

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

Die Koexpression von Aurora A Kinase und EGFR ist prognostisch für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs und stellt eine Zielstruktur für die Therapie dar

Fabienne Dominique von Keitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. Ch. Peschel
2. apl. Prof. Dr. G. Keller

Die Dissertation wurde am 20.03.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2013 angenommen.

Für meine lieben Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	SUMMARY	7
3	EINLEITUNG	9
3.1	PLATTENEPIHELKARZINOME IM KOPF- HALS- BEREICH	9
3.1.1	<i>Pathogenese</i>	9
3.1.2	<i>Therapie</i>	10
3.2	EGFR	12
3.3	ZELLZYKLUS	16
3.4	AURORA KINASEN	16
3.5	ZIELSETZUNG	22
4	MATERIAL UND METHODEN	24
4.1	ZELLKULTUR	24
4.2	EXTINKTIONSMESSUNGEN (MTT ASSAYS)	24
4.3	WESTERN BLOT	25
4.3.1	<i>Inkubation der Zellen</i>	25
4.3.2	<i>Proteinlyse</i>	25
4.3.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford und Biorad</i>	26
4.3.4	<i>Gelelektrophorese</i>	26
4.3.5	<i>Semi- Dry und Nass- Transfer</i>	27
4.3.6	<i>Blockierung unspezifischer Reaktionen</i>	28
4.3.7	<i>Primärantikörper Inkubation</i>	28
4.3.8	<i>Sekundärantikörper Inkubation</i>	28
4.3.9	<i>Entwickeln</i>	29
4.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	29
4.5	PCR	30
4.5.1	<i>RT-PCR</i>	30
4.5.2	<i>quantitative RT-PCR</i>	32
4.6	PROLIFERATIONSMESSUNG	33
4.6.1	<i>Proliferation unter 0nM, 200nM und 400nM Cetuximab</i>	33
4.6.2	<i>Proliferation unter 0nM, 200nM Cetuximab, 5nM AS und 200nM Cetuximab & 5nM AS</i>	34

4.7	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	34
4.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	38
4.9	MATERIAL.....	39
4.9.1	<i>Laborgeräte</i>	39
4.9.2	<i>Chemikalien</i>	40
4.9.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	42
4.9.4	<i>Antikörper</i>	42
4.9.5	<i>Zellkultur</i>	43
5	ERGEBNISSE.....	45
5.1	DIE KOEXPRESSION VON AURORA A KINASE UND EGFR FÜHRT ZU EINEM SIGNIFIKANT HERABGESETZTEN GESAMTÜBERLEBEN.....	45
5.2	NACHWEIS DER EXPRESSION VON AURORA A UND B KINASE UND EGFR IN SECHS HUMANEN PLATTENEPIHELKARZINOMZELLINIEN.....	50
5.3	NACHWEIS UNTERSCHIEDLICHER AKTIVITÄTSLEVEL DER AURORA KINASEN UND EGFR IN HUMANEN PLATTENEPIHELKARZINOM ZELLINIEN.....	53
5.4	INHIBITION DER AURORA KINASEN DURCH AS703562 BEWIRKT EINE VERMINDERTE PHOSPHORYLIERUNG VON S10/HH3 DURCH AURORA B KINASE, EINEN G2/M-ARREST DES ZELLYKLUS' SOWIE EINE ZUNAHME DER APOPTOTISCHEN ZELLEN.....	55
5.5	INHIBITION VON EGFR DURCH CETUXIMAB SCHRÄNKT DIE PROLIFERATION BEI BEREITS 200NM EIN.....	60
5.6	SYNERGISTISCHE WIRKUNG VON PANAUROA KINASE INHIBITOR UND EGFR- ANTIKÖRPER ÜBERWINDET DIE CETUXIMAB RESISTENZ.....	64
5.7	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN PANAUROA KINASE INHIBITOREN UND GEZIELTER INHIBITION VON AUROA A KINASE.....	73
6	DISKUSSION.....	77
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	88
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	90
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	100
10	DANKSAGUNG.....	103
11	VERÖFFENTLICHUNG DER ARBEIT.....	104

1 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf- Hals- Bereich sind die sechst häufigste Tumorerkrankung weltweit. Allein in Deutschland erkranken jährlich 10000 Menschen an Kopf- Hals- Tumoren. Aufgrund des veränderten Lebensstils der gegenwärtigen Gesellschaft ist auch weiterhin mit einer Zunahme dieser Erkrankung zu rechnen. Die Behandlung dieser Erkrankung stellt immer noch eine große interdisziplinäre Herausforderung dar. Bislang konnte auch kein Durchbruch in der Behandlung vor allem bei fortgeschrittener oder metastasierter Erkrankung erzielt werden. Die Entwicklung neuer Therapieoptionen ist daher von großer Bedeutung und ist Hintergrund dieser Arbeit. Sowohl EGFR als auch die Aurora Kinasen wurden bereits als maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt identifiziert. Unklar war bislang allerdings inwiefern die kombinierte Überexpression die Tumorentstehung beeinflusst.

Die Analyse der Genexpression durch Verwendung öffentlicher Datenbanken zeigte, dass die Transkripte von Aurora A Kinase signifikant höher in Tumorgewebe als in normalem Gewebe vorliegen. Bei überlebenden Patienten waren die Transkriptionslevel geringer als bei verstorbenen Patienten.

Wir analysierten zunächst die klinischen Daten von 180 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereiches und führten mit deren Resektaten immunhistochemische Analysen durch. Patienten, die eine erhöhte EGFR und Aurora Kinase Expression aufwiesen stellten eine Risikogruppe mit herabgesetzten krankheitsfreien Überleben sowie Gesamtüberleben dar ($EGFR^{low}$ Aurora^{low} versus $EGFR^{high}$ Aurka^{high}, $p=0.024$). Unsere Ergebnisse suggerierten eine Verbindung zwischen der Aurora Kinase und der EGFR Expression. Durch gezielte Austestung verschiedener Konzentrationen von Cetuximab und Aurora Kinase Inhibitoren in 6 Zelllinien konnte eine kleinstmögliche Wirkdosis festgelegt werden. Unter Behandlung der Zelllinien mit dem panAurora Kinase Inhibitor kam es zu einer gestörten Zellteilung, Polyploidie und Apoptose. Der EGFR Status wurde durch die Aurora Kinase Inhibitoren nicht beeinträchtigt. Die Kombinationstherapie war effektiver im Vergleich zur Monotherapie mit EGFR oder Aurora Kinase Inhibitoren. Die panAurora Kinase Inhibition erwies sich als effektiver als die alleinige Aurora A Kinase Inhibition, sodass von einem größeren inhibitorischen Effekt vermittelt über

die Aurora B Kinase ausgegangen werden kann. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die kombinierte Erhöhung der EGFR und Aurora Kinase Proteinexpression sich ungünstig auf die Prognose und das Gesamtüberleben auswirkt. Die von uns entwickelte Kombinationstherapie hatte Einfluss auf den Zellzyklus und bewirkte eine Zunahme der Apoptose. Bisher konnten wir unsere Versuche nur mit Zelllinien durchführen, nun sollten weitere Versuche in-vivo erfolgen. (Vergl. Höllein et al. 2011 Abstract).

