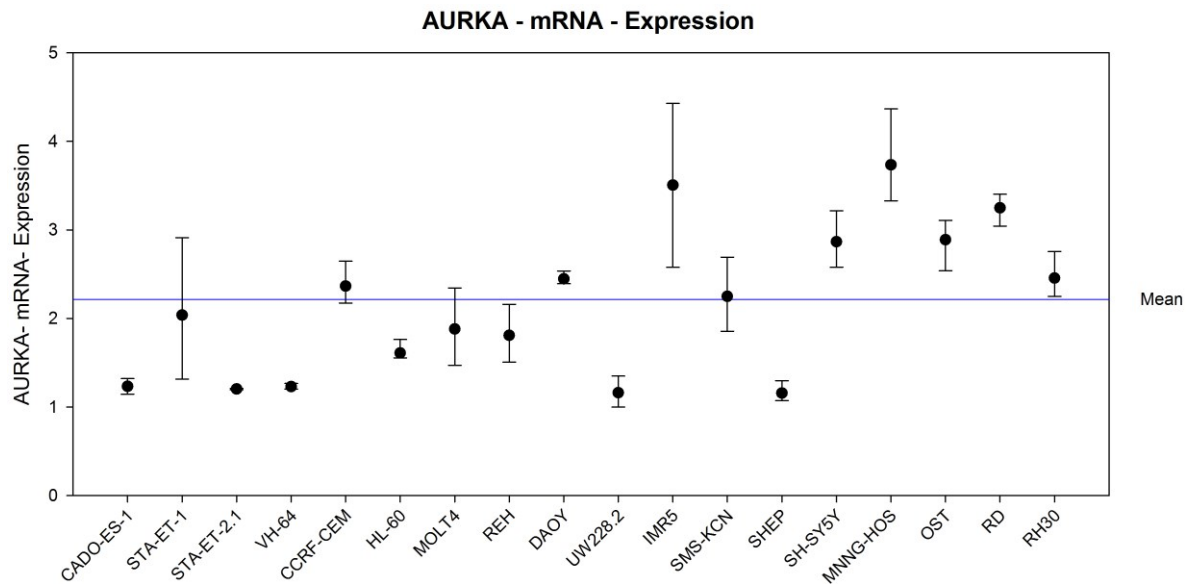


Abb. 65: AURKA-mRNA-Expression dargestellt für die einzelnen Zelllinien

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aurorakinase A-Expression unabhängig von einer möglichen Wachstumshemmung des Aurora-Kinaseinhibitors II war. Die mRNA-Expression bei besonders sensibel auf die Behandlung mit dem Kinaseinhibitor reagierenden Zelllinien, wie den Ewing-Sarkom- oder den Leukämiezelllinien, war nicht höher als bei der weitgehend resistenten Zelllinien UW228.2 oder SHEP. Eine überdurchschnittliche mRNA-Expression zeigten die sensible Zelllinie IMR-5 und die eher resistenten Osteosarkom- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien.

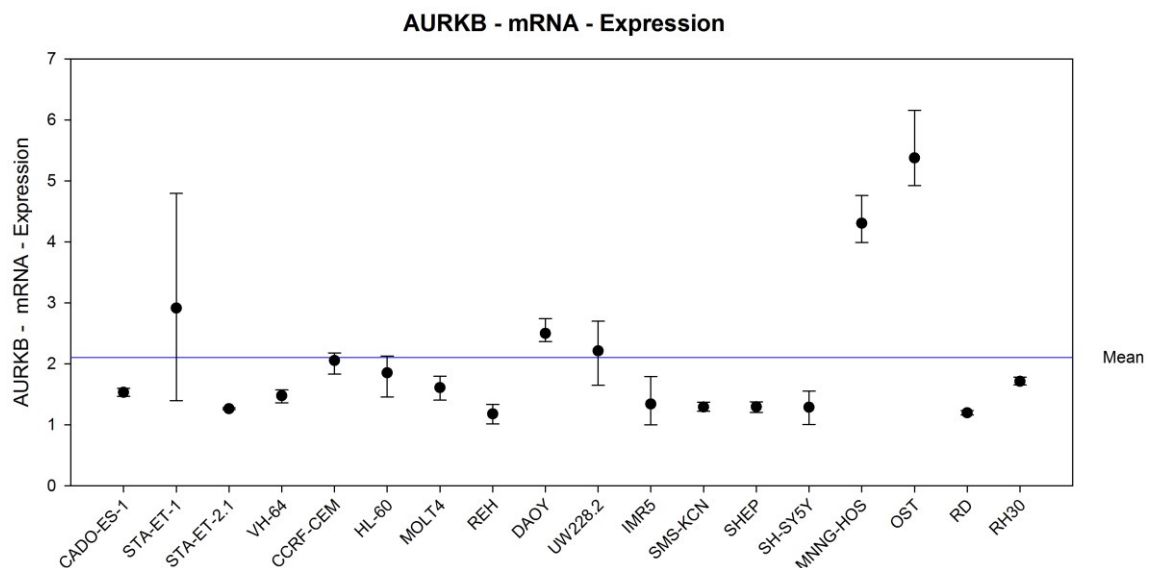


Abb. 66: AURKB-RNA-Expression dargestellt für die einzelnen Zelllinien

Ähnliches galt, wenn man die Höhe der mRNA-Expression der Aurorakinase B mit der

zytotoxischen Wirkung des Aurora-Kinaseinhibitors II verglich. Die gemessenen mRNA-Spiegel waren weitgehend unabhängig eines erzielten zytotoxischen Effektes nach Behandlung mit dem Inhibitor. Lediglich die beiden Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST zeigten eine überdurchschnittliche mRNA-Expression der Aurorakinase B im Vergleich zum Gesamtpanel bei allerdings nur mäßigen in-vitro-Ansprechen auf die Behandlung mit dem hier verwendeten Aurorakinaseinhibitor II.

In der zusammenfassenden statistischen Aufarbeitung mittels Pearson-Produkt-Moment-Korrelation ergab sich nach Korrelation mit der  $GI_{50}$ , der  $LC_{50}$  und der Generationszeit (PD) mit der Expression für jeweils AURKA und AURKB kein signifikanter Zusammenhang bis auf die Generationszeit bezogen auf die Höhe der AURKB-Expression ( $p=0,016$ , Korrelationskoeffizient  $r=0,558$ ).

N=18 (Zelllinien)	AURKA	AURKB
$GI_{50}$	0,844	0,818
$LC_{50}$	0,458	0,924
PD	0,32	0,016 :
AURKA		0,112

**Tab. 6:** Darstellung der p-Werte (Korrelation der RNA-Expression der AURKA sowie der AURKB jeweils im Vergleich zur  $GI_{50}$ ,  $LC_{50}$ , Generationszeit (PD) und der AURKA/AURKB), Signifikanzniveau bei  $p<0,05$  angenommen. Für die Zelllinien wurde jeweils der Mittelwert aus insgesamt allen Versuchsansätzen für die  $GI_{50}$ ,  $LC_{50}$  und PD bestimmt. Die Daten zu den Generationszeiten, der  $LC_{50}$  und der Höhe der mRNA-Expression für die AURKA und AURKB finden sich im Anhang, Kapitel 7.

### 3.9. Auswertung der Western Blots:

Ein Nachteil der Anwendung von RNA-Expressionsanalysen ist eine mögliche Verzerrung in der Beurteilung der letztlich auch auf Proteinebene translatierten RNA. Darüber gibt dieses Verfahren keine Auskunft. Wenn man also eine zusätzlich Aussage über die Höhe von in vivo vorhandenen Aurorakinasen treffen möchte, bedarf es eines zusätzlichen Verfahrens, nämlich des Western Blots.

Entsprechende Untersuchungen wurden daher zur Quantifizierung der Menge an schließlich translaterter Aurora A und B durchgeführt. Zugrunde liegende Fragestellung

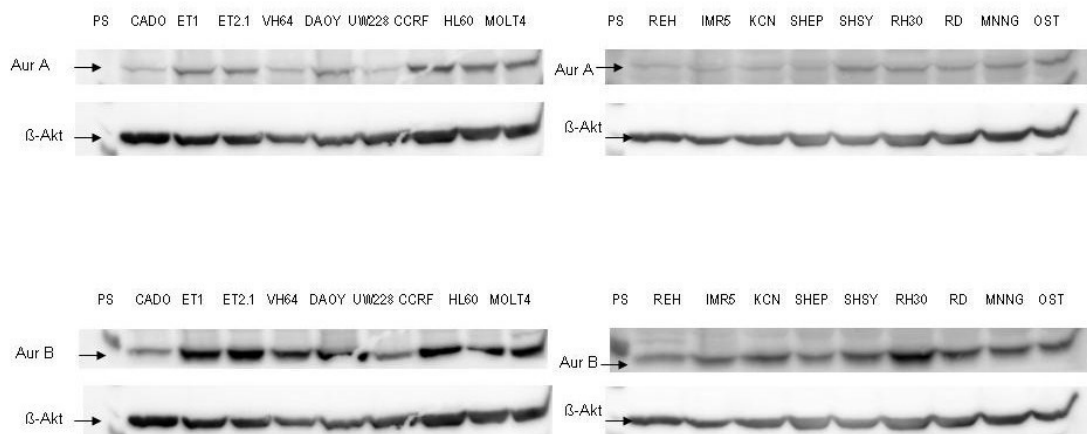


für diesen Versuch war: Würden die besonders sensibel auf eine Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor reagierenden Zelllinien eine besonders hohe Expression der Aurora A und B auf Proteinebene zeigen?

Als Vergleichswert wurde für jeden Blot das ubiquitär vorhandene Strukturprotein  $\beta$ -Aktin detektiert. Es zeigte sich in den getrennt für Aurora A und B durchgeführten Western Blots, dass die besonders gegenüber dem Kinaseinhibitor sensiblen Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET-1, STA-ET-2.1 und die drei Leukämie-Zelllinien CCRF-CEM, HL60 und MOLT4 auch besonders viel Aurora A exprimierten.

Bei der Auswertung für die Expression der Aurora B zeigten zusätzlich auch die beiden anderen Ewing Sarkom-Zelllinien VH64 und CADO-ES-1, sowie die Rhabdomyosarkom-Zelllinien RH-30 und RD höhere Werte. Zusammenfassend zeigte sich für alle im Panel befindlichen Zelllinien eine erhöhte Expression der Aurorakinase B, auch bei den Zelllinien, die nicht besonders sensibel auf eine Behandlung mit dem Aurorakinaseinhibitor reagierten, wie z.B. die beiden Osteosarkomzelllinien OST und MNNG-HOS.

Die Intensität der Bandenfärbung kann allerdings auch abhängig von der Antikörperbindung des jeweils verwendeten Antikörpers variieren.



**Abb. 67:** oberer Bildteil: obere Bande Expression von Aurora A; untere Bande  $\beta$ -Aktin als Vergleich; PS=Laufmarker; die Namen der getesteten Zelllinien befinden sich jeweils über der Bande; unterer Bildteil: gleiche Art der Auftragung nur für Aurora B

## 4. Diskussion:

Neben den in der Einleitung gestellten Fragestellungen sollen weitere diskutiert werden. So geht es z.B. um die Frage, ob die Auswahl des hier verwendeten Zellpanels eine Diskussionsgrundlage für allgemeingültige Aussagen zur Wirksamkeit bieten kann. Besonderes Augenmerk soll auf die Wirkung der Aurora-Kinaseinhibitoren auf pädiatrische Tumoren gelegt werden. Weiterhin soll die Wertigkeit des hier verwendeten MTT-Assays und darüber hinaus gehend der Wert von in vitro-Messungen im Allgemeinen beleuchtet werden.

Abschließend sollen die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse getrennt nach den einzelnen Substanzen bzgl. ihrer Wirksamkeit als auch im Lichte der aktuellen Literatur erörtert werden.

Anfänglich hatten sich folgende Fragestellungen ergeben, welche abschließend unter 4.13. nochmals kurz beantwortet werden sollen:

- Sind Aurorakinasen zytotoxisch gegen pädiatrische Tumorzelllinien? → s. dazu 4.7.
- Ist das an pädiatrischen Tumorzelllinien bisher wenig erforschte Paclitaxel (Taxol®) eine zusätzliche Möglichkeit zum etablierten Vincristin? → s. dazu 4.6.
- Kann mit einer Kombination, im Speziellen mit etablierten Hemmern des Spindelapparates, eine Dosisreduktion erreicht werden? Oder bestehen antagonistische Effekte? → s. dazu 4.9. und 4.10.
- Korreliert die Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Aurorakinase mit deren Expression durch die verschiedenen Tumoren? → s. dazu 4.11.

### 4.1. Auswahl Zellpanel:

Vergleicht man die Auswahl der einzelnen Tumorentitäten mit dem statistischen Auftreten bezogen auf das Tumorregister (s. Abb. 5), entspricht die Gewichtung des verwendeten Panels in etwa der Häufigkeit des Auftretens kindlicher Tumore, welche in ihrer jeweiligen Behandlung als elementaren therapeutischen Bestandteil auch eine Chemotherapie beinhalten. Ausnahmen, welche hier nicht berücksichtigt wurden, bilden

zum einen das Nephroblastom (Wilmstumor) und die Lymphome (s.a. Kapitel 2.2.).

Zudem muss die Aussagekraft der gewählten Zelllinien innerhalb der Tumorentitäten berücksichtigt werden.

Exemplarisch müssen gerade bei der Behandlung kindlicher Leukämien genetische Subentitäten bezüglich ihrer prognostischen Relevanz in Betracht gezogen werden. In dem hier gewählten Panel sind dies zwei T-ALL-Klone, ein AML-Klon und ein B-ALL-Klon (s.a. Kapitel 2.2.). Dieses wird der genetischen Heterogenität dieser Tumoren nicht gerecht. Aufgrund des epidemiologischen Überwiegens von Formen der B-ALL im Kindesalter entspricht die hier gewählte Verteilung der Zellkulturen auch nicht der Realität. Allerdings bestand der initiale Ansatz bei der Zusammenstellung des hier verwendeten Panels nicht darin, eine epidemiologische Abbildung der Verteilung pädiatrischer Tumore darzustellen, sondern orientierte sich bei der Auswahl der Zelllinien daran, Hochrisikopatienten abzubilden.

Hat man eine Tumorentität als sensibel für eine bestimmte Substanz erkannt, sollte man daher im Nachhinein verschiedene repräsentative Subentitäten in-vitro Assays bezüglich möglicher genetisch vermittelter Resistenzmechanismen unterziehen.

Viele der permanenten Zellkulturen entstammen vorbehandelten oder besonders therapieresistenten Patienten und wurden ggfs. noch chemisch modifiziert (z.B. MNNG-HOS, s. Kapitel 2.2.2.).

#### **4.2. Auswahl der Substanzen und Versuchsdurchführung:**

Für diese Arbeit wurde der Aurora-Kinaseinhibitor II = 4-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-Dimethoxyquinazoline, ein Inhibitor der AURKA und AURKB, von Calbiochem verwendet. Mittlerweile sind viele derartiger Inhibitoren mit unterschiedlichem Wirkprofil bekannt, welche sich in verschiedenen Phasen der präklinischen Entwicklung oder bereits in Phase I- oder II-Studien befinden (24). Der für diese Arbeiten verwendete Inhibitor hat keine Anwendung in klinischen Studien gefunden, sondern wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und hohen Proteinbindung nur zu Forschungszwecken verwendet (77). Aufgrund fehlender klinischer Daten für diese Substanz lassen sich daher nur allgemeine Aussagen zur Wirkungsweise machen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme der zugrundeliegenden Experimente (2006) war diese Substanz eine der wenigen frei verfügbaren.

Geht man von eventuellen Gruppeneffekten dieser neuen Substanzklasse aus, lassen sich sicherlich Aussagen zur allgemeinen Wirksamkeit der Aurorakinaseinhibitoren auf das hier verwendete Zellpanel treffen.

Aussagen insbesondere zu dezidierteren Fragestellungen wie zur Pharmakokinetik lassen sich nicht einfach verallgemeinern.

Diskussion der Datenqualität:

Ein entscheidendes Kriterium zur Beurteilung der hier gefundenen Ergebnisse und damit einhergehend eine weitergehende Diskussion ist die Datenqualität. Es wurden mit Ausnahme für die Aurokinaseinhibitoren nur drei Wiederholungen für jeden Versuchsansatz durchgeführt.

Die Toxizitätstests wurden jeweils unter gleichen Testbedingungen (u.a. vergleichbare Passagierzahl der Zellkulturen, vergleichbare Zellanzahl von 5000 Zellen/ $\mu$ l und Well) angestrebt und die jeweiligen Versuche jeweils in drei Messreihen im Abstand von mehreren Wochen angesetzt.

Es lassen sich gerade bei Konzentrationen, welche besonders toxisch für die jeweiligen Zelllinien sind, besonders hohe Standardabweichungen innerhalb der gemessenen  $GI_{50}$ -Werte finden.

Zur Diskussion der Variabilität sei auf die Ausführungen in Kapitel 2.10. verwiesen. Insbesondere bei niedrigen Zellkonzentrationen zeigen sich dann die Limitationen des MTT-Tests (s. Kapitel 4.4.), (32).

### **4.3. Vergleichbarkeit von in vitro Daten mit in vivo Daten: Pharmakodynamik, -kinetik:**

Die aus den hier verwendeten in-vitro assays gewonnenen Daten sind aufgrund ihres experimentellen Charakters nur limitiert in ihrer Aussagekraft auf einen menschlichen Organismus übertragbar (13). So kommen die Tumorzellen hier direkt mit den Testsubstanzen in Kontakt ohne möglicherweise vorher, wie es im menschlichen Körper geschieht, noch metabolisiert zu werden. Die Pharmakodynamik, Pharmakokinetik bzw. die resultierende Plasmahalbwertszeit unterliegen häufig großen interindividuellen Schwankungen. Auch können die Applikationsart, das Dosierungsintervall und Interaktionen einen Einfluss auf den tatsächlichen Wirkspiegel haben. Schließlich besteht

in vitro das Tumorgewebe aus einem Monolayer relativ homogener Tumorzellen, welche einem relativ genetisch stabilen Tumorklon entstammen.

Das in vivo Tumormodell versteht man dahingegen heute als einen heterogenen Zellverband mit eventuell genetisch nicht mit dem Primärtumor identischen Subklonen eingebettet in ein vaskularisiertes Tumorstroma.

Im menschlichen Organismus unterliegen viele Substanzen darüber hinaus einer natürlichen Barrierefunktion, wie z.B. der Blut-Hirn-Schranke oder müssen aufgrund der Magen-Darmschranke parenteral appliziert werden, um überhaupt einen Wirkspiegel aufbauen zu können.

Eventuellen komplexen Verhältnissen im Tumor, Interaktionen mit weiteren Metaboliten, Co-Medikamenten oder einer eventuellen immunabwehr-vermittelten Antwort durch den Wirtmechanismus kann nur durch den Sprung zum Tiermodell oder später durch klinische Studien Rechnung getragen werden.

Zusätzlich kann eine Substanz selbst mit minimaler Hemmstoffkonzentration und großer therapeutischer Breite in bestimmten Konzentrationsbereichen bereits dosislimitierende vorher nicht absehbare Nebenwirkungen, wie z.B. eine Verlängerung der QT-Zeit, erwirken.

Es ist möglich, dass die Substanzen (für den hier verwendeten Aurorakinase-Inhibitor ist es im Gegensatz zu den etablierten Substanzen wie Vincristin und Paclitaxel schwieriger, entsprechende in vivo-Vergleichsdaten zu bekommen) vor dem Hintergrund der oben ausgeführten Limitationen gar nicht die notwendigen Plasmakonzentrationen unter den gesagten Limitationen erreichen, um eine entsprechende Wirkung wie in vitro zu entfalten.

Trotzdem ist eine in vitro-Testung gerade bei relativ seltenen Tumorentitäten wie den pädiatrischen sinnvoll, da sie helfen können aus einer Vielzahl als im Vorfeld potentiell antineoplastisch geltender Stoffe eine Vorauswahl zu treffen, diese dann bezüglich ihrer Wirkung, eventueller Resistenzmechanismen und möglichen Interaktionen mit anderen Substanzen zu testen und erst dann über den Einsatz am Tiermodell nur die vielversprechendsten in klinischen Studien zu prüfen. Gerade bei kindlichen Tumoren mit nur wenigen Patienten ist dies vor Planung einer Studie geboten.

Durch in vitro-Testungen kann die oben angesprochene genetische Vielfalt von Subklonen eines Tumors oder interindividuellen Varianten einer Tumorentität gezielt berücksichtigt werden, indem es ermöglicht wird, nur spezifisch wirksame Einzelsubstanzen oder Therapieregime vorab zu testen. So können später ineffektive

Therapeutika dem Patienten erspart werden und durch die Auswahl nur der in vitro wirksamen Substanzen die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens erhöht werden.

Bezüglich der Prädiktivität einer in vitro gemessenen Chemosensitivität mit einer in vivo assoziierten Wirkung existieren für verschiedene Tumormodelle und Untersuchungsmethoden Beobachtungen (13). Trotz der oben beschriebenen Limitationen zeigten sich beispielhaft an einer Untersuchung von Proben von 120 Patientinnen mit Ovarial-Karzinom signifikante Übereinstimmungen ( $p < 0.0001$ ) zwischen der gemessenen in vitro- und der beobachteten in vivo-Aktivität mittels MTT-Assays. Es wurde ein positiv prädiktiver Wert für eine spätere Therapieresistenz von 83% erreicht (115). In einer weiteren Arbeit konnte für 22 evaluierbare Patienten mit unterschiedlichen Arten von Tumoren ein Gesamtvorhersagewert mittels MTT-Assays von 86,4% ermittelt werden. Bei 18 von 22 Patienten, für die im in-vitro-Test eine fehlende Chemosensitivität festgestellt wurde, zeigte sich auch klinisch kein Ansprechen (34).

#### **4.4. Aussagekraft des verwendeten MTT-Assays:**

Der MTT-Assay bringt in seiner Anwendung (wie unter Kapitel 2.4. beschrieben) einige testbedingte Limitationen mit sich. So kann z.B. nicht diskriminiert werden, ob eine nur zytostatische Wirkung oder auch eine zytotoxische Wirkung erreicht werden kann. Es wird schließlich bedingt durch die Wirkungsweise des Assays nur die Zahl der stoffwechselaktiven Zellen bestimmt (82). Zusätzlich ist ein Waschvorgang notwendig. Gerade bei nicht adhären oder in Suspension wachsenden Zellen kann dies nachteilig sein.

Es kann also sein, dass eine scheinbar höhere Wirksamkeit des Tests bezüglich einer zellabtötenden Wirkung der untersuchten Substanzen suggeriert wird, als sie tatsächlich stattgefunden hat (14), (102). Damit kann die Wirkung einzelner Substanzen möglicherweise überschätzt werden.

Eine Alternative zu diesem methodisch allerdings sehr leicht durchführbaren Test ist eine durchflusszytometrische Bestimmung der in die Apoptose gegangenen Zellen (z.B. mittels vorheriger Färbung mit Propidiumiodid und eines Annexin V-Fluoreszenz und anschließender Bestimmung der Zellen in der FACS-Untersuchung). Aufgrund des erhöhten Aufwandes ist der letztgenannte Test für ein Routine-Screening zunächst weniger geeignet.

Eine weitere Möglichkeit bietet ein Fluoreszenz-basiertes Assay, z.B. der sogenannte DIMSCAN (fluorescence digital image microscopy system) (32).

In vielen Laboren werden für die Viabilitätsmessung auch Colony-Assays angewendet, welche deutlich arbeitsintensiver sind, längere Inkubationszeiten bedeuten und auch keine Substratwechsel ermöglichen (13), (54).

Für den MTT-Test ist eine ausreichende Zellzahl notwendig und das Substrat sollte ausreichend sein. Ist der Zellrasen zu dicht, liegt schnell ein limitierender Substratmangel vor und die Zellen sterben frühzeitig. Sind deutlich zu wenige Zellen vorhanden, sinkt die Reproduzierbarkeit der photometrischen Messungen. Zusätzlich korreliert die Formazan-Kristallbildung mit dem pH-Wert und den Eigenschaften der Lösungsmittel. Die Vitalitätsmessung sollte zudem immer rechtzeitig erfolgen, da sich nach kurzer Zeit Färbungsveränderungen ergeben können (14), (102).

Der Vorteil des MTT-Assays liegt in seiner guten Realisierbarkeit auch unter einfachen Laborbedingungen ohne Notwendigkeit aufwendigerer Apparaturen. Darüber hinaus eignet sich der Test, schnell große Mengen an Zellansätzen parallel zu untersuchen und ist gut validiert (49). Der Test ist damit im Sinne einer Priorisierung geeignet, schnell eine Vorauswahl potentiell zytotoxischer Substanzen zu treffen. Zur Prädiktivität von MTT-Assays bezüglich einer Abschätzung der Wirkung *in vivo* s. Kapitel 4.3-, (34), (115)

#### **4.5. Inkubation mit Vincristin:**

Vincristin wird erfolgreich in verschiedenen Therapieprotokollen zur Behandlung der Ewingsarkome (VIDE-, VAI-, VAC-Schemata), bei der ALL, Lymphomen und Sarkomen u.a. Entitäten eingesetzt (s. Kapitel 1.3.2.). Üblicherweise erfolgt die Applikation in einer Dosierung von 1,5 mg/m<sup>2</sup>/d im jeweiligen Zyklus. Pharmakokinetische Daten zur Behandlung pädiatrischer Patienten liegen nur begrenzt vor (22), (40), (47), (80). Die Intra- bzw. Interpatientenvariabilität ist groß und hängt anscheinend v.a. von der primären Diagnose ab (40).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein unterschiedliches Ansprechen für mit Vincristin inkubierte Zellen (s. auch Kapitel 3.7.). Die GI<sub>50</sub>-Werte zeigten eine große Schwankungsbreite über drei Logstufen, angefangen bei der besonders gegenüber Vincristin sensiblen Leukämie-Zelllinie REH mit einer GI<sub>50</sub> von 0,42 nM bis zur besonders resistenten Ewingsarkom-Zelllinie CADO-ES1 mit einer GI<sub>50</sub> von 51,8 nM (s. auch Kapitel 3.6.). Für die besonders resistenten Zelllinien OST und UW228.2 konnte

keine spezifische  $GI_{50}$  in diesem Ansatz aufgrund einer großen Schwankungsbreite der Werte zueinander errechnet werden. Als besonders wirksam erwies sich Vincristin bei den Leukämie-, Rhabdomyosarkom- und Ewingsarkomzelllinien. Dieses deckt sich mit der aktuellen Indikation der Substanz bei pädiatrischen Tumoren (s. Kapitel 1.3.2).

Bezüglich der Vergleichbarkeit mit den in der Literatur angegebenen Werten für die  $GI_{50}$  oder  $LC_{50}$  sind zum einen die niedrige Anzahl der Versuchsansätze mit nur  $N=3$  mit den daraus resultierenden hohen Standardabweichungen der Werte zueinander (s. Kapitel 4.2) und zum anderen die systemimmanenten Limitationen des MTT-Tests (s. Kapitel 4.4.) entscheidend. Es ergeben sich also nur Anhaltspunkte für einen möglichen Wirkungsbereich *in vivo* (s.a. Kapitel 4.3).

Für die deutlichen Unterschiede der Wirkung auf die verschiedenen Tumorentitäten können u.a. tumoreigene Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht werden.

Sowohl bei Vincristin als auch bei Paclitaxel besteht das Problem der Resistenzvermittlung durch das Tunnelprotein Pgp (P-Glykoprotein). Dieses übt eine ATP-abhängige Pumpfunktion aus (45). Dadurch werden für die Zelle potentiell toxische Substanzen gegen das Konzentrationsgefälle energieabhängig wieder aus der Zelle geschleust. Sowohl Vincristin als Paclitaxel können eine höhere Pgp-Expression der Zelle induzieren. Zellen mit höherer Pgp-Expression sollten also resistenter sein. Dies lässt sich am Beispiel der gewählten Ewingsarkomzelllinien aufzeigen: Die Zelllinie CADO-ES1 (Rang 16 im Panel) mit einer besonders hohen Pgp-Expression zeigt sich besonders resistent im Vergleich zu VH64 (Rang 3 im Panel). Es ist die fünfzigfache Menge Vincristin notwendig, um die gleiche wachstumshemmende Wirkung zu erreichen wie bei VH64.

Für die heterogene Sensitivität der Zelllinien bezüglich der verschiedenen Testsubstanzen spielt neben den verschiedenen Resistenzmechanismen auch das Proliferationsverhalten der Zellen eine große Rolle: Substanzen mit phasenspezifischer Wirkung haben bei gleicher Inkubationsdauer bei Zelllinien mit kurzer Generationszeit einen besseren Effekt als bei Zelllinien mit langer Generationszeit. Für die drei hier getesteten Substanzen ist es die Mitosephase. So zeigten die Leukämie und Ewing-Sarkom-Zelllinien mit Ausnahme von CADO-ES-1 bei denen Generationszeiten von 16,3-78,3 h gemessen wurden, unter 72 h-Inkubation mit dem phasenspezifischen Vincristin deutlich niedrigere Hemmstoff-Konzentrationen als bei den relativ resistenten Medulloblastomzelllinien UW228 und DAOY (51,5 h und 47,5 h). Eine Ausnahme davon bilden die



Neuroblastomzelllinien. Hier zeigen sich die beiden Zelllinien IMR-5 und SMS-KCN sensitiv trotz hoher Generationszeit (40,4 und 49,9 h) (s. dazu Kapitel 3.7., 4.8., Angabe der ermittelten Generationszeiten im Anhang, Kapitel 7) gegenüber einer Vincristin-Exposition (Rang 7 und 9 im Panel).

Die unterschiedliche Chemosensitivität von Zelllinien der gleichen Tumorentität zeigt die Notwendigkeit auf, Zelllinien mit verschiedenen Charakteristika für die in-vitro-Testung auszuwählen, um den Tumor näherungsweise in seiner biologischen Vielfalt darzustellen.

#### **4.6. Inkubation mit Paclitaxel:**

Ähnlich wie bei der Mono-Anwendung mit Vincristin zeigt sich auch am mit Paclitaxel getesteten Panel ein unterschiedliches Ansprechen mit einer Verteilung der GI<sub>50</sub>-Werte von 4,35 nM bei der Rhabdomyosarkomlinie RD bis zu 84,6 nM bei der Neuroblastomlinie SH-SY5Y, wobei für die Linien CADO-ES1, UW228.2 und OST bei besonders hoher Resistenzlage keine GI<sub>50</sub> dokumentiert werden konnte.

Insgesamt zeigten sich auf das Paclitaxel nur die Leukämiezelllinien, die Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 sowie die Rhabdomyosarkome relativ sensibel im Vergleich zum Gesamtpanel.

Eine besondere Paclitaxel-Resistenz kann wie beim Vincristin durch zelleigene Resistenzmechanismen beispielhaft durch eine erhöhte Pgp-Expression erklärt werden. Dies scheint ein wichtiger Resistenzmechanismus bei mit Paclitaxel behandelten Zellen zu sein (45). Für die Zelllinie CADO-ES1 ist eine besonders hohe Pgp-Expression bekannt, welches u.a. die besondere Resistenzlage erklären könnte.

Paclitaxel wurde innerhalb einiger Phase I/II-Studien bei pädiatrischen Patienten mit refraktären oder rezidivierten Tumoren bereits untersucht (sieben Studien, Stand November 2014, fünf mit Paclitaxel als Monotherapie, zwei in Kombination mit anderen Chemotherapeutika) (56), (110). Die dokumentierten (dosislimitierenden) Nebenwirkungen glichen denen von erwachsenen Patienten, insbesondere Neuropathie, Anaphylaxie und Myelosuppression. Die empfohlene Dosis sind 350 mg/m<sup>2</sup> über 24 h alle drei Wochen (110). Innerhalb der Studien wurden auch die wöchentliche Applikation von Paclitaxel sowie andere Dosierungen getestet (55).

In einer Phase II-Studie an 73 pädiatrischen Patienten mit progredienten oder rezidivierten Hirntumoren, darunter 16 mit Medulloblastom, wurde Paclitaxel als Monotherapie angewandt. Es zeigte sich bei den 70 auswertbaren Patienten lediglich eine

Ansprechrate von kumulativ 5,7% (eine komplette Remission und drei partielle Remissionen) (57).

Ähnlich ernüchternde Ergebnisse ergaben sich aus einer Phase I-Studie, um das antileukämische Potenzial von Paclitaxel in der Monotherapie zu ergründen. Unter 54 auswertbaren, bereits vorbehandelten Patienten war die objektive Ansprechrate <10% (Nachweis einer kompletten Remission bei einem Patienten sowie einer partiellen Remission bei drei Patienten) (55). Eine andere Phase I-Studie zeigte in Kombination mit Ifosfamid bei bereits vorbehandelten, refraktären pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren bei acht von 14 Patienten ein Ansprechen mit mindestens einer stabilen Erkrankungssituation (38).

Insgesamt zeigen die bisherigen aus Phase I-Studien gewonnenen Daten für allerdings massiv vorbehandelte pädiatrische Patienten mit Leukämien oder soliden Tumoren für die Monotherapie mit Paclitaxel kein gutes Ansprechen (51).

Innerhalb des „Pediatric Preclinical Testing Program“ wurde nab-Paclitaxel, eine durch Albumin-stabilisierte Nanopartikel-Formulierung von Paclitaxel, an verschiedenen Zelllinien und Tumormodellen pädiatrischer Tumore (Rhabdomyosarkomen, Neuroblastomen und Osteosarkomen) getestet. Ziel dieses US-amerikanischen Programms ist es, systematisch neue Wirkstoffe an Modellen kindlicher solider Tumore und Leukämien zu untersuchen (in vitro an Zellkulturen und in vivo an murinen Xenograft-Modellen), um die Behandlung kindlicher Tumorerkrankungen zu verbessern. Es zeigte sich eine Wirkung insbesondere bei den Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen (125).