2 Summary

Squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN) is the sixth leading cause of cancer deaths worldwide. In Germany 10000 people are diagnosed of this particular cancer every year. Due to the current lifestyle it is likely that this number will even increase. Despite extense knowledge of risk factors and pathogenesis about 50 percent of all patients and essentially every patient with metastatic SCCHN eventually die from this disease. It is therefore of great importance to achieve a new kind of treatment.

In this work we analyzed six celllines concerning their expression of Aurora A and B kinsase and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). We analyzed the clinical data and performed immunohistochemistry for EGFR and Aurora A Kinase expression in 180 SCCHN patients. Patients characterized by elevated EGFR and elevated Aurka protein expression in tumor tissue represent a risk group with poor disease- free and overall survival ($EGFR^{low} \text{ Aurora}^{low}$ versus $EGFR^{high} \text{ Aurka}^{high}$, $p=0.024$). Furthermore our findings suggested a link between Aurora Kinase expression and EGFR expression in SCCHN. Additionally we tested different doses of the pan- Aurora kinase inhibitor AS and EGFR antibody Cetuximab in six cell lines to achieve the right dose in our treatment. We then tested our approved dose in combination of both, kinase inhibitor and EGFR antibody in FACS and cell growth curves. Suprisingly the combination was the most effective agent to inhibit tumor growth and achieve high levels of apoptosis and polyploidy.

Treating SCCHN cell lines with a panAurora kinase inhibitor resulted in defective cytokinesis, polyploidy and apoptosis, which was effective irrespective of the EGFR status. Combined Aurora kinase and EGFR targeting using a monoclonal anti- EGFR antibody was more effective compared to single EGFR and Aurora kinase inhibition. Comparing pan- Aurora kinase and Aurora- A targeting hints towards a strong and clinically relevant biological effect mediated via Aurora kinase B (Aurora-B). Taken together our findings characterize a new poor risk group in SCCHN patients defined by elevated EGFR and Aurora- A protein expression. Our results demonstrate that combined targeting of EGFR and Aurora kinases represents a therapeutic means to activate cell cycle checkpoints and apoptosis in SCCHN. Despite our knowledge in

cellines we weren't able to test the combined targeting in-vivo. Therefore the next step should be in- vivo experiments (Vergl. Höllein et al. 2011 Abstract).

3 Einleitung

3.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf- Hals- Bereich

Die meisten Tumore, die von der Mukosa des oberen Atem-/Speisetrakts ausgehen (Mundhöhle, Pharynx und Larynx), sind Plattenepithelkarzinome. Ungefähr 500.000 neue Fälle von HNSCC werden jährlich weltweit diagnostiziert. In Deutschland erkranken etwa 10000 Personen pro Jahr an einem HNSCC, wobei es sich bei 95% um ein Plattenepithelkarzinom handelt (Robert- Koch- Institut). Somit stellen Plattenepithelkarzinome des Kopf- Hals- Bereichs die sechsthäufigste tumorbedingte Todesursache weltweit dar (Mazedumar A et al. 2008). Es handelt sich um eine bösartige Erkrankung der oberen Atemwege, zu denen üblicherweise Mundhöhle, Speicheldrüsen, Nasenhöhlen, Pharynx und Larynx gehören.

Mit ca. 40% ist das Larynxkarzinom ist der häufigste maligne Tumor im HNO- Bereich. In über 90% der Fälle handelt es sich um ein Plattenepithelkarzinom, nur zu einem geringen Anteil handelt es sich um ein Adenokarzinom. Sie werden je nach Lokalisation in supraglottische, glottische und subglottische Karzinome unterteilt. Die beste Prognose haben die Glottiskarzinome, unter anderem bedingt durch ein frühzeitiges Auftreten von Heiserkeit. Die supraglottischen Karzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits zu etwa 60% metastasiert. Auch Zungenkarzinome sind relativ häufig (Nagel und Gürkov).

3.1.1 Pathogenese

Die Ursachen für die Entstehung von Kopf- Hals- Tumoren sind vielfältig. Tabakrauchen und Alkoholkonsum stellen die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Plattenepithelkarzinome dar (Hadad RI et al. 2008). Die Infektion mit dem humanen Papillomavirus scheint ebenfalls in Zusammenhang mit der Tumorentstehung zu stehen (D'Souza G et al. 2007). HPV wurde bereits als Erreger des Zervixkarzinoms identifiziert und gilt auch als Risikofaktor für die Entstehung von HNSCC (Walboomers JM et al. 1999). Es werden viele verschiedene Untergruppen beschrieben, entscheidend für die Entstehung von HNSCC scheint jedoch vorwiegend HPV-16 zu sein. Weitere Risikofaktoren, die eine untergeordnete Rolle spielen, sind eine Epstein- Barr- Vi-

rus- Infektion, schlechte Mundhygiene, Strahlenexposition und Exposition mit Lösungsmitteln und Holzstaub.

Je nach Ursprung des Karzinoms unterscheiden sich auch die Erstsymptome. Häufig kann durch das Fehlen dieser die Diagnose erst sehr spät gestellt werden. Symptome können Schmerzen beim Schlucken, blutig tingierter Speichel und Foetor ex ore sein. Die Verdachtsdiagnose ergibt sich aus dem Spiegelbefund, muss aber zusätzlich durch bimanuelle Palpation verifiziert werden, da die Tumore häufig in die Tiefe wachsen (Probst R et al. 2008).

T1	≤2cm
T2	>2cm- <4cm
T3	≥4cm, aber noch mit oberflächlichem Wachstum
T4	Tumor mit massiver Tumorerinfiltration, z.B. Knochen (unabhängig von der Größe)

Abbildung 3.1: T- Klassifikation von Lippen, Mundhöhlen- und Oropharynxmalignomen nach Probst R et al., Thieme Verlag 2008

3.1.2 Therapie

Die Standardtherapie umfasst Chemotherapie, Radiotherapie und chirurgische Resektion. Gerade die chirurgische Resektion stellt aufgrund der vitalen Strukturen und Funktionen in dieser anatomisch komplexen Region des Kopf- Hals- Bereichs eine große Herausforderung dar.

Die Therapie der Wahl ist größtenteils die chirurgische Tumorentfernung. In Abhängigkeit von Größe und Lokalisation wird der Gewebedefekt entweder primär verschlossen oder durch gestielte, beziehungsweise freie, mikrovaskulär anastomosierende Transplantate gedeckt. Eine Operation der Halsweichteile (Neck dissection) wird je nach Tumorlokalisierung und Stadium des Primärtumors ein- oder beidseits

durchgeführt. Postoperativ muss häufig eine Bestrahlung des Tumorgebietes und der Lymphabflusswege erfolgen. Als therapeutische Alternativen kommen in fortgeschrittenen Tumorstadien (T3/T4) auch die primäre Strahlentherapie oder simultane Radiochemotherapie infrage (Probst R, 2008).

Patienten, die mit einem HNSCC Stadium I oder II diagnostiziert werden, können häufig durch lokale Bestrahlung oder Tumorresektion geheilt werden. Ungünstigerweise besteht aber bei der Hälfte der Patienten zur Diagnosestellung eine bereits fortgeschrittene Tumorerkrankung mit einem 5- Jahresüberleben von weniger als 50% (Forastiere A et al. 2006). Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren sind Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung selten. Es kommt jedoch dadurch, dass Lokalbefunde erfolgreicher behandelt werden können, zu einer erhöhten Inzidenz der systemischen Ausbreitung (Goerner M et al. 2010). Patienten mit Rezidiven oder Metastasen haben derzeit eine schlechte Prognose mit einem medianen Überleben von sechs bis zehn Monaten (Bozec A et al. 2008). Für fortgeschrittene Tumore bleibt als einzige Therapieoption die systemische Chemotherapie, die allerdings mit signifikanten Toxizitätsraten in Verbindung gebracht wird, bedingt durch die hohe Prävalenz von Komorbiditäten und die problematischer Lebensführung der Patienten (Goon PK et al. 2009). Trotz der Fortschritte in der Behandlung hat sich in den vergangenen Jahren kaum etwas an dem Gesamtüberleben der Erkrankung geändert.

In einer Reihe von Studien erwies sich die Behandlung mit Cetuximab, einem monoklonalen Antikörper gegen EGFR, sowohl für lokal fortgeschrittene, potentiell heilbare HNSCC, als auch für unheilbare, rezidivierende oder metastasierende HNSCC als geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von hoch dosierter Bestrahlung mit Cetuximab bei Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Kopf- Hals- Bereichs zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens führt (Bonner JA et al. 2009). Cetuximab als Monotherapie hingegen zeigte nur eine limitierte Wirksamkeit (Vermorken JB et al. 2005).

Wie in vielen soliden Tumoren können auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs eine Vielzahl an komplex- molekularen Anomalien beobachtet werden. P53 und p16 sind inaktiviert in der Mehrzahl der HNSCC, Cyclin D1, Cyclooxygenase-2, EGFR und VEGF zeigen eine Überexpression oder Vervielfältigung in

HNSCC. Zudem sind viele onkogenetische Signalwege wie Ras, PI3K/PTEN/Akt, TGF- β /BMP und EGFR/STAT3 sind hochreguliert in HNSCC (Copper MP et al. 1995).

3.2 EGFR

Der Epidermal Growth Faktor (EGF) ist ein Wachstumsfaktor, der an den gleichnamigen Rezeptor (Epidermal Growth Factor Rezeptor, EGFR) bindet. Dieser gehört zu der Familie der Tyrosinkinase und ist ein transmembranes Glykoprotein, welches aus einer extrazellulären Bindungsstelle und einer intrazellulären Rezeptor- Tyrosinkinase besteht. Die Erb/HER Familie besitzt einen ähnlichen Aufbau der Tyrosinkinase- Domäne, aber unterscheidet sich sehr stark im Aufbau der extrazellulären und COOH-terminalen Domänen (Klapper LN et al. 2000). EGFR ist ein Protoonkogen, das ubiquitär in normalem Gewebe vorkommt und in vielen Tumorgeweben überexprimiert vorliegt (Nicholson RI et al. 2001). Zu diesen zählt unter anderem Gewebe aus dem Kopf- Hals- Bereich, Mamma, Prostata, Kolon, Harnblase, Niere, Ovar, Lunge und des Gehirns (Kim ES et al. 2001). Der Nachweis einer Überexpression induziert eine schlechtere Prognose und ein verkürztes Gesamtüberleben. Mehr als 95% der Plattenepithelkarzinome des Kopf- Hals- Bereichs exprimieren ein erhöhtes EGFR- Level im Vergleich zu Patienten mit normalem Mukosagewebe (Sok JC et al. 2006).

Die Hauptsignalwege, die durch EGFR aktiviert werden sind der RAS/RAF/MAP Kinase Signalweg und der PI3K/PTEN/AKT Signalweg (Lurje G et al. 2009). Aktivierte MAPKs phosphorylieren und aktivieren spezifische intranukleare Transkriptionsfaktoren und induzieren somit die Zellmigration und Proliferation (Vivanco L et al. 2002). Es besteht darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der EGFR- Expression und dem Transkriptionsfaktor Signaltransducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), welcher eine Rolle bei der Regulation der Gentranskription spielt (Haura HB et al. 2005, Lo HW et al. 2005). STAT3 ist häufig aktiviert in HNSCC und seine Aktivierung und Expression stehen in Zusammenhang mit einer verkürzten Überlebenszeit. Die Stimulation von EGFR führt zur Aktivierung von STAT3. Präklinische Versuche zeigten, dass in HNSCC Zelllinien STAT3 unabhängig von EGFR aktiviert werden kann und folglich eine Rolle bei der Resistenzbildung gegenüber EGFR Inhibitoren spielen

könnte (Sriuranpong V et al. 2003, Song JI et al. 2000, Grandis JR und Tweardy DJ 1993).