#### **4.7. Inkubation mit Aurora-Kinaseinhibitor II:**

Die Aurorakinasen stehen konzeptionell für einen neuen Ansatz als mögliches Ziel einer tumorspezifischen Therapie. Verschiedene Arbeiten zeigten bereits, dass die erhöhte Expression einzelner Kinasen dieser Familie von Serin-Threoninkinasen in verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle in der Mitoseaktivität spielen kann (37).

Durch die Interaktion mit anderen zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimierten Faktoren, wie N-MYC scheinen die Aurorakinasen für die Aufrechterhaltung des malignomspezifischen Milieus mitverantwortlich zu sein. Die Aurorakinase A scheint neben ihrer Aufgabe der Zusammensetzung und der Stabilisierung des Spindelapparates das N-MYC-Onkogen vor einer Ubiquitin-vermittelten Degradierung zu schützen. Dieses

wird in vielen Tumoren, insbesondere Neuroblastomen überexprimiert (73), (92). Die selektive Inhibition der Aurorakinase A kann also eine neue Nische für die Anwendung bei besonders aggressiven Neuroblastomen mit N-MYC-Amplifikation sein.

Bei den für diese Arbeit verwendeten Zelllinien SMS-KCN und IMR-5 liegt eine Amplifikation des N-MYC-Gens vor, bei den Linien SHEP, SH-SY5Y ist das Gen nicht amplifiziert (s. Kapitel 2.2.4.). Die Zelllinie IMR-5 zeigte sich hier auch besonders sensibel, tendenziell auch SH-SY5Y (s. Abb. 64), beide zeigen auch eine besonders hohe Aurorakinase A – Expression im Vergleich zum restlichen Panel (s. Abb. 65). Allerdings zeigt die Linie SMS-KCN bei vorliegender N-MYC-Amplifikation eine ausgesprochene Resistenz, bei im Vergleich zum Panel normaler Aurorakinase A-Expression (s. Abb. 64, 65). Hier könnte ein weiterer a priori nicht bekannter Resistenzmechanismus zum Tragen kommen.

Wirkung auf Leukämiezelllinien:

Für die hier getesteten Leukämiezelllinien wurden im Vergleich zum restlichen Panel die niedrigsten  $GI_{50}$ -Werte ermittelt (2,5-7,3  $\mu$ M). Dieses konnte in anderen Arbeiten u.a. bei Yang et al. (124) bestätigt werden. Es zeigten sich nach Inkubation mit dem AURKB-Inhibitor AZD1152-HQPA in der in vitro-Anwendung im 3H-Thymidin-Uptake-Assay eine  $IC_{50}$  von 3-40 nM. Tendenzuell ähnliche Ergebnisse ergaben sich aus einer Arbeit von Maris et al. mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 18-103 nM bei den getesteten Leukämiezelllinien (72).

Die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zueinander ist durch die Verwendung verschiedener Aurorakinaseinhibitoren allerdings erschwert.

Wirkung auf Ewingsarkomzelllinien:

Anders als Vincristin oder Paclitaxel (keine  $GI_{50}$  erreicht) wirkt der Aurorakinaseinhibitor auch besonders zytotoxisch auf die Zelllinie CADO-ES-1, obwohl bei dieser eine besonders hohe Pgp-Expression vorliegt (ca. 60%). Über einen MDR-vermittelten Resistenzmechanismus ist bei den Aurorakinaseinhibitoren nichts bekannt. Es erschließt sich daraus eventuell ein zusätzliches Potential dieser Stoffe, um bekannte Resistenzmechanismen zu umgehen.

Interessanterweise scheint bei Ewingsarkomen eine Regulation der AURKA und AURKB über das charakteristische EWS-Fli1-Fusionsprotein (t11;22, q24;q12), (s. Kapitel 2.2.1.) vorzuliegen (28), (122).

Im Rahmen des „Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP)“ zeigten Maris, J.M. et al. inzwischen eine *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit des Zweitgenerations AURKA-Inhibitor MLN8237 an einem Panel pädiatrischer Tumore (72). In dem Panel befinden sich Zelllinien von Ewingsarkomen, akuten Leukämien (5/6 Zelllinien sind ALL-Zelllinien), Rhabdomyosarkome und Neuroblastome. In dem Panel fiel wie auch in dieser Arbeit insbesondere eine Sensitivität der Leukämiezelllinien (v.a. MOLT-4 und CCRF-CEM) sowie der Neuroblastomzelllinien, als auch der Ewingsarkomzelllinien unabhängig ihres N-MYC-Status auf. Die mediane EC<sub>50</sub> bzw. IC<sub>50</sub> betrug in diesem Panel 49 nM respektive 61 nM. Interessanterweise war auch in jener Arbeit ebensowenig eine Korrelation von der beobachteten zytotoxischen Aktivität zur AURKA-Expression zu finden ((72), weiterführende Daten in (123)).

Eine erweiterte *in vitro*- und *in vivo*-Testung gegen 28 Ewingsarkom- und Neuroblastomzelllinien sowie verschiedene *in vivo* Xenograft-Mausmodelle konnte diese Ergebnisse bestätigen (15).

Wirkung auf Neuroblastomzelllinien:

Wie bereits zuvor angedeutet, zeigte sich eine unterschiedliche Wirkung der zytotoxischen Aktivität gegenüber den gewählten Neuroblastomzelllinien. Die Zelllinie IMR-5, tendenziell auch SH-SY5Y zeigten sich besonders sensibel, aber nicht bei SMS-KCN oder SHEP. Neben der schon beschriebenen Bindung des N-MYC durch die AURKA müssen also noch weitere Mechanismen die unterschiedliche Wirksamkeit auf die verschiedenen Tumorklone bedingen.

Maris et al. gingen der Frage nach, ob AURKA eine Rolle bei der Stabilisierung von N-MYC in Tumoren, insbesondere Neuroblastomen spielt. Aurora A selbst wird nur selten durch Neuroblastome exprimiert, weniger als 1%! Besonders hoch ist die Expression aber bei N-MYC –Amplifikation (73). Ist dies eine neue Nische für die Anwendung für Aurorakinasen bei besonders aggressiven Neuroblastomen? Zumindest in der hier durchgeführten Arbeit schien insbesondere die Zelllinie SMS-KCN, für welche eine MYCN-Amplifikation als auch eine Deletion auf Chromosom 1 beschrieben ist, vergleichsweise resistent zu sein (s. Abb. 28, Kapitel 3.3. und Kapitel 2.2.4.).

Wirkung auf Osteosarkomzelllinien:

Die beiden hier getesteten Osteosarkomzelllinien OST und MNNG-HOS zeigten sich

relativ resistent gegenüber der Mono-Anwendung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II. Tavanti et al. fanden an zehn verschiedenen Osteosarkomzelllinien eine Wirksamkeit für die dort getesteten Aurorakinaseinhibitoren (VX-680 und ZM447439) und auch in Kombination mit für die Behandlung des Osteosarkoms etablierten Substanzen (114).

An den im Rahmen des „Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP)“ von Maris, J.M et al. getesteten sechs in vivo Modellen konnte nur bei einer Linie ein Ansprechen auf den dort verwendeten AURKA-Inhibitor gesehen werden (72).

Wirkung auf Rhabdomyosarkomzelllinien:

Hier zeigte sich eine nur mäßige zytotoxische Potenz des gewählten Aurorakinaseinhibitors im Vergleich zum Gesamtpanel mit  $GI_{50}$ -Werten von  $6,9 \mu\text{M}$  für die Zelllinie RD und  $15,1 \mu\text{M}$  für die Zelllinie RH-30. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich ebenfalls im „Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP)“ (72).

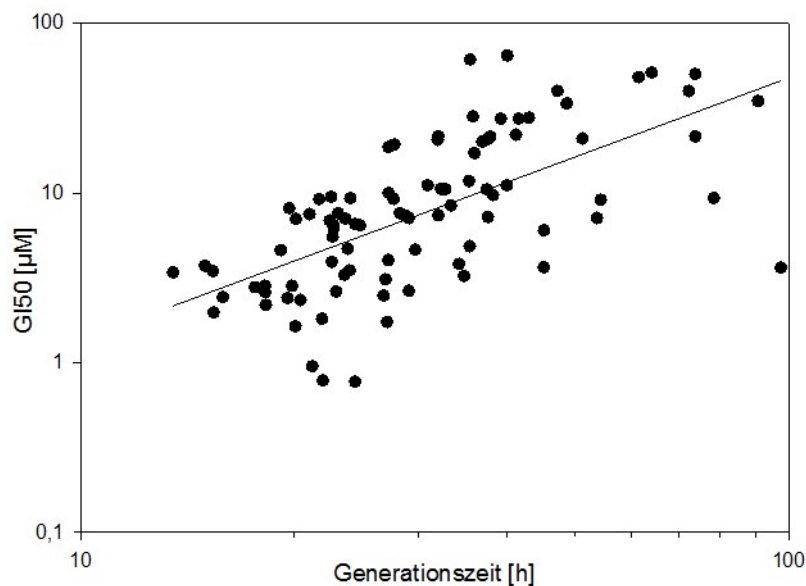
Wirkung auf Medulloblastomzelllinien:

Bei den beiden Medulloblastomzelllinien fiel eine besonders hohe Resistenz im Vergleich zum Gesamtpanel auf (Rang 16/18 und 17/18 im Panel). Auch im „Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP)“ fiel zumindest bei der in vivo-Testung eine nur geringe Sensitivität der dort gewählten Linien auf (72). In einer anderen Arbeit zeigte sich der AURKA-Inhibitor MLN8237 wirksam bei der Medulloblastomzelllinie DAOY. Es wurde eine  $IC_{50}$  von  $0,04 \mu\text{M}$  ermittelt (87).

#### **4.8. Sind besonders schnellwachsende Zellen auch besonders sensibel?**

Um der Frage nachzugehen, ob gerade die schnellwachsenden Zellen besonders empfindlich auf die Anwendung der verwendeten Testsubstanzen reagierten, wurden die Toxizitätsdaten ( $LC_{50}$ ,  $GI_{50}$ ) mit den jeweils ermittelten Generationszeiten (gemeint ist die Zeit bis zur Verdopplung der Ausgangszellzahl) der Zellkulturen mittels Pearson-Produkt-Moment-Korrelation bzw. Spearman-Korrelationstest berechnet. Werte von kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen. Es zeigte sich exemplarisch für die Versuche mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II dahingehend eine Korrelation der  $GI_{50}$  zur Generationszeit von  $p=2 \times 10^{-9}$  (für  $n=96$ , Anzahl der Testungen mit Nachweis einer  $GI_{50}$ , Korrelationskoeffizient  $r=0,562$ ) und der  $LC_{50}$  zur Generationszeit von  $p=0,125$  (für  $n=94$ , Anzahl der Testungen mit Nachweis einer  $LC_{50}$ ) jeweils mittels der Pearson-

Produkt-Moment-Korrelation bestimmt. Somit ergibt sich bezüglich der  $GI_{50}$ -Werte verglichen mit der Generationszeit eine Korrelation, d.h. besonders schnell wachsende Zellen scheinen besonders sensibel zu sein, welches durch eine niedrige  $GI_{50}$  zum Ausdruck kommt. Für den AURKA-/AURKB-Inhibitor sind dies die besonders schnell proliferierenden Leukämie- und Ewingsarkomzelllinien. Allerdings zeigen sich auch die beiden Zelllinien IMR-5 (mittlere Generationszeit 40,4 h) und SMS-KCN (mittlere Generationszeit 49,9 h) relativ sensitiv trotz hoher Generationszeit (s. dazu Kapitel 3.7. und Kapitel 7, Anhang mit Angabe der Generationszeiten).



**Abb. 68:** logarithmische Darstellung der  $GI_{50}$  im Vergleich zur Generationszeit am Beispiel der mit dem Aurorakinaseinhibitor II behandelten Zelllinien

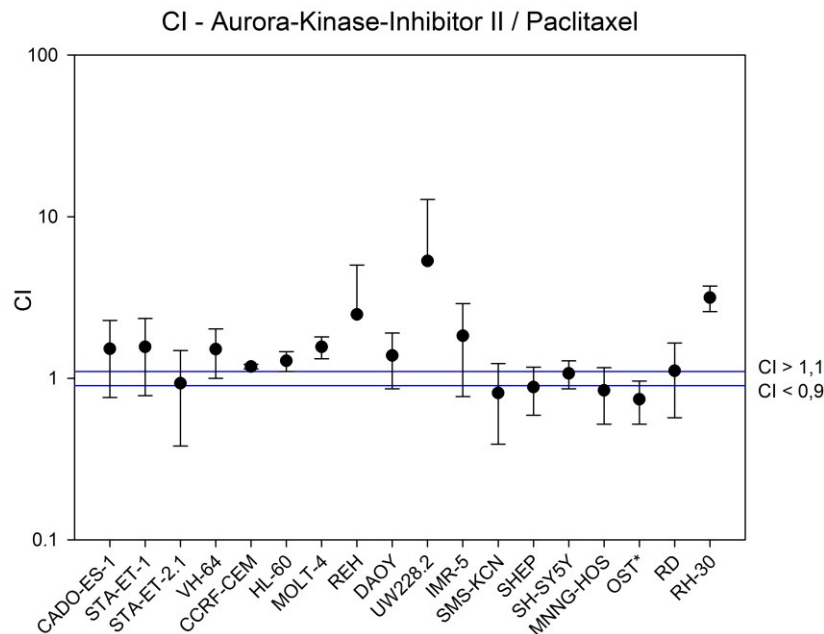
#### **4.9. Versuche mit Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Paclitaxel:**

Die zytotoxischen Effekte der Kombinationen aus dem Aurora-Kinaseinhibitor II und Paclitaxel bezüglich möglicher synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte wurde nach Chou und Talaly berechnet (19), (s. auch Kapitel 2.10).

Erhöht also nun die Inhibition von Aurorakinase A/B die Sensitivität für eine Therapie mit Paclitaxel?

Bezugnehmend auf diesen Ansatz konnte am vorliegenden Zellpanel rechnerisch nur bei den zwei Osteosarkomzelllinien MNNG-HOS und OST (s. Abb. 43, 44, Tab. 5) sowie den Neuroblastomzelllinien SMS-KCN (CI-Wert: 0,81) und SHEP (CI-Wert 0,88) eine gewisse Durchbrechung der tendenziell sehr Paclitaxel-resistenten Zelllinien im Sinne

eines schwachen Synergismus gesehen werden (s. Abb. 69).



**Abb. 69:** CI-Werte in halblogarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II in Kombination mit Paclitaxel behandelten Zelllinien. Die schwarzen Punkte repräsentieren die gemessenen Mittelwerte der jeweiligen CI-Werte aus jeweils drei Messungen für die einzelnen Zelllinien. Die senkrechten Linien geben die Streubreite der Werte an, der obere waagrechte Balken den höchsten gemessenen CI-Wert, der untere waagrechte Balken den minimalen CI-Wert. Als Hilfslinien sind zwei Waagrechte bei einem CI-Wert von 0,9 und 1,1 eingezeichnet. Werte unter 0,9 bedeuten eine synergistische Wirkung, über 1,1 eine antagonistische Wirkung.

Bei den beiden Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET-1 und STA-ET-2.1 (s. Abb. 30, 31) im mittleren und höheren Konzentrationsbereichen ergab sich visuell-graphisch ein gewisser synergistischer Effekt.

Für alle anderen Zelllinien zeigten sich rechnerisch antagonistische Effekte für die gewählten Konzentrationsbereiche, insbesondere bei den Zelllinien RH-30 (CI-Wert 3,15) und UW228.2 (CI-Wert 5,31). Allerdings fielen in der statistischen Betrachtung teils hohe Standardabweichungen innerhalb der Messungen auf (s. Tab. 5).

Bezugnehmend auf die sich ergebende Frage, ob eventuell bezogen auf die Einzelsubstanzen besonders sensible bzw. resistente Zelllinien überdurchschnittlich häufig synergistische oder antagonistische Effekte in der Kombinationsanwendung zeigten, wurden die ermittelten CI- und  $GI_{50}$ -Werte mittels Spearman-Rank-Order-Korrelation zueinander in Bezug gesetzt. Werte von kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen. Für Paclitaxel konnte eine Korrelation gezeigt werden (p-Wert von 0,01,

Korrelationsquotient  $r$  von  $-0,58$ ), aber nicht für den Aurorakinaseinhibitor II ( $p$ -Wert von  $-0,11$ , Korrelationsquotient  $r$  von  $0,65$ ), was darauf hinweist, dass synergistische bzw. additive Effekte durch Kombination mit dem Aurorakinase-Inhibitor eher bei Paclitaxel-resistenten Zellen zu beobachten waren.

Es gibt Hinweise dafür, dass eine Überexpression der Aurorakinase A die Paclitaxel-Resistenz erhöhen kann. Anand et al. konnten eine Überexpression mit einem schlechten Ansprechen für Ovarialcarcinome in der Zellkultur von HeLa-Zellen für Paclitaxel in Verbindung bringen (2), welches ein Standardtherapeutikum in der Behandlung von Ovarialkarzinomen ist. Durch die erhöhte Aurorakinase A-Expression können die Zellen Paclitaxel induzierte Apoptose-Mechanismen umgehen, indem entscheidende Kontrollmechanismen zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität umgangen werden, wie der sogenannte „Spindel-Checkpoint“ (3). Dementsprechend gab es bereits in-vitro Versuche durch die Kombination mit Inhibitoren der Aurorakinase A die Paclitaxel-Resistenz bei Ovarialkarzinomen zu umgehen (103). Es zeigte sich ein Synergismus bei gleichzeitiger Paclitaxel-Gabe auch bei primär Paclitaxel-resistenten Tumoren. Ein ähnlicher Ansatz, bei dem eine für AURKA spezifische siRNA allein oder in Kombination bei Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren verwendet wurde, zeigte einen in-vitro Synergismus (75).