Die zielgerichtete Inhibition von EGFR erfolgt mithilfe von 2 Molekülstrukturen: Monoklonale Antikörper, die die Ligandenbindungsstelle erkennen und die Aktivierung verhindern, sowie Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI), die an der zytoplasmatischen Region binden und eine downstream Regulation bewirken. Obwohl beide Klassen sowohl EGFR, als auch Her-2 inhibieren, unterscheiden sie sich in der Wirkungsweise und dem klinischen Profil. Die monoklonalen Antikörper binden an der extrazellulären Bindungsstelle an der Oberfläche von Tumorzellen und verhindern so, dass die Liganden mit dem Rezeptor interagieren können und der Rezeptor aktiviert wird. Im Gegensatz dazu blockieren die Tyrosinkinase- Inhibitoren die Bindung von ATP an der intrazelluläre Tyrosinkinase Domäne und letztlich die Tyrosinkinaseaktivität und den intrazellulären Signalweg.

Cetuximab ist ein chimere (65%human/35%murin) Antikörper des IgG₁ Isotyps. Es sind verschiedene Mechanismen zur Inhibition der Tumoraktivität bekannt. Ein Mechanismus ist die Bindung von endogenen Liganden, wie EGF, durch den Antikörper und Umwandlung des Wachstumsfaktors in den EGF- Rezeptor. Schlussendlich führt dies zur Unterbrechung des EGFR Signalwegs. Cetuximab bindet an EGFR mit einer höheren Affinität als der endogene Ligand. Die Autophosphorylierung von EGFR wird gehemmt, wodurch es zur Internalisierung des Rezeptors kommt. Die Rezeptordichte von EGFR nimmt ab. Ein anderer Mechanismus ist die Entfernung der anzugreifenden Rezeptoren von der Zelloberfläche (Mehra R et al. 2008). Zusätzlich vermag Cetuximab den nuklearen Import von EGFR zu blockieren und verhindert hierbei die Aktivierung des Reparaturmechanismus, der die Zellen vor DNA- Schäden beschützt, welche durch Bestrahlung oder Chemotherapie hervorgerufen wurden (Hoang T et al. 2006, Huang SM et al. 1999, Mendelsohn J et al. 2003).

Cetuximab bewirkt auch eine initiale Aktivierung, Internalisation und schließlich Deregulation von EGFRvIII. Die Behandlung mit Cetuximab führt unter anderem zu einer Tumorzell- Apoptose, zu einer Inhibition der Proliferation sowie zu einem Zellzyklusarrest.

Als häufige Nebenwirkungen (>30%) sind akneähnlicher Hautausschlag, generalisierte Schwäche, Fieber und verminderter Magnesiumspiegel im Blut bekannt.

Da EGF- Rezeptoren in nahezu allen Geweben exprimiert werden, wäre es zum Schutz des gesunden Gewebes wünschenswert tumorspezifische Veränderungen des Rezeptors zu detektieren. Das Vorkommen von Mutationen kann eine Ursache für die limitierte Wirkung von der zielgerichteten EGFR- Inhibition sein. Eine häufig beschriebene Mutation ist die trunkierte Mutation, EGFR Variante III (EGFRvIII). EGFRvIII kommt nicht in gesundem Gewebe vor, bislang konnte die Mutation in Ovarialtumoren, Mammakarzinomen, großzelligen Bronchialkarzinomen und HNSCC nachgewiesen werden (Garcia de Palazzo IE et al. 1993, Moscatello DK et al. 1995, Ge H et al. 2002, Okamoto I et al. 2003). Eine Tumorthherapie, die sich nur gegen die mutierten Rezeptoren richtet, würde das gesunde Gewebe nicht erreichen. Moscatello et al. wiesen die Mutation in 78% der Mammakarzinomen, in 17% der Gehirntumoren und in 20% der Ovarialtumoren Proteinebene nach. Sok et al. konnten durch immunhistochemische Färbungen in 78% der untersuchten HNSCC die EGFRvIII Mutation nachweisen.

EGFRvIII ist aufgrund einer Deletion der Exons 2-7, die für die extrazelluläre Bindungsstelle kodieren, ligandenunabhängig. Es bleibt daher fraglich, ob die Mutation durch Cetuximab gehemmt werden kann, da es an der extrazellulären Ligandenbindungsstelle bindet. Tyrosinkinaseinhibitoren wirken beim Wildtyp und bei der Mutation durch vollständige Aufhebung der Tyrosinkinase- Phosphorylierung. Bei Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten HNSCC konnte eine verlängerte Stabilisierung ihres Zustands durch die Behandlung mit Erlotinib erreicht werden (Soulieres D et al. 2004). Eine andere Studie zeigte, dass die Behandlung mit Erlotinib besser bei mutierten EGF- Rezeptoren als bei dem Wildtyp anspricht, aber keine Verlängerung des Gesamtüberlebens erreicht werden kann (Tsao MS et al. 2005). Das Vorkommen der vIII Mutation wird in unterschiedlicher Häufigkeit dargestellt. Sok et al. gaben die Häufigkeit mit 78% der untersuchten Zelllinien an, andere Gruppen waren der Auffassung, dass das Vorkommen von Mutationen in HNSCC eher selten und abhängig von der ethnischen Abstammung sei (1% der Kaukasier versus 7% der Asiaten, ref. Loeffler-Ragg J et al. 2006; Lee JW et al. 2005). Die vIII Mutation führt zu einem verstärkten Tumorwachstum, Zellproliferation und Metastasierung (Slamon DS et al. 1995, Lui VW et al. 2002).

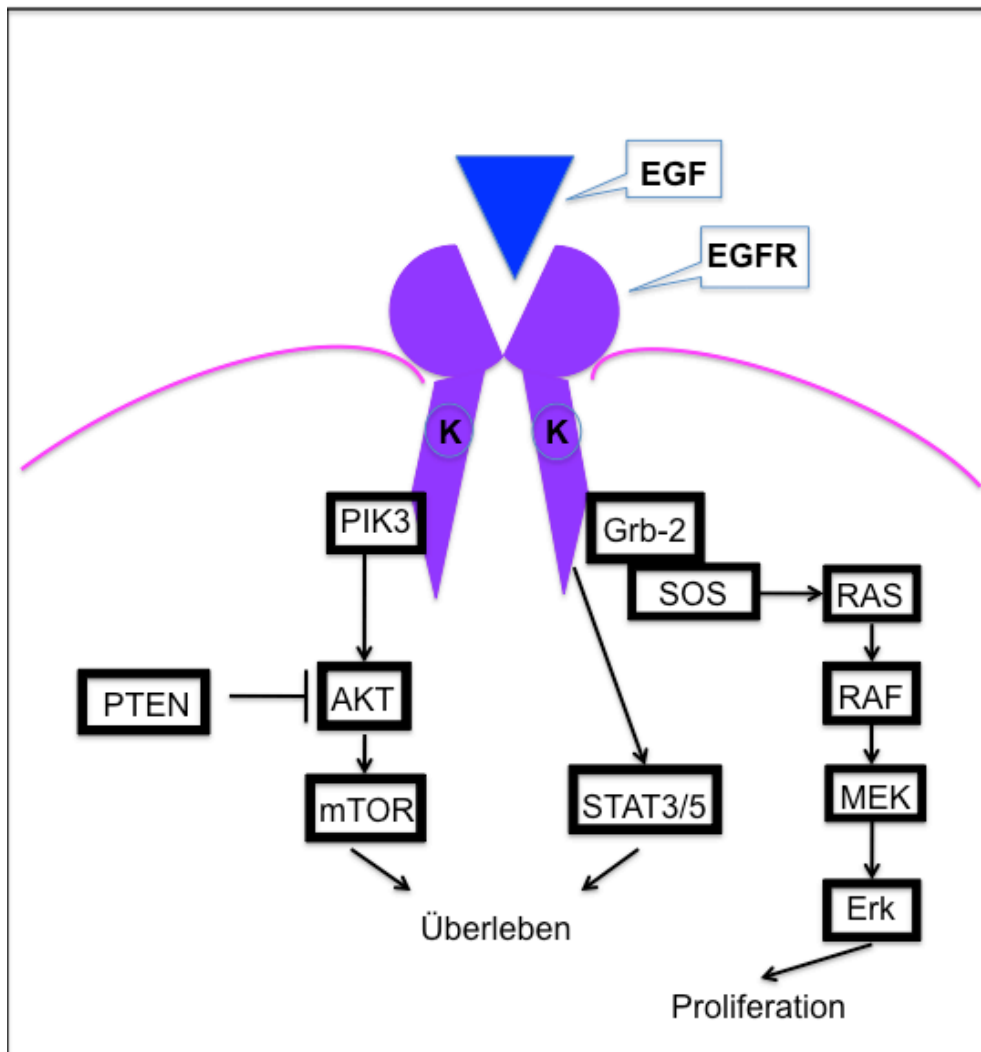


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des EGFR- Signalwegs. Durch Bindung des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den gleichnamigen Rezeptor (EGFR) kommt es entweder zur Phosphorylierung von STAT3 oder PIK3 über jeweils Aktivierung von AKT und danach mTOR zum Überleben. Über Aktivierung von Grb-2 und den RAS Signalweg kommt es zur Proliferation.

3.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist maßgeblich an der Entstehung von Tumoren beteiligt. Er besteht aus einer Reihe von sich wiederholenden Ereignissen, die der Zelle es ermöglichen zu wachsen und sich zu duplizieren. Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedenen Ereignissen unterschieden- zum einen dient der Zellzyklus der Mitose und zum anderen der Meiose.

Zellen wachsen so lange bis sie eine gewisse Größe erreicht haben und teilen sich dann um erneut zu wachsen. Die Periode von einer Zellteilung bis zur nächsten heißt Zellzyklus und wird in einzelne unterschiedlich lange Phasen unterteilt. Das entscheidende Ereignis ist die Mitose. Ihr gegenüber steht der übrige Zellzyklus als Interphase. Das herausragende Ereignis der Interphase ist die Verdoppelung der DNA. Die Replikationsphase der DNA wird als S- Phase (Synthesephase) bezeichnet. Die zwischen Mitose und S- Phase einerseits und zwischen S- Phase und nächster Mitose andererseits verbleibenden Perioden sind die G- Phasen (G=gap) G_1 und G_2 . Die G_1 - Phase kann auch als Wachstumsphase angesehen und die G_2 - Phase als Korrekturphase angesehen werden. Die Mitose läuft in sechs aufeinanderfolgenden Stufen ab. In der Prophase der Mitose wird der Nukleolus aufgelöst und es bildet sich der Spindelapparat. Die Prometaphase wird durch den Zusammenbruch der Kernmembran charakterisiert. In der Metaphase werden die Chromosomen durch die Kinetochore in der Äquatorialebene fixiert. Die Anaphase sorgt für die Trennung der Chromosomen. In der Telophase kommt es zum Abschluss der Kernteilung. Zum Schluss kommt es zur eigentlichen Mitose durch die Teilung des Zytoplasmas. Zur Sicherstellung des korrekten Ablaufs der Zellteilung gibt es Kontrollpunkte. Drei Kontrollpunkte sind bekannt: der G_2 - Kontrollpunkt am Übergang von G_2 zur Mitose, der Metaphase- Kontrollpunkt am Übergang von Mitose zu G_1 und der G_1 - Kontrollpunkt am Übergang von G_1 zur S- Phase. (Hirsch- Kaufmann M, Schweiger M 1996).

3.4 Aurora Kinasen

Aurora Kinasen sind Spindelproteine, die zur Gruppe der Serin/Threonin Proteinkinasen gehören. Sie gelten als die Schlüsselregulatoren des Zellzyklus. Es wird ange-

nommen, dass die Aurora A und B Kinasen in vielen, wenn nicht sogar allen proliferierenden Zellen vorkommen. Die Aurora C Kinase hingegen konnte bislang nur in testikulärem Gewebe nachgewiesen werden und ihre Funktion bleibt weiterhin unklar (Kimura M et al. 1999).

Die ursprünglichen Mitglieder der Aurora Kinase Familie sind Ip11 in *S. cerevisiae* und aurora aus *Drosophila melanogaster*. Wenngleich Ip11 der einzige Repräsentant in Hefen ist, so gibt es noch zwei auroraverwandte Kinasen in *Drosophila* und *C. elegans* und mindestens drei in Säugetieren. Diese drei Aurora Kinasen unterscheiden sich in ihrem Aufbau, ihrer Lokalisation während der Mitose und ihrer Funktion (Nigg EA et al. 2002). Aurora A, B und C Kinasen übernehmen vielfältige Aufgaben im Zellzyklus und sind dementsprechend auch für die Tumorentstehung bei Fehlregulation mitverantwortlich. Die Vervielfältigung der Aurora Gene, erhöhte mRNA- Level und Protein- Überexpression konnten schon in vielen verschiedenen menschlichen Tumorzellen wie Kolon-Rektum-Karzinomen, Brust, Pankreas und Ovar nachgewiesen werden. Darüberhinaus sind ihre Genorte (Aurora-A: 20q13 und Aurora-B: 17q13) häufig verändert in Tumoren (Tao Y et al. 2007). Somit sind sie interessante Angriffspunkte für die moderne, zielgerichtete Tumorthherapie.