In einer weiteren Arbeit wurde die Kombination eines AURKA-Inhibitors (MLN8237, Alisertib) in Kombination mit Docetaxel an Zelllinien von Adenocarcinomen des oberen Gastrointestinaltraktes untersucht. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Kombinationseffekt (106).

Bezüglich einer synergistischen Wirkung in vitro bei Osteosarkomen konnten Tavanti et al. eine Wirksamkeit für die dort getesteten Aurorakinaseinhibitoren (VX-680 und ZM447439) in Kombination mit für die Behandlung des Osteosarkoms etablierten Substanzen (Doxorubicin, Methotrexat und Cisplatin) an zehn verschiedenen Osteosarkomzelllinien zeigen (114).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden für die beiden getesteten Osteosarkomzelllinien OST und MNNG-HOS im Mittel mäßige synergistische Effekte für die Kombinationsanwendung mit Paclitaxel gefunden (CI-Werte  $0,74$  und  $0,84$ ).



#### **4.10. Versuche mit Kombination aus Aurora-Kinaseinhibitor II und Vincristin:**

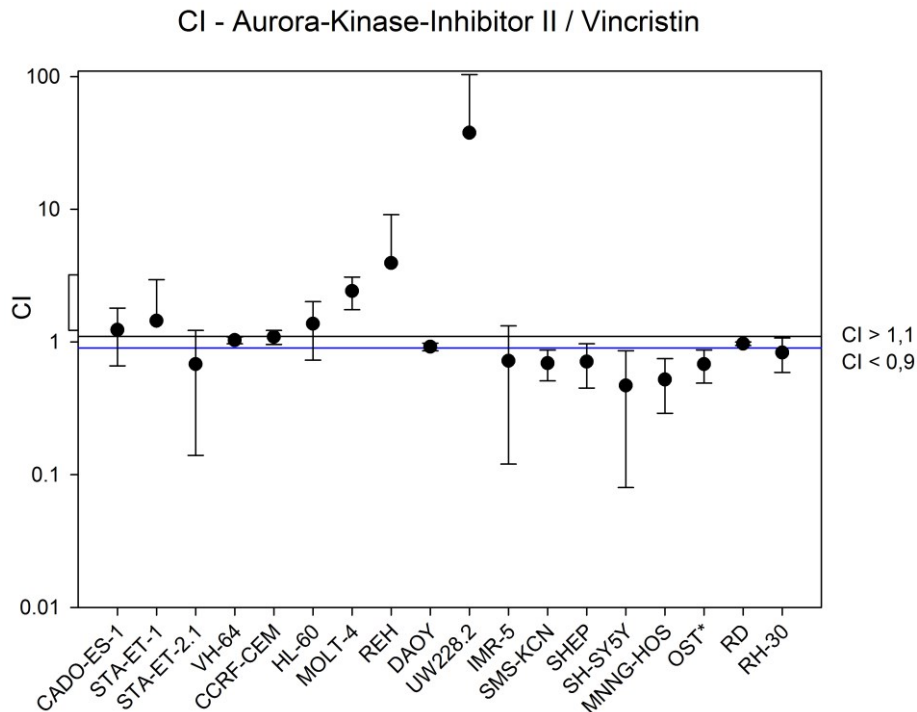
Bezüglich einer Kombinationswirkung zwischen dem Aurora-Kinaseinhibitor II und Vincristin konnte am vorliegenden Zellpanel für die Ewing-Sarkom-Zelllinie STA-ET-2.1 (s. Abb. 49), die beiden Osteosarkomzelllinien MNNG-HOS und OST (s. Abb. 60) und alle Neuroblastomzelllinien ein synergistischer Effekt dokumentiert werden (s. Tab. 5 und s. Abb. 70).

Für die Leukämiezelllinien ergeben sich bis auf die Zelllinie CCRF-CEM antagonistische Effekte mit CI-Werten von 1,37 – 3,93, ebenso für die Zelllinie UW228.2 mit einem CI-Wert von 37,6, bei allerdings hoher Standardabweichung (s. Tab. 5).

Gerade die Leukämiezelllinien zeigten unter den gewählten Konzentrationsbereichen sowohl unter dem Aurora-Kinaseinhibitor II als auch unter Vincristin vergleichsweise submaximale Absterberaten der Zellen, so dass Aussagen bezüglich Kombinationseffekten bei den Leukämiezelllinien auch angesichts der hohen Standardabweichungen (s. Tab. 5) mit Vorsicht zu interpretieren sind. Bei submaximalen Effekten bezüglich der Absterberate der behandelten Zellen ergeben sich, wie bereits unter 4.4. erwähnt, Einschränkungen in der Reproduzierbarkeit und Interpretation bei den durch die MTT-Assays gewonnenen Daten.

Analog wie in Kapitel 4.9. wurden die ermittelten CI- und  $GI_{50}$ -Werte der Einzelsubstanzen (Vincristin und Aurora-Kinaseinhibitor II) mittels Spearman-Rank-Order-Korrelation zueinander in Bezug gesetzt. Werte von kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen. Für Vincristin konnte keine Korrelation gezeigt werden (p-Wert von 0,17, Korrelationsquotient von -0,34), ebenso wenig für den Aurora-Kinaseinhibitor II (p-Wert von 0,48, Korrelationsquotient  $r$  von -0,18). Da eine Beeinflussung der Korrelationsanalyse durch den hohen CI-Wert, der für die Kombination von Vincristin mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II bei der Zelllinie UW228.2 ermittelt wurde und der zudem von einer hohen Variabilität gekennzeichnet war (CI-Wert von 37,7 mit einer STABW von 65,9, s. Tabelle 5), nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Korrelationsanalysen ohne die Zelllinie UW228.2 wiederholt. Ohne UW228.2 zeigte sich analog zu den Beobachtungen für die Kombination Paclitaxel und Aurorakinase-Inhibitor II eine inverse Korrelation zwischen den CI-Werten für die Kombination Vincristin und Aurora-Kinaseinhibitor II und  $GI_{50}$ -Werten für Vincristin ( $p = 0,013$ ,  $r = -0,589$ ), während

keine signifikante Korrelation zwischen den CI-Werten und den  $GI_{50}$ -Werten für den Aurora-Kinaseinhibitor II beobachtet wurde. Blieben die UW228.2 Ergebnisse unberücksichtigt, zeigte sich damit analog zu der Kombinationstestung von Paclitaxel mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II, dass Vincristin-resistentere Zelllinien besser auf die Kombinationstherapie ansprachen als Vincristin-sensiblere Zelllinien.



**Abb. 70:** CI-Werte in halblogarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II in Kombination mit Vincristin behandelten Zelllinien. Die schwarzen Punkte repräsentieren die gemessenen Mittelwerte der jeweiligen CI-Werte aus jeweils drei Messungen für die einzelnen Zelllinien. Die senkrechten Linien geben die Streubreite der Werte an, der obere waagrechte Balken den höchsten gemessenen CI-Wert, der untere waagrechte Balken den minimalen CI-Wert. Als Hilfslinien sind zwei Waagrechte bei einem CI-Wert von 0,9 und 1,1 eingezeichnet. Werte unter 0,9 bedeuten eine synergistische Wirkung, über 1,1 eine antagonistische Wirkung.

Die unterschiedliche Wirkung von Vincristin und den Aurorakinaseinhibitoren auf molekularer Ebene mag ein Ansatz zur Erklärung für zu erwartende Kombinationseffekte sein: Während Vincristin durch die Bindung des Tubulin- $\beta$ -Dimers die Tubulin Polymerisierung unterbindet (62), verhindert die Inhibition der Aurorakinasen die Chromosomensegregation und damit eine effektive Mitose.

Daten aus der *in vitro*-Kombinationsanwendung des AURKB-Inhibitors AZD1152-HQPA mit Vincristin bei Burkittlymphomen, anderen aggressiven B-NHL sowie ALL-

Zelllinien zeigten eine vermehrte Phosphorylierung der Aurorakinase A und B als auch deren Substrat p-Histon H3 bei mit Vincristin behandelten Zellen (58). Der Vermittler scheint dafür die Kinase JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) zu sein. Der Zusatz des AURKB-Inhibitors zeigte eine synergistische Wechselwirkung der Substanzen zueinander und potenzierte die antiproliferative Wirkung des Vincristins in der alleinigen Anwendung (58). Ähnliche Daten existieren aus der gleichen Arbeitsgruppe für die Kombinationsanwendung bei AML- und ALL-Zelllinien für den gleichen AURKB-Inhibitor (124). Besagte Substanz wurde aufgrund der vielversprechenden in vitro-Daten und im Tiermodell in einer Phase-I-Studie bei verschiedenen refraktären Tumoren als Monotherapie erprobt (16). Es existieren ähnliche Beobachtungen für die in-vitro Kombination mit Vincristin mit einer gezielten AURKA-Inhibition mittels siRNA (70).

#### 4.11. Expressionsassays:

Es zeigte sich, wenn man die Höhe der mRNA-Expression der Aurorakinase A und B mit der zytotoxischen Wirkung des Aurora-Kinaseinhibitors II bezogen auf die GI<sub>50</sub> mittels der Pearson-Produkt-Moment-Korrelation vergleicht, kein signifikanter Zusammenhang (AURKA p: 0,844, AURKB p: 0,818, s. Kapitel 3.8.). Eine überdurchschnittliche AURKA-Expression wiesen die sensible IMR-5 Zelllinie und die eher resistenten Osteosarkom- und Rhabdomyosarkomzelllinien auf. Die beiden Osteosarkomzelllinien MNNG-HOS und OST zeigten eine überdurchschnittliche mRNA-Expression der Aurorakinase B.

Bezugnehmend auf die Literatur lassen viele Tumoren erhöhte RNA-Expressionslevel für AURKA und AURKB erkennen (2), (12), (75). Eine Überexpression der Aurora A ist mit einer Chromosomenamplifikation, schlechter histologischer Differenzierung und schlechter Prognose verbunden (37), eine Überexpression der Aurora B tritt bei vielen Tumoren auf, häufig offenbart sich eine vermehrte genetische Instabilität (63). Bei Neuroblastomen (s.o.) besteht häufig eine erhöhte Expression des AURKA-Lokus, welcher wie oben angesprochen wichtig für die Aufrechterhaltung des N-MYC-Weges bei Neuroblastomen mit N-MYC-Amplifikation ist (73), (92).

In anderen Arbeiten konnte allerdings ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der AURKA- oder AURKB-Expression zum Ansprechen auf eine Aurorakinaseinhibition, sei es durch siRNA oder Kinaseinhibitoren, gezeigt werden (72), (123).

Vergleicht man phänomenologisch die Höhe der transkribierten mRNA der AURKA und AURKB mit der letztlich auf Proteinebene translatierten mRNA jeweils für die AURKA und AURKB, zeigt sich bei dieser Arbeit, dass bezogen auf die mRNA-Expression der AURKA die Zelllinien CCRF-CEM, IMR-5, SMS-KCN, SH-SY5Y, OST, MNNG-HOS sowie RD und RH-30 besonders hohe Werte im Vergleich zeigen, allerdings eine vollkommen unterschiedliche Höhe der Expression der AURKA auf Proteinebene aufweisen.

Während beispielhaft die Zelllinien CCRF-CEM und SH-SY5Y bezogen auf das Gesamtpanel sowohl eine relativ hohe mRNA-Expression der AURKA als auch eine hohe Expression auf Proteinebene im Westernblot vorwiesen, enthüllten insbesondere die beiden Ewingsarkomzelllinien STA-ET-1 und STA-ET-2.1 eine besonders hohe Expression im Westernblot, obwohl sie im Vergleich eher eine niedrige mRNA-Expression zeigten. Umgekehrt gilt das für die beiden Rhabdomyosarkomzelllinien RD und RH-30. Diese ließen eine besonders hohe Expression der AURKA auf mRNA- nicht aber auf Proteinebene erkennen.

Ähnliches ergab sich für den Vergleich der Expression auf mRNA-Ebene mit derjenigen auf Proteinebene bezogen auf die AURKB. Während beispielhaft die Osteosarkomzelllinien OST und MNNG-HOS sowohl eine besonders hohe Expression auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigten, präsentierten sich wiederum sämtliche Ewingsarkomzelllinien mit einer vergleichsweise niedrigen mRNA-Expression, aber einer besonders hohen Expression im Westernblot.

Aufgrund des qualitativ fehlenden Zusammenhangs zwischen Höhe der mRNA-Expression und schließlich erfolgter Translation auf Proteinebene muss eine weitergehende kausale Erklärung spekulativ bleiben.

Mutmaßlich unterliegen AURKA und AURKB einer starken posttranslationalen Modifikation (72). Eventuell sind einige der beobachteten Effekte unspezifisch von der eigentlichen Zielstruktur, da eventuell auch andere für den Zellzyklus wichtige Kinasen durch den Aurora-Kinaseinhibitor II gehemmt werden (targetunspezifische Effekte).

#### **4.12. Korrelation p53-Status mit Wirkung des Aurora-Kinaseinhibitors II zum Therapieansprechen:**

Eine weitere Frage, die sich aus der unterschiedlichen Wirkung des Aurora-Kinaseinhibitors II auf die verschiedenen Zelllinien ergab, war, ob vielleicht das Vorhandensein einer Defizienz des p53 einen Einfluss auf die Wirkung hatte.

Zieht man den p53-Status der verwendeten Zelllinien heran (dieser ist für die jeweiligen Zelllinien bekannt aus den zu den Zelllinien verfügbaren Informationen, s.a. Kapitel 2.2. und (91), (111)), zeigt sich keine Korrelation zwischen einer p53-Mutation und dem Ansprechen der Tumorzelllinien ( $GI_{50}$ ) auf den verwendeten Aurorakinaseinhibitor (für  $GI_{50}$  und mutierten p53-Status beträgt der p-Wert 0,61 mittels Pearson-Produkt-Moment-Korrelation), d.h. die Wirkung dieser Substanz auf die jeweiligen Tumorzellen scheint unabhängig vom p53-Status zu sein. Insbesondere die hier getesteten Leukämiezelllinien, welche alle nicht über einen p53-Wildtyp verfügen, zeigen sich ja besonders sensibel auf eine Anwendung mit dem Aurorakinaseinhibitor.

Im Gegensatz dazu postuliert eine aktuelle Arbeit sogar eine theoretisch besonders hohe Sensitivität von p53-defizienten Zellen gegenüber einer AURKA- und AURKB-Inhibition, was eine Nische für die zukünftige Anwendung bei Patienten mit einer p53-Defizienz bedeuten könnte (74).

Allerdings verfügen die Tumorzelllinien auch über andere Resistenzmechanismen und tumorspezifische Stoffwechselwege außerhalb der p53-induzierten Apoptose.

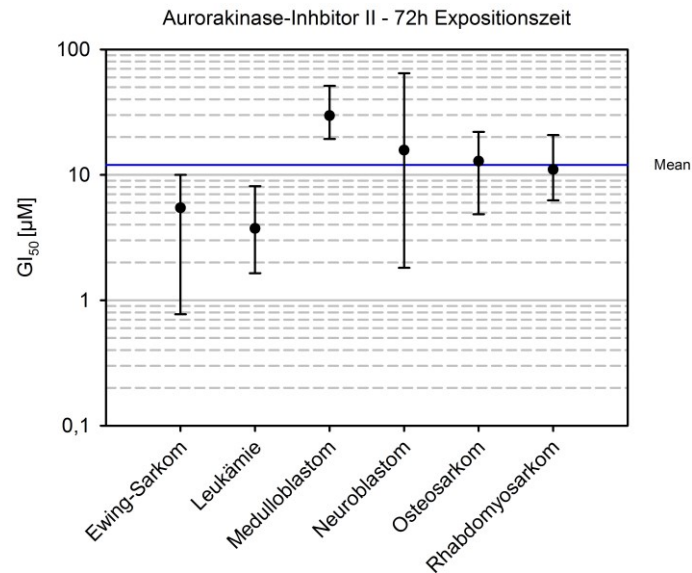
#### **4.13. Zusammenfassung:**

Initial waren verschiedene Fragestellungen entworfen worden, die nun im Folgenden nochmals zusammenfassend beantwortet werden sollen:

- Sind Aurorakinasen wirksam bei pädiatrischen Tumorzelllinien?

Abhängig von der gewählten Tumorentität und Zelllinie konnte eine toxische Wirkung des gewählten Aurorakinaseinhibitors insbesondere auf die Ewing-Sarkome, speziell die Linien VH-64 und CADO-ES-1, und die getesteten Leukämie-Zelllinien, aber auch die Neuroblastom-Zelllinien IMR-5 und SH-SY5Y aufgezeigt werden (s. Abb. 64 und 71). Anders als Vincristin wirkte der Aurora-Kinaseinhibitor auch vergleichsweise stark auf die Zelllinie CADO-ES-1. Als besonders resistent erwiesen sich die Neuroblastom-

Zelllinie SMS-KCN, die Medulloblastome, mäßig resistent die Osteosarkome. Bei den Rhabdomyosarkomen konnte für den Aurorakinase-Inhibitor im gewählten Konzentrationsbereich keine gute Wirksamkeit gezeigt werden.