1. Isoformen der Aurora Kinasen

Die Aurora A Kinase ist ein nukleäres Protein, das den Eintritt in die Mitose, die Reifung der Zentrosomen und den Spindelaufbau reguliert. Aurora A wird auch als STK15, BTAK, Aurora-2 oder AIKI bezeichnet. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aurora A Kinase verschiedene Zentrosomenproteine phosphoryliert (TPX2, LIM proteine, EgS, TACC und Brca1), wodurch die regelrechte Zellteilung und Zentrosomenreifung gewährleistet wird. Sie geht durch Phosphorylierung in den aktiven Zustand über, sodass ein Aktivitätsmarker für die Aurora A Kinase pAurora A ist (Bischoff JR et al. 1998, Farruggio DC et al. 1999). Die Aurka- Level in Zellen werden reguliert durch Proteasom vermittelnden Abbau. Aurora A wird abgebaut, indem die Zellen die Mitose beenden und werden *in-vitro* von dem anaphase- promoting- complex APC abgebaut (Honda K et al. 2000). Von der Prophase bis zur Telophase befindet sich die Aurka an den Spindelpolen (Andrews PD et al. 2003). Hierbei spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Anordnung der Mitosespindel in Mehrzellern (Anand S et al.

2003). Die humane Aurora A Kinase befindet sich auf Chromosom 20q13.2, das häufig in unterschiedlichen Tumorgeweben amplifiziert wird (Tanaka T et al. 1999, Sakakura C et al. 2001, Bischoff JR et al. 2000). Ihre Struktur und die katalytische Domäne weisen viele Übereinstimmungen mit den SRC Tyrosinkinase und der AGC Familie der Kinasen auf. Jedoch wurden auch viele einzigartige Anteile erkannt, wie zum Beispiel die tiefe Tasche der Aurora A ATP Bindungsstelle proximal der Aminogruppe von Adenosin (Andrews PD et al. 2003). Die Überexpression der Aurora A Kinase ist im Mausmodell onkogen (Zhou H et al. 1998, Andrews PD et al. 2003). Erhöhte Aurora A Kinase mRNA- Level sind assoziiert mit schneller Progression des Tumorwachstums und verkürztem Gesamtüberleben in HNSCC (Reiter R et al. 2006). Zusätzlich führt die Überexpression zu genetischer Instabilität und erhöhter Invasivität in Mammakarzinomen (Tanaka T et al. 1999, Miyoshi Y et al. 2001). Die Inhibition der Aurora A Kinase sorgt für eine Veränderung des Zellphänotyps und Hemmung des Tumorwachstums. Ist die aktive Aurora A Kinase überexprimiert, so werden die Zellen schlussendlich unsterblich. Ist dagegen die inaktive Aurora A Kinase überexprimiert kommt es zum Zelltod. Diese Erkenntnisse suggerieren, dass die Aurora Kinasen mit einem apoptotischen Signalweg und dem mitotischen Kontrollpunkt zusammenhängen (Giet R et al. 1999).

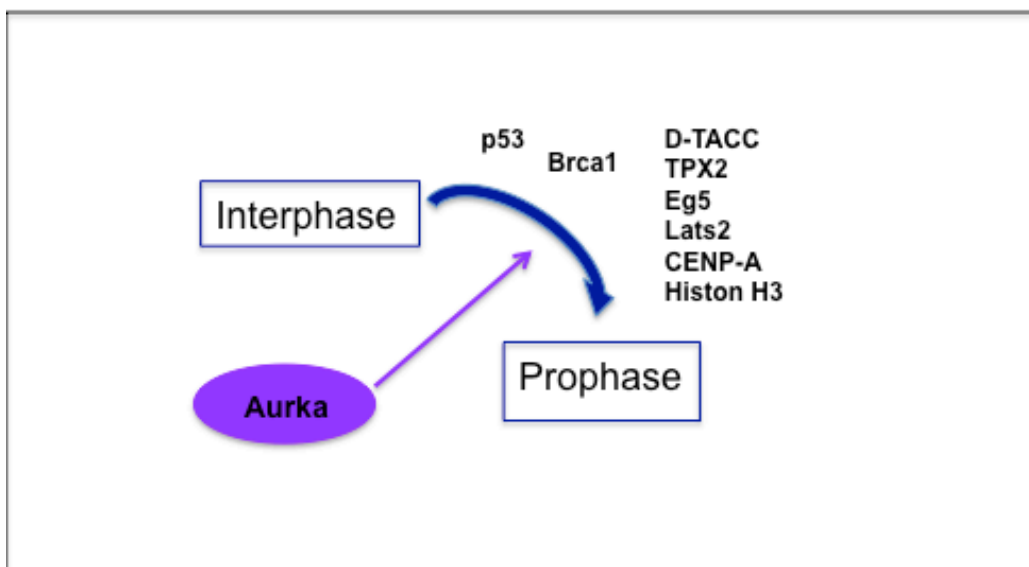


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Substrate von Aurora A Kinase. Aurora A Kinase phosphoryliert überwiegend zahlreiche Proteine während des Übergangs von der Interphase zur Prophase

Die Aurora B Kinase sorgt für die Trennung der Chromatiden in der Mitose, die Histonmodifikation und die regelrechte Zellteilung. Zusammen mit Survivin, Borealin und INCENP bildet die Aurora B Kinase den Chromosomal Passenger Komplex (CPC) und dient hierbei als katalytische Komponente (Mackay AM et al. 1998). Der CPC ähnelt den cyclin/CDK Kinase Komplexen, bei denen die Bindung von nicht enzymatischen Proteinen zu ihren enzymatischen Partnern essentiell für die Funktion der Kinase ist. Anstelle der nicht enzymatischen/regulatorischen Untereinheit des cyclin/CDK- Komplexes enthält CPC drei nicht enzymatische Untereinheiten (Survivin, Borealin und INCENP bei Menschen), die alle für die Aurora B Funktion von entscheidender Bedeutung sind (Vader GV et al. 2006).