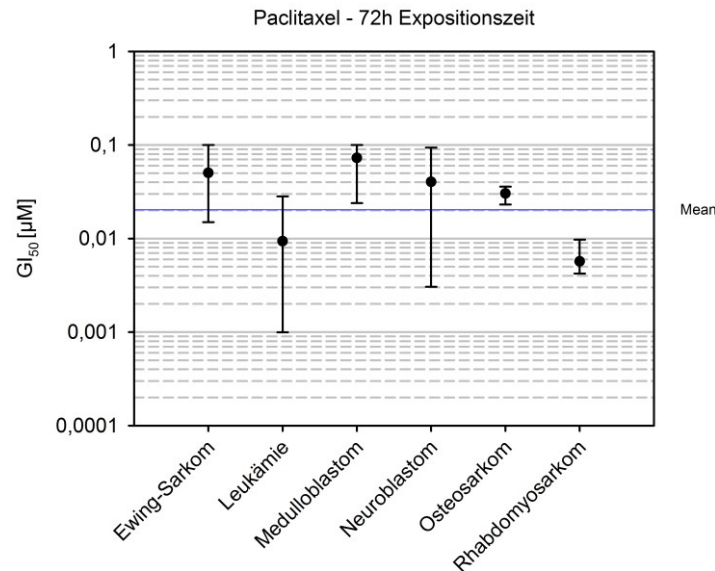
**Abb. 71:** Vergleich der Wirksamkeit des Aurorakinase-Inhibitors II bezogen auf die GI<sub>50</sub> der verschiedenen Tumorentitäten. Besonders niedrige GI<sub>50</sub>-Werte bedeuten im Vergleich innerhalb des Tumorpanels eine besonders gute Wirksamkeit.

Vielversprechende Anwendungsgebiete für die Anwendung von Aurorakinaseinhibitoren bei pädiatrischen Patienten stellen ausgehend von dieser Arbeit zunächst Patienten mit Leukämien und Ewingsarkomen dar. Zusätzlich bietet sich zumindest auch aufgrund der bereits angesprochenen Interaktion mit N-MYC eine Anwendung bei Patienten mit Neuroblastomen an.

- Ist das an pädiatrischen Tumorzelllinien bisher wenig erforschte Paclitaxel (Taxol®) eine zusätzliche Möglichkeit zum etablierten Vincristin?

Vincristin erwies sich als besonders wirksam beim Ewing-Sarkom mit Ausnahme bei der Zelllinie CADO-ES-1, den Leukämien, vor allem bei der Zelllinie MOLT-4, den Neuroblastomzelllinien IMR-5 und SMS-KCN sowie den Rhabdomyosarkomen (s. Abb. 14 und Abb. 62). Dahingegen zeigten sich auf das Paclitaxel nur die Leukämiezelllinien, die Neuroblastom-Zelllinie IMR-5 sowie die Rhabdomyosarkome als relativ sensibel im Vergleich zum Gesamtpanel. Auf die Ewing-Sarkome wirkte Paclitaxel nur mäßig zytotoxisch (s. Abb. 63 und 72). Als besonders resistent stechen bei beiden Substanzen die Medulloblastom- und die Osteosarkom-Zelllinien wie auch die beiden Neuroblastom-

Zelllinien SHEP und SH-SY5Y hervor (s. Abb. 21 und 72).



**Abb. 72:** Vergleich der Wirksamkeit von Paclitaxel bezogen auf die GI<sub>50</sub> der verschiedenen Tumorentitäten. Besonders niedrige GI<sub>50</sub>-Werte bedeuten im Vergleich innerhalb des Tumorpanels eine besonders gute Wirksamkeit.

Wie bereits unter 4.6. erwähnt, zeigten bisherige Studien gerade bei pädiatrischen Patienten mit Leukämien kein gutes Ansprechen (s. Kapitel 4.6., (55)). Einen möglichen Ansatz für eine klinische Prüfung würden ausgehend von dieser Arbeit zusätzlich Rhabdomyosarkome anbieten, ggfs. in Form von Kombinationstherapien. Ähnliche Ergebnisse insbesondere bei den Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen fanden auch andere Autoren in präklinischen Modellen für nab-Paclitaxel (125).

- Kann mit einer Kombination, im Speziellen mit etablierten Hemmern des Spindelapparates, eine Dosisreduktion erreicht werden? Oder bestehen antagonistische Effekte?

Angesichts der bereits oben beschriebenen verbesserten Langzeitüberlebensraten unter pädiatrischen Patienten mit Krebserkrankungen, muss ein Ziel der aktuellen Therapieschemata nicht nur eine weitere Verbesserung der Überlebensraten, sondern auch eine Optimierung der Lebensqualität hinsichtlich der (Langzeit-) Nebenwirkungen sein. Mögliche synergistische Effekte der hier in vitro getesteten Wirkstoffkombinationen hätten damit möglicherweise bei gleicher Wirksamkeit eine geringere Toxizität in vivo zur Folge. Dies besteht unter der Voraussetzung, dass die neu hinzugenommene Substanz ein nur schwaches Nebenwirkungsprofil oder zumindest nicht ein dem

Kombinationspartner vergleichbares aufweist. Für die bisherigen Anwendungen mit diversen Aurora-Kinaseinhibitoren war stets eine Neutropenie als wichtige dosislimitierende Nebenwirkung beschrieben worden (s. Kapitel 1.3.1.). In Kombination mit anderen Substanzen muss insbesondere diese Nebenwirkung berücksichtigt werden. Wie unter 4.9 und 4.10. bereits diskutiert, zeigten tendenziell insbesondere diejenigen Zelllinien, welche sich als besonders resistent gegenüber einer Monoanwendung mit Vincristin oder Paclitaxel erwiesen, in der Kombinationsanwendung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II synergistische Effekte (bei allerdings den bereits diskutierten Einschränkungen im Sinne hoher Variationskoeffizienten). In einer möglichen zukünftigen Anwendung könnten, falls es sich um einen Klasseneffekt handeln sollte, Inhibitoren der Aurorakinase A/B in der Kombinationstherapie eingesetzt werden, um ein Therapieansprechen gegenüber Vincristin oder Paclitaxel (oder ggfs. anderen Substanzen) bei besonders resistenten Tumorentitäten zu erzielen, z.B. bei Osteosarkomen.

Andere Arbeiten hatten, wie bereits unter Kapitel 4.10. diskutiert, tendenziell ähnliche Ergebnisse für die Kombinationsanwendung gezeigt (103), (106).

- Korreliert die Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Aurorakinase mit deren Expression durch die verschiedenen Tumore?

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der AURKA- oder AURKB-Expression zum Ansprechen auf eine Aurorakinaseinhibition gezeigt werden (s. Kapitel 4.11.). Die Wirkung der Aurorakinaseinhibitoren ist also a priori nicht allein auf die Beobachtung einer bereits vielfach dokumentierten erhöhten Expression der AURKA und AURKB in verschiedenen Tumorentitäten absehbar (s. zur Angabe der RNA-Expression: Quellen (2), (12), (75)). Mutmaßlich unterliegen die beiden Kinasen einer posttranslationalen Modifikation (72).



## 5. Ausblick in die Zukunft:

Dieser Ausblick soll folgende Fragen aufwerfen und nach Möglichkeit kurz beantworten:

Sind Studien mit diesen neuen Ansätzen überhaupt sinnvoll bei Kindern innerhalb von prospektiven randomisierten Phase III-Studien aufgrund der Seltenheit der verschiedenen Entitäten? Wenn ja, gibt es bereits Ansätze?

Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand November 2014) lassen sich drei registrierte Studien zum Einsatz von Aurokinaseinhibitoren bei pädiatrischen Patienten finden (18). Zwei dieser Studien untersuchen den Wirkstoff AT9283. Eine davon befindet sich aktuell noch in der Auswertungsphase einer Phase I/IIa-Studie für pädiatrische Patienten mit rezidivierten oder refraktären Leukämien (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01431664). Die andere Studie ist ebenfalls beendet und hat den gleichen Wirkstoff unter Phase I-Bedingungen bei Patienten mit refraktären oder rezidivierten Tumoren untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00985868). Untersuchungsergebnisse liegen bereits vor. Es zeigte sich unter 33 hinsichtlich Toxizitäten (und Ansprechen) auswertbaren, mehrfach vorbehandelten Patienten (im Durchschnitt vier Vortherapien) ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum wie in anderen Studien (schwere Neutropenien in 30,3% sowie Anämie, Thrombozytopenien, Fatigue und Leberwerterhöhungen). Bei drei Patienten konnte eine stabile Erkrankungssituation, bei einem Patienten mit einem primitiven neuroektodermalen Tumor des ZNS (ZNS-PNET) sogar eine partielle Remission dokumentiert werden (81).

In einer dritten Studie wurde der oral verfügbare Wirkstoff Alisertib (MLN8237), ein AURKA-Inhibitor, bezüglich seiner Wirkung auf rezidivierte oder refraktäre solide Tumoren und Leukämien in einer Phase I-Studie untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01154816). Die Ergebnisse sind bereits publiziert und zeigten nur eine minimale klinische Aktivität. Bei 33 bezüglich eines Ansprechens auswertbaren Patienten hatte ein Patient mit Hepatoblastom eine partielle Remission, während acht Patienten eine stabile Erkrankungssituation (Patienten mit Neuroblastomen und Sarkomen) aufwiesen (83).

Wie erfolgreich war der bisherige klinische Einsatz von Hemmstoffen der Aurorakinaseinhibitoren in den verfügbaren Phase I- und II-Studien (s.a. Tabelle 1)?

Überblickt man die vorläufigen Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien, ist die Bilanz zunächst ernüchternd: Lediglich bei der Akuten Myeloischen Leukämie zeigt der Einsatz von Inhibitoren der Aurorakinasen zunächst eine klinische Wirksamkeit in Phase I- und II-Studien (s.a. Tabelle 1), während für die Monotherapie solider Tumore, allerdings an einem Kollektiv refraktärer und häufig massiv vorbehandelter Patienten, keine überzeugenden Daten hinsichtlich der klinischen Aktivität erbracht werden konnten (5), (17), (78), (105). Ebenso zeigt sich nach einem Überblick über die bisher durchgeführten Studien mit Aurora-Kinaseinhibitoren eine relativ hohe Abbruchquote der bisher durchgeführten Studien ((18), s. Tabelle 1). Dies lässt zumindest darauf schließen, dass die zunächst vielversprechenden Verheißungen nicht immer erfüllt werden konnten (31). An einer Gruppe von Patienten mit therapierefraktären oder rezidierten aggressiven B- und T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (im Durchschnitt drei Vortherapien) konnte durch den Einsatz von Alisertib (MLN8237) im Rahmen einer Phase II-Studie ein Gesamtansprechen (overall response rate) von 27% dokumentiert werden (33). Bei den 48 behandelten Patienten wurden bei 44 (92%) medikamentenbezogene Nebenwirkungen verzeichnet (v.a. Neutropenie, Anämie, Stomatitis) (33).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich eine gewisse in-vitro Wirksamkeit für Ewing-Sarkom- und Neuroblastomzelllinien dokumentiert werden, so dass hier ein weiterer Einsatz in präklinischen Modellen sinnvoll erscheint und teilweise auch schon einen Anfang in Phase I/II-Studien gefunden hat (s.o.).

Weitere zukünftige Ansätze liegen in der möglichen Kombination mit Standardtherapeutika, z.B. mit Taxanen, um primäre eventuell durch Aurorakinasen vermittelte Resistenzmechanismen zu umgehen (103). Ebenso gibt es Ansätze in der Anwendung als Reservesubstanz bei Resistenzmechanismen, z.B. als Zweit- oder Drittlinientherapie bei der CML mit der T315I-Mutation. Wobei in diesem Fall von einer Multikinaseinhibition des verwendeten Aurora-Kinaseinhibitors Danusertib ausgegangen werden muss und nicht von einer alleinigen spezifischen Inhibition der AURKA und AURKA, da diese Substanz auch simultan die für diese Krankheit wichtige BCR-ABL-Kinase hemmt (41), (42), (43), (44).

Das bisher bekannte Nebenwirkungsprofil scheint als primäre dosislimitierende Nebenwirkung eine therapieinduzierte Neutropenie zu besitzen. Andere schwere Nebenwirkungen, wie schwere Verläufe einer Mukositis, Neuropathien, Diarrhöen oder

auch Alopezie sind bisher nicht bekannt. Mittlerweile existieren auch Produktformulierungen zur oralen Verabreichung. Gerade in Hinblick auf spätere Kombinationstherapien gilt es, besonders Regime mit überlappendem Nebenwirkungsprofil, wie z.B. eine höhergradigen Neutropenie oder eine Verlängerung der QTc-Zeit, zu vermeiden.

Gerade die Interaktion mit anderen wichtigen Mitspielern der Zellzyklussteuerung als auch der Apoptose wie p53, Survivin, N-MYC, BRCA-1 verschafft den Inhibitoren der AURKA und AURKB interessante Ansätze (16), (24), (46) ggfs. in Kombination mit anderen Tyrosinkinaseinhibitoren oder konventioneller Chemotherapie.

Ein vielversprechender Ansatz für die spätere Anwendung bei pädiatrischen Patienten wäre es zu zeigen, die gewonnenen Ergebnisse gerade für Leukämien, Ewingsarkome und Neuroblastomen in weitergehende klinische Studien in Kombinationen mit etablierten Substanzen zu übertragen. Bisher existiert noch kein bei der europäischen Arzneimittelbehörde (European Medicines Agency) eingereichter pädiatrischer Entwicklungsplan (Paediatric Investigation Plan, PIP; Suche über [ema.europa.eu](http://ema.europa.eu), Abrufdatum 30.11.2014) zur Untersuchung von Aurora-Kinaseinhibitoren. Diese Pläne werden in der Regel von pharmazeutischen Unternehmen eingereicht und haben letztlich das Ziel, notwendige Daten zur Anwendung von Arzneistoffen bei Kindern zu erheben. Die bisherigen Ansätze in Form von Studien haben bisher eine Priorisierung und Fokussierung auf adulte Tumorentitäten bzw. Patientenklientel gezeigt. Zukünftige grundlagenorientierte Arbeiten müssten zudem den Fokus auf das Wechselspiel mit anderen Kinasen legen, die durch die AURKA oder AURKB moduliert werden.

**6. Literaturverzeichnis:**

- (1) Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67 (7): 1886-1893
- (2) Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR (2003) AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*. 3 (1): 51-62
- (3) Anderson L (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*. 17 (11): 3052-3065
- (4) Andrews PD (2005) Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene* 24 (32): 5005-5015
- (5) Arkenau HT, Plummer R, Molife LR, Olmos D, Yap TA, Squires M, et al. (2012) A phase I dose escalation study of AT9283, a small molecule inhibitor of aurora kinases, in patients with advanced solid malignancies *Ann.Oncol*. 23 (5): 1307-1313
- (6) Arvand A, Denny CT (2001) Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20 (40): 5747-5754
- (7) Asada N, Tsuchiya H, Tomita K (1999) De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line. *Anticancer Res*. 19 (6B): 5131-5137
- (8) Baker DL, Reddy UR, Pleasure D, Thorpe CL, Evans AE, Cohen PS, et al. (1989) Analysis of nerve growth factor receptor expression in human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cancer Res*. 49 (15): 4142-4146
- (9) Barth J (2005) Administration of taxane-containing drugs. *Pharm.Unserer Zeit* 34 (2): 152-158
- (10) Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 33 (11): 2643-2652
- (11) Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 38 (11 Pt 1): 3751-3757
- (12) Bischoff J, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. (1998) A homologue

of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17 (11): 3052-3065

(13) Blumenthal RD, Goldenberg DM (2007) Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol.Biotechnol.* 35 (2): 185-197

(14) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47 (4): 943-946

(15) Carol H, Boehm I, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Morton CL, et al. (2011) Efficacy and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the Aurora kinase A inhibitor MLN8237 against preclinical models of pediatric cancer. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2011) 68:1291–1304

(16) Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK (2006) Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin.Cancer Res.* 12 (23): 6869-6875

(17) Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrisnan K, et al. (2012) Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 18 (17): 4764-4774

(18) ClinicalTrials.gov - Search of: aurora kinase - List Results

Online im Internet: URL:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=aurora+kinase> [Abrufdatum:30/11/2014]

(19) Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv.Enzyme Regul.* 22: 27-55

(20) Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspensio culture. *Nature* (1977 Nov 24;270(5635):347-9.)

(21) Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3 (7): 207-212

(22) Crom WR, de Graaf SS, Synold T, Uges DR, Bloemhof H, Rivera G, et al. (1994) Pharmacokinetics of vincristine in children and adolescents with acute lymphocytic leukemia. *J.Pediatr.* 125 (4): 642-649

(23) Dalton WT,Jr, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71 (1): 242-247

- (24) Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W (2010) Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Mol.Cancer.Ther.* 9 (2): 268-278
- (25) De Jonge M, Steeghs N, et al. (2008) Phase I study of the aurora kinases (AKs) inhibitor PHA-739358 administered as a 6 and 3-h IV infusion on Days 1, 8, 15 every 4 wks in patients with advanced solid tumors. *ASCO Meeting Abstracts* 26 (15 Supplement): 3507
- Online im Internet: URL:  
[http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15\\_suppl/3507](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15_suppl/3507)
- [Abrufdatum: 30/11/2014]
- (26) Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, et al. (1987) A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet.Cell Genet.* 45 (3-4): 148-155
- (27) Dumontet C, Jordan MA, Lee FF (2009) Ixabepilone: targeting  $\beta$ III-tubulin expression in taxane-resistant malignancies. *Mol.Cancer.Ther.* 8 (1): 17-25
- (28) Embree LJ, Azuma M, Hickstein DD (2009) Ewing sarcoma fusion protein EWSR1/FLI1 interacts with EWSR1 leading to mitotic defects in zebrafish embryos and human cell lines. *Cancer Res.* 69 (10): 4363-4371
- (29) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 356 (2): 125-134
- (30) Foley Ge, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965) Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer* 18: 522-529
- (31) Foran J, Ravandi F, Wierda W, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Kadia T, et al. (2014) A phase I and pharmacodynamic study of AT9283, a small-molecule inhibitor of aurora kinases in patients with relapsed/refractory leukemia or myelofibrosis. *Clin.Lymphoma Myeloma Leuk* 14 (3): 223-230
- (32) Frgala T, Kalous O, Proffitt RT, Reynolds CP (2007) A fluorescence microplate cytotoxicity assay with a 4-log dynamic range that identifies synergistic drug combinations *Mol.Cancer.Ther.* 6 (3): 886-897
- (33) Friedberg JW, Mahadevan D, Cebula E, Persky D, Lossos I, Agarwal AB, et al. (2014) Phase II study of alisertib, a selective Aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B- and T-cell non-Hodgkin lymphomas. *J.Clin.Oncol.* 32 (1): 44-50
- (34) Furukawa T, Kubota T, Suto A, Takahara T, Yamaguchi H, Takeuchi T, et al. (1991) Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay. *J.Surg.Oncol.* 48

(3): 188-193

(35) Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, et al. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54 (3): 713-733

(36) Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Terenziani M, et al. (2005) Childhood Cancer Survival Trends in Europe: A EURO CARE Working Group Study. *J.Clin.Oncol.* 23 (16): 3742-3751

(37) Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Jr, Gandara DR (2008) Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin.Cancer Res.* 14 (6): 1639-1648

(38) Geller JI, Wall D, Perentesis J, Blaney SM, Bernstein M, Pediatric Oncology Group study 9376 (2009) Phase I study of paclitaxel with standard dose ifosfamide in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group study (POG 9376). *Pediatr.Blood Cancer.* 52 (3): 346-350

(39) Gibson AA, Harwood FG, Tillman DM, Houghton JA (1998) Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression. *Clin.Cancer Res.* 4 (1): 145-152

(40) Gidding CE, Meeuwse-de Boer GJ, Koopmans P, Uges DR, Kamps WA, de Graaf SS (1999) Vincristine pharmacokinetics after repetitive dosing in children. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 44 (3): 203-209

(41) Giles FJ, Cortes J, Jones D, Bergstrom D, Kantarjian H, Freedman SJ (2007) MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 109 (2): 500-502

(42) Giles FJ, Swords RT, Nagler A, Hochhaus A, Ottmann OG, Rizzieri DA, et al. (2012; 2013) MK-0457, an Aurora kinase and BCR-ABL inhibitor, is active in patients with BCR-ABL T315I leukemia. *Leukemia* 27 (1): 113-117

(43) Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, et al. (2008) Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 111 (8): 4355-4364

(44) Gontarewicz A, Brummendorf TH (2010) Danusertib (formerly PHA-739358)--a novel combined pan-Aurora kinases and third generation Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor. *Recent Results Cancer Res.* 184: 199-214

(45) Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat.Rev.Cancer.* 2 (1): 48-58

- (46) Graux C, Sonet A, Maertens J, Duyster J, Greiner J, Chalandon Y, et al. (2013) A phase I dose-escalation study of MSC1992371A, an oral inhibitor of aurora and other kinases, in advanced hematologic malignancies *Leuk.Res.* 37 (9): 1100-1106
- (47) Groninger E, Meeuwssen-de Boar T, Koopmans P, Uges D, Sluiter W, Veerman A, et al. (2002) Pharmacokinetics of vincristine monotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr.Res.* 52 (1): 113-118
- (48) Haldar S, Basu A, Croce CM (1997) Bcl2 is the guardian of microtubule integrity *Cancer Res.* 57 (2): 229-233
- (49) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J.Immunol.Methods* 119 (2): 203-210
- (50) Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. (2004) VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat.Med.* 10 (3): 262-267
- (51) Hayashi RJ, Blaney S, Sullivan J, Weitman S, Vietti T, Bernstein ML, et al. (2003) Phase 1 study of Paclitaxel administered twice weekly to children with refractory solid tumors: a pediatric oncology group study. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 25 (7): 539-542
- (52) He XM, Ostrowski LE, von Wronski MA, Friedman HS, Wikstrand CJ, Bigner SH, et al. (1992) Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in six human medulloblastoma cell lines. *Cancer Res.* 52 (5): 1144-1148
- (53) Hennipman B, de Vries E, Bokkerink JP, Ball LM, Veerman AJ (2009) Intrathecal Vincristine: 3 Fatal Cases and a Review of the Literature. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* Nov; 31(11):816-9
- (54) Hoffman RM (1991) In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J.Clin.Lab.Anal.* 5 (2): 133-143
- (55) Horton TM, Ames MM, Reid JM, Krailo MD, Pendergrass T, Mosher R, et al. (2008) A Phase 1 and pharmacokinetic clinical trial of paclitaxel for the treatment of refractory leukemia in children: a Children's Oncology Group study. *Pediatr.Blood Cancer.* 50 (4): 788-792
- (56) Hurwitz CA, Relling MV, Weitman SD, Ravindranath Y, Vietti TJ, Strother DR, et al. (1993) Phase I trial of paclitaxel in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group Study. *J.Clin.Oncol.* 11 (12): 2324-2329
- (57) Hurwitz CA, Strauss LC, Kepner J, Kretschmar C, Harris MB, Friedman H, et al. (2001) Paclitaxel for the treatment of progressive or recurrent childhood brain tumors: a



pediatric oncology phase II study. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 23 (5): 277-281

(58) Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, Adachi Y, Nishioka C, Furihata M, et al. (2009) Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma. *Lab.Invest.* 89 (12): 1364-1373

(59) Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 44 (5): 472-485

(60) Johnson DL, McCabe MA, Nicholson HS, Joseph AL, Getson PR, Byrne J, et al. (1994) Quality of long-term survival in young children with medulloblastoma. *J.Neurosurg.* 80 (6): 1004-1010

(61) Jones SF, Burris A, et al. (2008) Phase I accelerated dose-escalation, pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic study of PF-03814735, an oral aurora kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors: Preliminary results. *ASCO Meeting Abstracts* 26 (15 Supplement): 2517

Online im Internet: URL:

[http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15\\_suppl/2517](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15_suppl/2517)

[Abrufdatum: 30/11/2014]

(62) Jordan MA, Thrower D, Wilson L (1991) Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* 51 (8): 2212-2222

(63) Keen N, Taylor S (2004) Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat.Rev.Cancer.* 4 (12): 927-936

(64) Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR (1995) Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol.Res.* 7 (10-11): 493-503

(65) [kinderkrebsregister.de](http://kinderkrebsregister.de)

Online im Internet: URL: [www.Kinderkrebsregister.de](http://www.Kinderkrebsregister.de)

(66) Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Mori Y, Horai T, Tateishi R, et al. (1991) Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet.Cytogenet.* 57 (1): 19-30

(67) Kovacina KS, Roth RA (1995) Characterization of the endogenous insulin receptor-related receptor in neuroblastomas. *J.Biol.Chem.* 270 (4): 1881-1887

(68) Lee JJ, Swain SM (2008) The epothilones: translating from the laboratory to the clinic. *Clin.Cancer Res.* 14 (6): 1618-1624

(69) Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21 (16): 3761-3766

- (70) Lentini L, Amato A, Schillaci T, Insalaco L, Di Leonardo A (2008) Aurora-A transcriptional silencing and vincristine treatment show a synergistic effect in human tumor cells. *Oncol.Res.* 17 (3): 115-125
- (71) Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, Balani SK, Burenkova O, Chen W, et al. (2007) Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104 (10): 4106-4111
- (72) Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Lock R, Carol H, et al. (2010) Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr.Blood Cancer.* 55 (1): 26-34
- (73) Maris JM (2009) Unholy Matrimony: Aurora A and N-Myc as Malignant Partners in Neuroblastoma. *Cancer Cell* 15 (1): 5-6
- (74) Marxer M, Ma HT, Man WY, Poon RYC (2013) p53 deficiency enhances mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Aurora kinases. *Oncogene* (2014) 33, 3550–3560
- (75) Mazumdar A, Henderson YC, El-Naggar AK, Sen S, Clayman GL (2009) Aurora kinase A inhibition and paclitaxel as targeted combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 31 (5): 625-634
- (76) McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC,Jr, Gardner MB (1969) Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24 (3): 520-526
- (77) merckmillipore.com  
Online im Internet: URL:  
[http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Aurora-Kinase-Inhibitor-II---CAS-331770-21-9---Calbiochem,EMD\\_BIO-189404](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Aurora-Kinase-Inhibitor-II---CAS-331770-21-9---Calbiochem,EMD_BIO-189404) [Abrufdatum: 30/11/2014]
- (78) Meulenbeld HJ, Bleuse JP, Vinci EM, Raymond E, Vitali G, Santoro A, et al. (2013; 2012) Randomized phase II study of danusertib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer after docetaxel failure. *BJU Int.* 111 (1): 44-52
- (79) Minowada J, Onuma T, Moore GE (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J.Natl.Cancer Inst.* 49 (3): 891-895
- (80) Moore A, Pinkerton R (2009) Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr.Blood Cancer.* 53 (7): 1180-1187
- (81) Moreno L, Marshall L, Pearson AD, Morland B, Elliott M, Campbell-Hewson Q, et al. (2014) A phase I trial of AT9283 (a selective inhibitor of Aurora kinases) in children

and adolescents with solid tumours: A Cancer Research UK study. *Clin.Cancer Res.*

(82) Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* 65 (1-2): 55-63

(83) Mosse YP, Lipsitz E, Fox E, Teachey DT, Maris JM, Weigel B, et al. (2012) Pediatric Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of MLN8237, an Investigational Oral Selective Small-Molecule Inhibitor of Aurora Kinase A: A Children's Oncology Group Phase I Consortium Study. *Clinical Cancer Research* 18 (21): 6058-6064

(84) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 356 (2): 115-124

(85) Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA (2008) Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treat.Rev.* 34 (2): 175-182

(86) Müller-Tidow, Carsten; Krug, Utz, et al. (2007) Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien: Aussichten und Probleme. *Dtsch. Arztebl.* 104(19): A-1312 / B-1165 / C-1116

(87) Muscal JA, Scorsone KA, Zhang L, Ecsedy JA, Berg SL (2013) Additive effects of vorinostat and MLN8237 in pediatric leukemia, medulloblastoma, and neuroblastoma cell lines. *Invest.New Drugs* 31 (1): 39-45

(88) Nakamura T, Kitagawa T (1985) Anticancer drug screening test with LDH in nude mouse bearing bone and soft part sarcoma. *Cancer* 56 (5): 1112-1116

(89) NCBI Bookshelf - Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual.

Online im Internet: URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> [Abrufdatum: 30/11/2014]

(90) Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Luduena RF, Downing KH (1995) Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 375 (6530): 424-427

(91) Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, et al. (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort *Genes. Chromosomes Cancer* 49 (1): 40-51

(92) Otto T, Horn S, Brockmann M, Eilers U, Schüttrumpf L, Popov N, et al. (2009) Stabilization of N-Myc Is a Critical Function of Aurora A in Human Neuroblastoma. *Cancer Cell* 15 (1): 67-78

(93) Potratz J, Dirksen U, Jurgens H, Craft A (2012) Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 29 (1): 1-11

(94) Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Goldwasser F, Besse-Hammer T, Gianella-

Borradori A, et al. (2014) A phase I schedule dependency study of the aurora kinase inhibitor MSC1992371A in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* 32 (1): 94-103

(95) Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (7): 3116-3120

(96) Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP, et al. (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76 (3): 375-387

(97) Rhim JS, Park DK, Arnstein P, Huebner RJ, Weisburger EK, Nelson-Rees WA (1975) Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 256 (5520): 751-753

(98) Rhim JS, Putman DL, Arnstein P, Huebner RJ, McAllister RM (1977) Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int. J. Cancer* 19 (4): 505-510

(99) Robert F, Hurwitz C, et al. (2008) Phase 1 trial of SNS-314, a novel selective inhibitor of aurora kinases A, B, and C, in advanced solid tumor patients. *ASCO Meeting Abstracts* 26 (15 Supplement): 14642

Online im Internet: URL:

[http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15\\_suppl/14642](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/26/15_suppl/14642)

[Abrufdatum: 30/11/2014]

(100) Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat AM, Kayibanda B, Pico JL, et al. (1977) Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* 267 (5614): 841-843

(101) Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71 (4): 741-747

(102) Ruben RL, Neubauer RH (1987) Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of anticancer compounds. *Cancer Treat. Rep.* 71 (12): 1141-1149

(103) Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, Logani S, McDonald JF, Benigno BB, et al. (2008) Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *J. Transl. Med.* 6: 79

(104) Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (3): 1561-1565

- (105) Schoffski P, Jones SF, Dumez H, Infante JR, Van Mieghem E, Fowst C, et al. (2011) Phase I, open-label, multicentre, dose-escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the oral aurora kinase inhibitor PF-03814735 in advanced solid tumours. *Eur.J.Cancer* 47 (15): 2256-2264
- (106) Sehdev V, Katsha A, Ecsedy J, Zaika A, Belkhiri A, El-Rifai W (2013) The combination of alisertib, an investigational Aurora kinase A inhibitor, and docetaxel promotes cell death and reduces tumor growth in preclinical cell models of upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer* 119 (4): 904-914
- (107) sigmaaldrich.com  
Online im Internet: URL:  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=V8388|SIAL&N5=Product%20No.|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=V8388|SIAL&N5=Product%20No.|BRAND_KEY&F=SPEC) [Abrufdatum: 30/11/2014]
- (108) Simons, S. and Jaehde, U. (2005) Pharmakokinetik und Interaktionspotenzial der Taxane: Paclitaxel und Docetaxel sicher anwenden. *Pharmazie in unserer Zeit*, 34: 122–127
- (109) Solimando DA [Hrsg] (2003) Drug Information Handbook for Oncology. LexiComp, Houston, 3rd Edition
- (110) Sonnichsen DS, Hurwitz CA, Pratt CB, Shuster JJ, Relling MV (1994) Saturable pharmacokinetics and paclitaxel pharmacodynamics in children with solid tumors. *J.Clin.Oncol.* 12 (3): 532-538
- (111) Spaniol K, Boos J, Lanvers-Kaminsky C (2011) An in-vitro evaluation of the polo-like kinase inhibitor GW843682X against paediatric malignancies. *Anticancer Drugs* 22 (6): 531-542.
- (112) Subbiah V, Anderson P, Lazar AJ, Burdett E, Raymond K, Ludwig JA (2009) Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr.Treat.Options Oncol.* 10 (1-2): 126-140
- (113) Tang CJ, Lin CY, Tang TK (2006) Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev.Biol.* 290 (2): 398-410
- (114) Tavanti E, Sero V, Vella S, Fanelli M, Michelacci F, Landuzzi L, et al. (2013; 2013) Preclinical validation of Aurora kinases-targeting drugs in osteosarcoma. *Br.J.Cancer* 109 (10): 2607-2618
- (115) Taylor CG, Sargent JM, Elgie AW, Williamson CJ, Lewandowicz GM, Chappatte O, et al. (2001) Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 22 (4): 278-282

- (116) Teicher BA (2008) Newer cytotoxic agents: attacking cancer broadly. *Clin.Cancer Res.* 14 (6): 1610-1617
- (117) Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 (9): 4350-4354
- (118) Traynor AM, Hewitt M, Liu G, Flaherty KT, Clark J, Freedman SJ, et al. (2011) Phase I dose escalation study of MK-0457, a novel Aurora kinase inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 67 (2): 305-314
- (119) van Valen F, Hanenberg H, Jurgens H (1994) Expression of functional very late antigen-alpha 1, -alpha 2, -alpha 3 and -alpha 6 integrins on Ewing's sarcoma and primitive peripheral neuroectodermal tumour cells and modulation by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha. *Eur.J.Cancer* 30A (14): 2119-2125
- (120) van Valen F, Kentrup-Lardong V, Truckenbrod B, Rube C, Winkelmann W, Jurgens WW (1997) Regulation of the release of tumour necrosis factor (TNF)alpha and soluble TNF receptor by gamma irradiation and interferon gamma in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumour cells. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 123 (5): 245-252
- (121) Voigt A, Hartmann P, Zintl F (2000) Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cells after treatment with retinoic acid. *Cell Adhes.Commun.* 7 (5): 423-440
- (122) Wakahara K, Ohno T, Kimura M, Masuda T, Nozawa S, Dohjima T, et al. (2008) EWS-Fli1 up-regulates expression of the Aurora A and Aurora B kinases. *Mol.Cancer.Res.* 6 (12): 1937-1945
- (123) Whiteford CC, Bilke S, Greer BT, Chen Q, Braunschweig TA, Cenacchi N, et al. (2007) Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue microarray analysis. *Cancer Res.* 67 (1): 32-40
- (124) Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, et al. (2007) AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 110 (6): 2034-2040
- (125) Zhang L, Marrano P, Kumar S, Leadley M, Elias E, Thorner P, et al. (2013) Nab-paclitaxel is an active drug in preclinical model of pediatric solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 19 (21): 5972-5983

## 7. Anlagen:

### **Standardanweisung – SOP – Zellkultur, Version 1, 2003(Arbeitsgruppe „Klinische Pharmakologie“ aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, UKM):**

Anmerkung: Methodenoptimierungen, Softwareumstellungen oder Veränderungen der zu untersuchenden Fragestellungen können Änderungen der nachfolgend beschriebenen SOP nötig machen. Falls diese Änderungen nach ihrer Validierung bereits innerhalb des Geltungszeitraums dieser SOP routinemäßig umgesetzt werden, verliert diese SOP ihre Gültigkeit und ist durch eine neue überarbeitete Fassung zu ersetzen.