Von der Prometaphase bis zur Metaphase befindet sich der Komplex an den Zentromeren (Zeitlin SG et al. 2001). Nach Teilung der Chromatiden verlagert sich der Komplex wieder in den Mittelteil und verbleibt dort bis zum Ende der Zellteilung (Fu J et al. 2007). Die Aurora B Kinase sorgt dafür, dass die Mitose nicht ablaufen kann, bis alle Chromosomen verankert sind (Dewar H et al. 2004). Eine hohe Expression steht im Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität. Abbau von Aurora B führt zu polyploiden Zellen als Konsequenz der nicht mehr intakten Zellteilung (Fu J et al. 2007). Ohne die Aurora B Aktivität besteht die Gefahr, dass die mitotischen Kontrollpunkte nicht mehr regelgerecht funktionieren, wodurch es zu einer erhöhten Anzahl an aneuploiden Zellen, genetischer Instabilität und Tumorentstehung kommt (Weaver BA et al. 2005). Im Gegensatz zur Aurora A Kinase, die nur am Übergang von der Interphase zur Prometaphase Proteine phosphoryliert, aktiviert die Aurora B Kinase zahlreiche Proteine während des gesamten Zellzykluses. Zu den Schlüsselsubstraten der aktivierten Aurora B Kinase gehören das zentromere Protein A, INCENP, Survivin, Borealin das mikrotubuläre destabilisierende Kinesin mitotische Zentromer-assoziierte Kinesin, die mitotischen Kontrollpunkt- Proteine BubR1 und Mad2, die Zytoseklettproteine Myosin II regulierte Leichtkette, Vimentin, Desmin und die gliafibrillären sauren Proteine, sowie Histon H3. Histon H3 ist ein Protein, das bei der Faltung der Chromosomen und deren Eintritt in die Mitose beteiligt ist. Seine Phosphorylierung an Ser10 erfolgt durch Aurora B (Crosio C et al. 2002).

In NSCLC ist Aurkb häufig überexprimiert und weist ebenfalls hohe Genexpressionslevel auf. Die Aurkb Expression korreliert mit verkürztem Gesamtüberleben und ge-

netischer Instabilität in großzelligen Bronchialkarzinomen. Diese Expression scheint jedoch in den meisten Fällen von einem bestimmten chromosomalen Allel auszugehen (Smith SL et al. 2005).

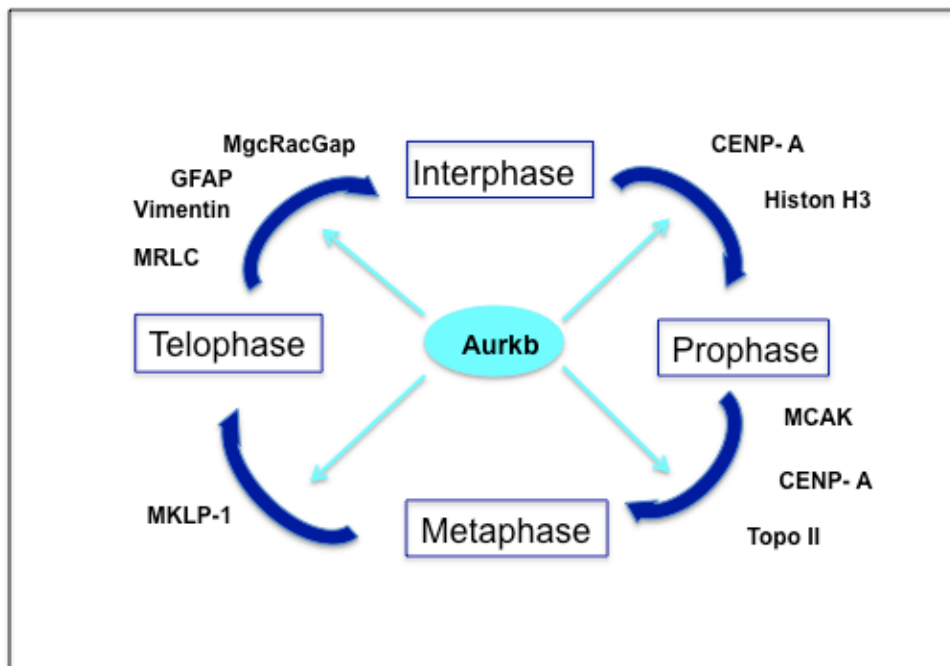


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Substrate der Aurora B Kinase sowie deren Wirkungszeitpunkte. Die Aurora B Kinase wirkt während des gesamten Zellzyklus durch Phosphorylierung verschiedener Substrate.

Die Aurora C Kinase spielt keine Rolle während der Mitose gesunder Zellen. Ihr Vorkommen ist auf testikuläres Gewebe beschränkt. Die genetische Lokalisation befindet sich auf Chromosom 19q13.43, von dem man weiß, dass es in einigen Tumorgeweben deletiert oder transloziert ist. Dies wiederum suggeriert eine Beteiligung an der Tumorentstehung, entweder durch die unkontrollierte Aurora C Kinase an sich, oder einem anderen Gen auf diesem Chromosom.

Man geht davon aus, dass die Aurora C Kinase ebenso wie die Aurora B Kinase ein katalytisches chromosomales Passenger Protein ist, und bei Ausfall dieser deren

Funktion übernehmen kann (Sasai K et al. 2004). Die Aurora C Kinase befindet sich von der Anaphase bis zur Zellteilung an den Zentrosomen. Aufgrund dieser Anordnung und der Form der Expression während des Zellzyklus' wird vermutet, dass Aurora C eine Rolle spielt für die Zentrosomen- oder Spindelfunktion während der M-Phase. Darüber hinaus reguliert sie die Anordnung der Chromosomen in der männlichen Meiose. Die Expression der Aurora C Kinase konnte zwar auch in einigen Tumoren nachgewiesen werden, die Bedeutung dieser Beobachtung ist aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar (Kimura M et al. 1999).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Therapeutika mit einer inhibierenden Funktion der Aurora A Kinase entwickelt. Diese Inhibitoren haben zwei verschiedene Ansatzpunkte, wie die Blockierung der Protein- Protein Interaktion von Aurora A und Kofaktor oder Substrat oder der Blockierung der ATP- Bindungsstelle der Serin-Threonin- Kinase (Agnese V et al. 2007). Die meisten Aurora Kinase Inhibitoren weisen eine höhere Selektivität für die Aurora B Kinase auf. Meistens können sie beide Aurora Kinasen inhibieren.

AS 203569/R763 ist ein potenter Inhibitor aller drei Isoformen der Aurora Kinasen und auch anderer tumorbezogener Kinasen. Folglich stellt AS ein vielversprechendes Therapeutikum besonders für hämatologische Tumorerkrankungen dar. McLaughlin et al. zeigten bereits, dass AS bei 14nM Aurkb und bei 100nM Aurka inhibiert. Es handelt sich um einen oral verfügbaren kompetitiven Inhibitor von ATP. Wiederholte Exposition führt zu Endoreduplikationen mit Zellen, die ihren DNA- Gehalt bis zu 8N erhöhen können. Man kann zumeist vergrößerte, mehrfachgelappte Zellkerne beobachten. Es kommt auch zu einer vermehrten Apoptose der Tumorzellen. Typische chemotherapeutische Nebenwirkungen wie Neuropathien, Diarrhoe oder Alopecie werden nicht beobachtet. Jedoch kann es zu einer ausgeprägten Neutropenie kommen. Es werden ebenfalls Fälle mit Mukositis, Anämie, Thrombozytopenie und gastrointestinalen Störungen beobachtet.