Von den Mitarbeitern ist dafür Sorge zu tragen, dass die von ihnen durchgeführten Analysen ausschließlich nach der derzeit gültigen Standardarbeitsanweisung durchgeführt werden.

#### **Allgemeine Anweisungen:**

- Für die Arbeit mit Zellen sind Handschuhe sowie nur zu diesem Zweck genutzte Kittel zu tragen. Die Kittel sind jede Woche zu erneuern.
- Zellkultur ist STERIL unter einer Sterilbank durchzuführen. Vor und nach Benutzung ist diese mit Ethanol 70% oder Antifekt® auszuwischen.
- Jede neue in vitro Zelllinie ist vor experimentellem Gebrauch auf Mycoplasmen zu testen.
- Jede neue in vitro Zelllinie sollte bis zum Erhalt eines negativen Mycoplasmen-Testergebnisses ausschließlich unter einem Quarantäne-Hood bearbeitet und in einem Quarantäne-Inkubator kultiviert werden. Zunächst ist die neue Zelllinie hochzuzüchten, um möglichst viele Zellen tiefrieren zu können (mind. 10 Cryotubes a 20 Mio. Zellen). Des Weiteren ist ein geeigneter Test auf Mycoplasmen durchzuführen (siehe entsprechende SOP). Erst nach Erhalt des negativen Mycoplasmen-Testergebnisses darf die neu erworbene Zelllinie experimentell genutzt werden. Die Kultivierung dieser Zelllinie sollte dann nur noch unter einem Nicht-Quarantäne-Hood durchgeführt werden.
- Bei mycobakterieller Kontamination sind Zellkulturen umgehend zu entfernen.

- Kultivierte Zelllinien sind alle 6-8 Wochen zu erneuern. Jede Zellpassage ist mit Datum und Verdünnung zu notieren.
- Der Inkubator ist mindestens einmal monatlich zu säubern.

**Suspensionszellkulturen:**

HL-60, K562, MOLT-4, REH, BLIN, CCRF-CEM, U937

**Benötigte Materialien:**

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin:

(Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Lagerung: 4°C

Fetales Kälber Serum:

(Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (500 ml Fetales Kälberserum werden aufgetaut und steril zu 50 ml in Falcon-Tubes abgefüllt und erneut bei -20°C eingefroren),

Lagerung: -20°C

**Herstellung des Inkubationsmediums:**

500 ml RPMI 1640 Medium werden unter sterilen Bedingungen mit 50 ml fetalem Kälberserum gemischt.

**Inkubationsbedingungen:**

T-75 Zellkulturflaschen Greiner Labortechnik (Frickenhausen, Deutschland)

Inkubator-Standardbedingungen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampf-gesättigte Atmosphäre

**Passagieren:**

Ist das Zellkulturmedium verbraucht (Farbumschlag nach gelb), sind die Zellen zu passagieren. Dazu ist die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Falcon Tube zu überführen und 10 min bei 1600 rpm zu zentrifugieren. Der Medium-Überstand ist mit einer sterilen Einmalpipette abzunehmen und zu werfen. Das Zellpellet wird mit Zellkulturmedium resuspendiert und ein entsprechender Teil der Zellsuspension wird in eine neue T-75 Zellkulturflasche überführt und mit Zellkulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt.

Alternativ können auch 5 ml Zellsuspension in eine neue T-75 Flasche überführt und mit



25 ml Zellkulturmedium auf 30 ml Gesamtvolumen aufgefüllt werden (entspricht 1:6 Passage). Sind aufgrund der Proliferationsraten der Zelllinien andere Passagekonzentrationen gewünscht, sind die Volumina entsprechend zu variieren. Bei 1:2 bzw. 1:3 Passagen ist zu berücksichtigen, dass bei diesem Verfahren der Anteil an verbrauchtem Medium sehr hoch ist, daher ist in solchen Fällen das verbrauchte Medium durch Zentrifugation, wie oben beschrieben, von den Zellen zu entfernen.

**Adhäsionszellkulturen:**

Ewing Sarkom Zelllinien: CADO-ES, VH-64, RM-82, STAT-ET-1, STAT-ET-2.1, TC-71, WE-68

Neuroblastomzelllinien: IMR 5, SK-NS-H, SH-SY5Y, SHEP, SMS-KCN, CH-LA-90, LAN-6, NGP

**Benötigte Materialien:**

RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Lagerung: 4°C

Fetales Kälber Serum (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (500 ml Fetales Kälberserum werden aufgetaut und steril zu 50 ml in Falcon-Tubes abgefüllt und erneut bei -20°C eingefroren), Lagerung: -20°C

**Herstellung des Inkubationsmediums:**

500 ml RPMI 1640 Medium werden unter sterilen Bedingungen mit 50 ml fetalem Kälberserum gemischt.

**Inkubationsbedingungen:**

T-25 Zellkulturflaschen Greiner Labortechnik (Frickhausen, Deutschland)

Kollagenbeschichtung der Flaschenböden

Inkubator-Standardbedingungen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampf-gesättigte Atmosphäre

**Kollagenbeschichtung:**

Benötigte Chemikalien:

- Rattenschwanzkollagen (4 mg/ml) Cell Concepts (Umkirch, Deutschland)
- Eisessig Baker Chemicals (Deventer, Niederlande)

- Demineralisiertes Wasser hergestellt mit Milli-Q-UF, Millipore (Eschborn, Germany)

**Herstellung von 0,1 N Essigsäure (500 ml):**

In einem 500 ml Messkolben werden ca. 400 ml demineralisiertes Wasser vorgelegt und mit 2,95 ml Eisessig versetzt. Anschließend mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Die Lösung durch einen 0,2 µm Filter steril filtrieren bzw. autoklavieren.

**Herstellung der Collagen-Essigsäure:**

unter sterilen Herstellungsbedingungen 45 ml 0,1 N Essigsäure in steriles 50 ml Falcon-Tube geben, 2,2 ml Kollagen S Typ I (4 mg/ml) zugeben und mischen.

**Beschichtung der Zellkulturflaschen:**

- Unter sterilen Herstellungsbedingungen 1,5 ml Kollagen-Essigsäure (3 x 500 µl mit der Multipipette) in die T-25 Zellkulturflaschen geben.
- Den Boden durch vorsichtiges Schwenken der Flasche benetzen, die Flasche verschließen und 2 Tage unter der Werkbank ruhen lassen, ab und zu umschwenken, um den Flaschenboden gleichmäßig zu benetzen.
- Nach 2 Tagen die Flüssigkeit mit einer sterilen Pipette aus den Flaschen absaugen und die restliche Flüssigkeit aus den offenen Flaschen unter laufender Werkbank über Nacht trocknen und verdunsten lassen.

**Passagieren:**

Sind die Zellen in den Flaschen konfluent, d.h. ist der Flaschenboden komplett mit Zellen bedeckt bzw. ist das Zellkulturmedium verbraucht (Farbumschlag nach gelb), müssen die Zellen passagiert werden.

Dazu wird das Medium aus der Zellkulturflasche mit einer sterilen Einmalpipette (5 ml) abgesaugt und verworfen.

Anschließend wird 1 ml Trypsin-EDTA (1x konzentriert) in die Flasche gegeben. Nachdem der Zellrasen durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche benetzt wurde, wird das Trypsin-EDTA mit einer sterilen Einmalpipette (2 ml) abgesaugt und verworfen.

Die mit Trypsin-EDTA benetzten Zellen werden im Inkubator bei 37°C inkubiert. Dabei ist in regelmäßigen Abständen (alle 1-2 min) zu kontrollieren, in wie weit die Zellen noch

adhärieren. Sobald die Zellen sich vom Zellboden lösen, werden die Zellen unter der Sterilwerkbank in 5 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS resuspendiert. 1 ml der Suspension wird in eine neue kollagenbeschichtete Zellkulturflasche überführt und mit 4 ml Zellkulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt (Passage 1:5). Werden für in-vitro Untersuchungen mehr Zellen benötigt, werden entsprechend weniger Zellen verworfen und mehr Zellkulturflaschen angelegt. In Abhängigkeit von der Replikationsdauer der Zelllinien können die Zelllinien auch im Verhältnis 1:2 bis 1:20 passagiert werden.

Auf der Zellkulturflasche ist der Name der Zelllinie, das Datum der Passage und der Verdünnungsfaktor zu notieren. Des Weiteren ist im Laborbuch „Dokumentation - Zellkultur“ das Datum der Passage und der Verdünnungsfaktor nebst eventuellen weiteren Bemerkungen mit Unterschrift zu dokumentieren.

Fakultativ kann nach dem Abnehmen des verbrauchten Mediums der Zellrasen mit PBS-Puffer pH 7.4 gewaschen werden. Dazu werden 5 ml steriles PBS pH 7,4 in die Zellkulturflasche gegeben. Nachdem der Zellrasen durch vorsichtiges schwenken der Flasche benetzt wurde, wird das PBS mit einer sterilen Einmalpipette wieder abgesaugt und verworfen.

Nachdem die mit Trypsin benetzten Zellen beginnen sich vom Zellboden abzulösen, können sie statt mit Zellkulturmedium auch mit sterilem PBS pH 7,4 resuspendiert werden. Die Zellsuspension wird dann in ein Falcon-Tube (15 ml) überführt und 10 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer sterilen Einmalpipette abgenommen und das Zellpellet wird in 5 ml RPMI resuspendiert.

#### **Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff:**

- 1) Cryotubes aus dem Stickstofftank entnehmen und schnell auftauen
- 2) Beschriftung der Cryotubes (Einfrierdatum, Passage) im Laborbuch notieren
- 3) unmittelbar nachdem die Zellen aufgetaut sind, Cryotube unter einer Sterilbank mit einem in 70% Ethanol getränkten Lappen abwischen
- 4) Cryotube öffnen und den Inhalt mit einer sterilen Einmalpipette in ein steriles Universaltube mit 30 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium transferieren
- 5) Universaltube für 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- 6) den Überstand entfernen und die Zellen in Zellkulturmedium (Zelldichte 100.000 - 500.000/ml) resuspendieren

- 7) Zelllinie frühestens eine Woche nach dem Auftauen bzw. erst, wenn ein normales Wachstumsverhalten, eine normale Zellmorphologie und ein negativer Mycoplasmentest vorliegen, benutzen

### **Einfrieren von Zellen:**

- 1) Zahl der einzufrierenden Zellen bestimmen (z.B. Haemocytometer, Coulter Counter)
- zur Zellzahlbestimmung ein Gemisch aus 10  $\mu$ l Zellsuspension + 10  $\mu$ l Trypanblaulösung + 80  $\mu$ l PBS-Puffer herstellen,
  - 10  $\mu$ l der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer füllen (Verdünnung 1:10) und unter dem Mikroskop 4 x 16 Kästchen auszählen,
  - Rechnung zur Bestimmung der Gesamtzahl der isolierten Zellen:  
*ermittelte Zellzahl (Summe der Zellen aus 4 x 16 Kästchen)*

*x Volumen des Mediums*

*x f (f = Verdünnungsfaktor hier 1:10, s.o.)*

*x 2,5 (Kammerkonstante)*

*x 1000 (Umrechnung auf ml)*

- 2) Zellen für 5 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren

- 3) Gefrierlösung aus:
- |                  |      |                  |
|------------------|------|------------------|
| FCS              | 2 ml | (entspricht 20%) |
| DMSO             | 2 ml | (entspricht 20%) |
| Zellkulturmedium | 6 ml |                  |

herstellen, Zellkulturmedium vorlegen, FCS und zum Schluss das DMSO zugeben, mischen und die Lösung durch einen hydrophilen 0,2  $\mu$ m Filter steril filtrieren,

- 4) Zellen in FCS-haltigem Medium (Zielzellendichte ca. 40 Mio./ml) resuspendieren
- 5) jeweils 500  $\mu$ l zellhaltiges Medium in ein steriles Cryotube transferieren (pro Cryotube: 0,5 ml = ca. 20 Mio. Zellen)
- 6) langsam 0,5 ml kalte „Gefrierlösung“ in jedes Cryotube pipettieren
- 7) Cryotubes in Einfrierbox setzen und sofort in einen Tiefkühlschrank setzen, die Einfrierbox muss mit Isopropanol bis zur Markierung gefüllt sein,
- 8) nachdem die Zellen in der Einfrierbox auf  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt sind (nach ca. 80 Stunden) Cryotubes in flüssigen Stickstofftank überführen,
- 9) kryokonservierte Zellen nur auf Trockeneis transportieren
- 10) Ort der Lagerung (Fach, Position) in dem dafür vorgesehenen Ordner dokumentieren

**Ergänzungen:****Allgemeine Anweisungen:****steriles Arbeiten:**

- Das Arbeiten mit Zellkulturen ist steril unter einer Sicherheitswerkbank durchzuführen. Vor und nach der Benutzung der Sicherheitswerkbank sind die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol oder Antifekt® zu desinfizieren. Die Werkbank muss sich vor dem Beginn der eigentlichen Arbeiten mindestens zehn min im Betrieb befinden (10 min Vorlauf).
- Alle Materialien, die direkten Kontakt zu den Zellen und dem Zellkulturmedium haben, müssen steril sein. So sind zum Transferieren von Zellen, steriles Medium, steriles fetales Kälberserum (FCS), Antibiotika und sterile Einmalpipetten zu verwenden.
- Sterile Materialien (Pipettenspitzen, Einmalpipetten, Zellkulturflaschen etc.), die versehentlich mit unsterilen Gegenständen Kontakt hatten, sind zu verwerfen und durch neue sterile Produkte zu ersetzen.
- Der Inkubator ist in regelmäßigen Abständen zu säubern und mit 70%igem Ethanol zu desinfizieren. Die Wartung des Inkubators ist im Gerätebuch zu vermerken.

**Umgang mit Zellkulturen:**

- Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5% kultiviert.
- Um exponentielles Wachstum und damit gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten, sind die Zellen entsprechend ihres Wachstums in regelmäßigen Abständen zu passagieren. Jede Zellpassage ist mit Datum und Verdünnung im Laborbuch zu notieren.

**Passagieren (Teilen der Zellen):**

Um ein exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten, müssen die Zellen in regelmäßigen Abständen mit frischem Zellkulturmedium versorgt werden. Entsprechend ihrer Wachstumsraten erfolgt die Verdünnung mit frischem Medium im Verhältnis entsprechend (z.B.: 1:3).

- Medium auf 37°C erwärmen (z.B. im Inkubator oder auf Raumtemperatur

unter der Sterilbank). In jedem Fall ist der Flaschenhals vorher mit 70%igem Ethanol oder Antifekt® zu desinfizieren.

- Neue Zellkulturflaschen beschriften: Zelllinie, Datum, Teilungsrate (z.B. 1:3), eventuell Medium und ob die Flaschen ge-coated sind.

Adhärenz wachsende Zellen:

- 4 ml in die so beschrifteten sterilen Zellkulturflaschen vorlegen und die Flaschen wieder verschließen und zur Seite stellen.
- Bei den zu teilenden „Zelllinien“ wird das gesamte alte Medium abgesaugt (sterile Einmalpipette 10 ml) und verworfen.
- Dann wird ca. 1 ml Trypsin (steril) auf die Zellen gegeben (sterile Einmalpipette 2 ml), in der Flasche hin und her geschwenkt, wieder abgesaugt und verworfen.
- Damit sich die Zellen vom Flaschenboden lösen, werden die Flaschen zugeschraubt ca. 5 min. in den Inkubator gestellt (manche Zelllinien brauchen noch etwas länger).
- Durch leichtes Schlagen der Flaschen gegen die Hand sieht man, ob die Zellen sich gut abgelöst haben. Lösen sich die Zellen nicht, gibt man noch mal ca. 200-300 µl Trypsin dazu (darauf lassen!), stellt sie wieder in den Inkubator und kontrolliert in kurzen Abständen, ob sich die Zellen lösen.
- Wenn die Zellen sich ablösen, werden sie mit einem bestimmten Volumen an frischen Medium resuspendiert (abhängig von der Teilungsrate, s. Tabelle).
- Verdünnung der adhärenz Zellen, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst haben. Ein bestimmtes Volumen dieser Zellsuspension wird dann in die neue Flasche überführt.
- Kultivierte Zelllinien sind nach 20-25 Passagen zu erneuern.
- Jede neue Zelllinie ist vor dem experimentellen Gebrauch auf Mycoplasmen zu testen. Kultivierte Zellen sind in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen zu prüfen. Der Mycoplasmentest wird nach der Arbeitsanleitung des „Venor® GeM Mycoplasmen-Nachweis für die konventionelle PCR“ von Minerva Biolabs gemacht. Diese Anleitung liegt jedem Mycoplasmentest bei. Die Ergebnisse der Mycoplasmentests sind mit Datum und Kürzel im Laborbuch zu dokumentieren. Zellkulturflaschen, deren Inhalt mit Mycoplasmen, Bakterien oder Pilzen kontaminiert sind, müssen umgehend aus der Kultur (Inkubator) entfernt werden. Eine Trübung des

Mediums, die bereits vor der Resuspendierung der Zellen besteht, kann auf eine Kontamination des Mediums hindeuten.

**Angabe zu den Verdünnungen beim Passagieren der adhärent wachsenden Zellen (Angabe aus der SOP 1 Zellkultur):**

Teilungsrate	Medium resuspendiert (ml)	davon in neue Flasche (ml)
1:3	3	1
1:4	2	0,5
1:5	2,5	0,5
1:6	3	0,5
1:7	3,5	0,5
1:8	4	0,5
1:9	4,5	0,5
1:10	5	0,5
1:15	5	0,3
1:20	5	0,25
1:25	5	0,2
1:30	5	0,16
1:50	5	0,1

**Angabe zu den Verdünnungen beim Passagieren der in Suspension wachsenden Zellen (Angabe aus der SOP 1 Zellkultur):**

Teilungsrate	Medium resuspendiert (ml)	davon in neue Flasche (ml)
1:3	3	1,5
1:4	3,75	1,25
1:5	4	1
1:6	4,2	0,8
1:7	4,3	0,7
1:8	4,4	0,6
1:9	4,45	0,55
1:10	4,5	0,5
1:15	4,7	0,3
1:20	4,75	0,25
1:25	4,8	0,2
1:30	4,84	0,16
1:50	4,9	0,1

**Angabe der gemessenen RNA-Konzentrationen nach RNA-Isolierung:**

<b>Zelllinie</b>	<b>RNA-Konzentration [µg/ml]</b>	<b>Reinheitsgrad (Messung 1)</b>	<b>Reinheitsgrad (Messung 2)</b>
CADO-ES-1	161,8	1,85	1,82
CCRF-CEM	1186	1,74	2,21
CCRF-CEM	1186	1,76	2,34
CCRF-CEM	897,6	1,81	2,38
CCRF-CEM	819,2	1,86	2,31
DAOY	1272,5	1,88	2,19
DAOY	382,2	1,77	2,39
HL-60	420,1	1,83	2,26
HL-60	463,1	1,74	1,87
HL-60	476,7	1,89	1,8
IMR-5	2239,7	1,91	2,32
IMR-5	975,7	2,15	1,88
SMS-KCN	214,3	1,9	1,43
SMS-KCN	203,5	1,98	1,52
SMS-KCN	429,7	1,84	2,31
SMS-KCN	439,2	1,86	2,31
MOLT-4	910,4	2,29	1,87
MOLT-4	455,1	1,86	1,13
MNNG-HOS	618	1,89	1,99
MNNG-HOS	702,9	1,84	1,94
OST	1497,5	1,84	2,25
OST	792,5	1,86	1,97
RD	2086,8	1,86	2,36
RD	1272,2	1,85	2,34
REH	363,4	1,82	2,29
REH	285,8	1,7	1,71
RH-30	743,1	1,74	2,28
RH-30	1495,6	1,88	1,97
SHEP	1275,7	1,76	2,3
SHEP	944,5	1,8	2,29
SH-SY5Y	361,7	2,3	2,01
SH-SY5Y	364,1	1,83	1,99



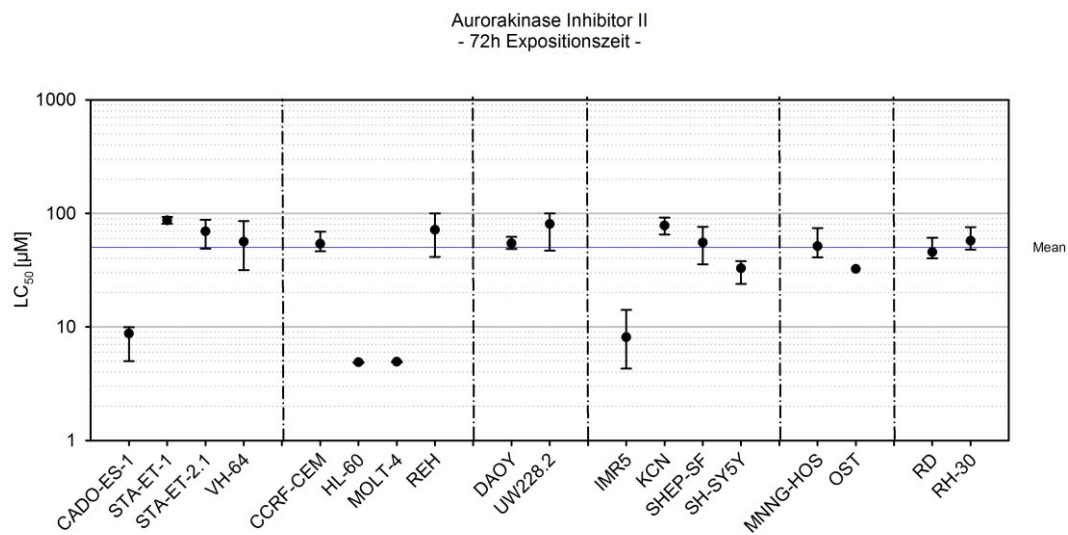
STA-ET-1	499,2	1,82	2,09
STA-ET-1	496,7	1,86	2,1
STA-ET-1	875,4	1,83	2,26
STA-ET-1	1485,6	1,78	2,31
STA-ET-2.1			
STA-ET-2.1			
UW228.2	518,3	1,82	2
UW228.2	198,1	1,92	2,16
VH64	406,3	1,83	2,27
VH64	200,2	1,8	2,24

Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,6-1.9 liegen (s. Kapitel 2.5). Für einige Zelllinien standen mehrere Zellpellets zur Verfügung. Daher existieren für einige Zelllinien mehrere Ergebnisse.

#### Angabe der ermittelten Werte für Zelllinien, welche mit dem Aurorakinaseinhibitor

#### II behandelt wurden:

Zelllinie	GI-50 (nM)	LC-50 (nM)	Generationszeit (h)	RNA-Expression AURKA	RNA-Expression AURKB
CADO-ES-1	4,85	8,74	28,24	1,23	1,53
CCRF-CEM	3,88	53,86	16,26	2,36	2,05
DAOY	22,0	54,36	47,47	2,45	2,50
HL-60	2,59	4,88	19,92	1,61	1,85
IMR-5	3,22	8,11	40,36	3,51	1,34
SMS-KCN	45,81	78,02	49,91	2,25	1,29
MOLT-4	2,38	4,93	17,26	1,88	1,61
MNNG-HOS	(13,55)	51,36	40,64	3,73	4,30
OST	(9,33)	32,39	78,47	2,89	5,37
RD	6,92	45,61	23,92	3,25	1,20
REH	7,31	71,55	24,92	1,81	1,18
RH-30	15,17	57,33	30,504	2,45	1,71
SHEP	8,94	55,39	40,31	1,16	1,30
SH-SY5Y	3,18	32,79	62,84	2,87	1,29
STA-ET-1	8,21	86,70	78,31	2,04	2,91
STA-ET-2.1	7,73	69,39	28,34	1,20	1,26
UW228.2	36,17	77,41	51,49	1,16	2,21
VH-64	2,33	56,22	22,33	1,23	1,48



LC<sub>50</sub>-Werte in logarithmischer Darstellung in der Zusammenschau aller mit dem Aurorakinase-Inhibitor II behandelten Zelllinien, Erklärung zur Darstellungsweise s. Abb. 14.

Anmerkung: Für die Osteosarkomzelllinie OST konnte nur in 1/6 Versuchen eine GI<sub>50</sub> innerhalb der gewählten Testkonzentrationen ermittelt werden

**Beispielhafte Darstellung der Rohdaten zu einem Versuch mit der Zelllinie CADO-ES1 nach Behandlung mit dem Aurora-Kinaseinhibitor II**

Zelllinie: CADO-ES1    Verdopplungszeit    27,0 h  
 Testsubstanz: Aurorakinase  
 Ansatz: 25.09.2006 Nr.    1 T0:    22.09.2006  
 Inkubationszeit: 72h

Konzentration [Einheit]	0h	72h							
	K	K	0,1	0,5	1	5	10	50	100
	0	0,8823	0,9154	0,838	0,8522	0,0597	0,0557	0,0267*	0,0147*
	0	0,8397	0,8494	0,7828	0,7979	0,0707	0,0561	0,0336	0,0092
	0	0,841	0,824	0,8029	0,8024	0,069	0,0499	0,0364	0,0102
	0	0,8263	0,807	0,7818	0,8178	0,061	0,065	0,0333	0,0107
<b>Mittelwert</b>	<b>0,13315</b>	<b>0,847</b>	<b>0,849</b>	<b>0,801</b>	<b>0,818</b>	<b>0,065</b>	<b>0,057</b>	<b>0,034</b>	<b>0,010</b>
<b>STABW</b>	<b>0,00590678</b>	<b>0,024245</b>	<b>0,047603</b>	<b>0,026280</b>	<b>0,024606</b>	<b>0,005554</b>	<b>0,006231</b>	<b>0,001710</b>	<b>0,000764</b>
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>4,44</b>	<b>2,86</b>	<b>5,61</b>	<b>3,28</b>	<b>3,01</b>	<b>8,53</b>	<b>10,99</b>	<b>4,97</b>	<b>7,61</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle**

%		100,00	100,19	94,58	96,49	7,68	6,69	4,06	1,18
<b>STABW %</b>		<b>2,86</b>	<b>5,62</b>	<b>3,10</b>	<b>2,90</b>	<b>0,66</b>	<b>0,74</b>	<b>0,20</b>	<b>0,09</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle zur Stunde 0**

%	100,00	636,37	637,59	601,86	614,03	48,89	42,56	25,86	7,54
<b>STABW %</b>	<b>4,44</b>	<b>18,21</b>	<b>35,75</b>	<b>19,74</b>	<b>18,48</b>	<b>4,17</b>	<b>4,68</b>	<b>1,28</b>	<b>0,57</b>

<b>GI<sub>50</sub></b>	<b>3,09</b>
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>4,99</b>

Erklärung der Ablürzungen: K = Kontrolle, STABW = Standardabweichung; Angaben der Konzentrationen in nM; Zahlen mit \* = Ausreißer, welche für die weitere Berechnung nicht berücksichtigt wurden

**Beispielhafte Darstellung der Rohdaten zu einem Versuch mit der Zelllinie CCRF-CEM nach Behandlung mit Paclitaxel:**

Zelllinie: CCRF-CEM  
 Testsubstanz: Taxol  
 Ansatz: 11.09.2006 Nr. 1 T0: 08.09.2006  
 Inkubationszeit: 72h  
 Verdopplungszeit: 16,3 h

Konzentration [Einheit]	0h	72h							
	K	K	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1
0	0,9801	1,0509	0,9501	1,0042	0,9444	0,7209	0,006	0,0051	
0	1,055	1,139	1,0466	0,9586	0,9471	0,7713	0,0062	0,0056	
0	1,2358	1,0935	1,1164	1,0151	1,0713	0,8112	0,0056	0,0047	
0	1,1054	1,1633	1,051	0,954	1,01	0,7167	0,0064	0,0051	
<b>Mittelwert</b>	<b>0,05098889</b>	<b>1,094</b>	<b>1,112</b>	<b>1,041</b>	<b>0,983</b>	<b>0,993</b>	<b>0,755</b>	<b>0,006</b>	<b>0,005</b>
<b>STABW</b>	<b>0,00590835</b>	<b>0,107597</b>	<b>0,049785</b>	<b>0,068506</b>	<b>0,031178</b>	<b>0,060245</b>	<b>0,044922</b>	<b>0,000342</b>	<b>0,000369</b>
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>11,59</b>	<b>9,83</b>	<b>4,48</b>	<b>6,58</b>	<b>3,17</b>	<b>6,07</b>	<b>5,95</b>	<b>5,65</b>	<b>7,19</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle**

%		100,00	101,61	95,15	89,85	90,78	69,01	0,55	0,47
<b>STABW %</b>		<b>9,83</b>	<b>4,55</b>	<b>6,26</b>	<b>2,85</b>	<b>5,51</b>	<b>4,11</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle zur Stunde 0**

%	100,00	2145,71	2180,23	2041,67	1927,82	1947,88	1480,76	11,87	10,05
<b>STABW %</b>	<b>11,59</b>	<b>211,02</b>	<b>97,64</b>	<b>134,36</b>	<b>61,15</b>	<b>118,15</b>	<b>88,10</b>	<b>0,67</b>	<b>0,72</b>

GI <sub>50</sub>	0,02
LC <sub>50</sub>	0,05

Erklärung der Ablürzungen: K = Kontrolle, STABW = Standardabweichung; Angaben der Konzentrationen in nM

**Beispielhafte Darstellung der Rohdaten zu einem Versuch mit der Zelllinie VH-64 nach Behandlung mit Vincristin:**

Zelllinie: **VH-64**  
 Testsubstanz: **Vincristin**  
 Ansatz: **25.09.2006** Nr. **1** T0: **22.09.2006**  
 Verdopplungszeit **20,5 h**  
 Inkubationszeit: **72h**

	<b>0h</b>	<b>72h</b>							
Konzentration [Einheit]	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
0		1,4052	0,5858	0,1697	0,0952	0,0786	0,0606	0,0627	0,1106
0		1,36	0,6762	0,1624	0,0985	0,0617	0,0646	0,0488	0,0884
0		1,4972	0,596	0,1249	0,0695	0,0437	0,0668	0,0587	0,0802
0		1,2479	0,4921	0,1328	0,056	0,0425	0,0584	0,0481	0,0871
<b>Mittelwert</b>	<b>0,12147778</b>	<b>1,378</b>	<b>0,588</b>	<b>0,147</b>	<b>0,080</b>	<b>0,057</b>	<b>0,063</b>	<b>0,055</b>	<b>0,092</b>
<b>STABW</b>	<b>0,00969172</b>	<b>0,103598</b>	<b>0,075375</b>	<b>0,021922</b>	<b>0,020489</b>	<b>0,017080</b>	<b>0,003798</b>	<b>0,007264</b>	<b>0,013184</b>
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>7,98</b>	<b>7,52</b>	<b>12,83</b>	<b>14,87</b>	<b>25,68</b>	<b>30,16</b>	<b>6,07</b>	<b>13,31</b>	<b>14,40</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle**

%		<b>100,00</b>	<b>42,65</b>	<b>10,70</b>	<b>5,79</b>	<b>4,11</b>	<b>4,54</b>	<b>3,96</b>	<b>6,65</b>
Stabw %		<b>7,52</b>	<b>5,47</b>	<b>1,59</b>	<b>1,49</b>	<b>1,24</b>	<b>0,28</b>	<b>0,53</b>	<b>0,96</b>

**Wachstum bezogen auf die Kontrolle zur Stunde 0**

%	<b>100,00</b>	<b>1134,01</b>	<b>483,65</b>	<b>121,38</b>	<b>65,69</b>	<b>46,61</b>	<b>51,53</b>	<b>44,93</b>	<b>75,38</b>
Stabw %	<b>7,98</b>	<b>85,28</b>	<b>62,05</b>	<b>18,05</b>	<b>16,87</b>	<b>14,06</b>	<b>3,13</b>	<b>5,98</b>	<b>10,85</b>

<b>GI<sub>50</sub></b>	<b>0,87</b>
------------------------	-------------

<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>42,9</b>
------------------------	-------------

Erklärung der Ablürzungen: K = Kontrolle, STABW = Standardabweichung; Angaben der Konzentrationen in nM



## **9. Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. med. J. Boos danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky für ihre stetige und engagierte Betreuung zu jeder Zeit, für die Beratung bei der Datenauswertung und ebenfalls für viele wertvolle Anregungen.

Außerdem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Funktionsbereiches „Klinische Pharmakologie“ der Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Münster unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky. Insbesondere erwähnen möchte ich hier die beiden Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau S. Schulz und Frau P. Schulze-Westhoff für die sehr hilfreiche und geduldige Einarbeitung in die laborspezifischen Abläufe und für die kontinuierliche Unterstützung während des praktischen Teils meiner Arbeit.