MLN8237 ist ein Aurora Kinase Inhibitor, der eine etwa 200fach höhere Selektivität für Aurora A als für Aurora B aufweist. Die Inhibition von Aurka erfolgt durch kompetitive Inhibition mit ATP- Bindung. Die Wirkung von MLN konnte bislang an einer Reihe von präklinischen Tumormodellen nachgewiesen werden (Maris JM et al. 2010). Eine Konzentration von 16nM kann Spindelpoldefekte, Veränderungen des DNA- Gehalts

und Apoptose verursachen. In- vivo war die Dosierung von 20mg/kg BID über einen Zeitraum von 21 Tagen bei Multiplen Myelomen sehr effektiv im Xenograft Modell. In der klinischen Phase I Studie wurde entdeckt, dass MLN8237 wesentlich potenter ist als MLN8054 und ebenso weniger unerwünschte Nebenwirkungen aufweist, sodass es jetzt in eine klinische Phase II Studien für AML Patienten und Patienten mit myelodysplastischen Syndrom übergeht (Karthigeyan et al. 2010).

3.5 Zielsetzung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die molekularbiologische Untersuchung von sechs Zelllinien, die aus Plattenepithelkarzinomen des Mundbodens, des weichen Gaumens, des Hypopharynx und der Zunge entwickelt wurden. Zuvor sollte allerdings mithilfe von öffentlich zugänglichen Datenbanken (www.oncomine.com) der Einfluss auf das Gesamtüberleben von der Aurora A und EGFR Genexpression überprüft werden. Zusätzlich wurden die Daten von 180 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Halsbereich bezüglich des Gesamtüberlebens ausgewertet und Immunohistochemische Abbildungen erstellt. Hierbei sollte die Expression von der Aurora A und B Kinase, sowie EGFR beurteilt werden. Diese Strukturen konnten bislang in vielen verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden und traten auch zunehmend im Bereich der Kopf- Hals- Tumore in den Vordergrund. Zunächst sollten die einzelnen Zelllinien auf das Vorhandensein der Strukturen auf Protein- und Transkriptionsebene untersucht werden. Bei Vorhandensein der Strukturen sollte eine Quantifizierung von Aurora A Kinase, Aurora B Kinase und EGFR erfolgen. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden inwieweit sich die Strukturen durch zielgerichtete Tumorthherapie inhibieren lassen und welche Dosis gewählt werden müsste. Je nach Expression von Aurora A, Aurora B und EGFR und Teilungsrate der Zelllinie könnte sich ein unterschiedlicher Effekt zeigen und somit eine unterschiedliche Effektivität der Behandlung vorliegen. Es sollte zum einen die kleinstmögliche Wirkungs-dosis und zum anderen der passende Zeitraum der Exposition ermittelt werden. In der Zellzyklusanalyse sollte der Effekt zunächst von der panAurora Kinase Inhibition überprüft werden, und gegebenenfalls später in der Kombinationstherapie. Falls sowohl ein Vorkommen von Aurora Kinasen, als auch EGFR nachgewiesen werden könnte lag der Versuch einer Kombinationstherapie mit dem Aurora Kinase Inhibitor

AS703569 und Cetuximab nahe. Dieser Therapieansatz sollte in allen Zelllinien die größte Effektivität, betreffend Inhibition des Tumorwachstums zeigen, und greift auch den Grundgedanken der modernen Tumorthherapie auf, möglichst die zumeist toxischen Medikamente zu kombinieren, um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren und die Einzeldosen zu vermindern. Anschließend sollte überprüft werden, ob die panAurora Inhibition effektiver ist als die selektive Inhibition von Aurka oder ob überhaupt ein Unterschied vorlag.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden von ATCC-LGC (Wechsel, D) oder DMSZ (Braunschweig, D) bezogen. Die Zelllinien wurden in T2 Flaschen mit DMEM (Invitrogen, Darmstadt) mit 10% hitzeinaktiviertem bovines Serum, 1% Glutamin, 1% Penicillin- Streptomycin und 1% nicht- essentiellen Aminosäuren kultiviert. Je nach Dichte wurden sie alle zwei bis vier Tage gesplittet.

Zum Einfrieren wurden 2×10^6 bis 5×10^6 Zellen in 700 μ l frischem Medium unter Zusatz von 200 μ l FCS und 100 μ l DMSO als Schutz vor Kristallbildung in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde in einer vorgekühlten Einfrierbox bei -80°C gelagert und später in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen rasch in Medium aufgenommen durch Pipetieren, um das toxische DMSO schnell durch Zentrifugierung zu entfernen. Anschließend konnten die Zellen unter den oben genannten Bedingungen inkubiert werden.

4.2 Extinktionsmessungen (MTT Assays)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Nachweis von Vitalität/Apoptose durch Farbänderung. Den Zellen wird ein Farbstoff (MTT=[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) beigelegt, der von vitalen Zellen umgesetzt werden kann, wodurch es zu einer Farbänderung kommt. Bei Vitalität kommt es zu einer Reduktion des gelben Farbstoffs in ein blau- violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese Farbänderung wird spektrometrisch detektiert. Bei bereits apoptotischen Zellen kommt es zu keinem Umsatz des Farbstoffs.

Als erstes wurden MTT Assays für alle sechs Zelllinien durchgeführt. Es wurden 50.000 adherente Zellen pro Well in 50 μ l ausplattiert auf 96 Well Platten ausplattiert und über Nacht anwachsen lassen. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit dem panAurora Kinase Inhibitor AS hergestellt. Das ursprüngliche Medium wurde abgenommen und durch 100 μ l der Verdünnungsreihe ersetzt.

Acht verschiedene Konzentrationen wurden dabei verwendet (0nM, 3.125nM, 6.25nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM und 200nM) und jeweils Messungen nach 24, 48 und 72h durchgeführt. Für die Messung wurden die Zellen kurz vorher mit MTT versetzt. Die Messwerte der Extinktion sollten zwischen 0,1 und 0,8 liegen.

4.3 Western Blot

4.3.1 Inkubation der Zellen

Bevor Versuche mit den Plattenepithelkarzinom Zelllinien begonnen werden konnten, mussten die adherenten Zellen eine bestimmte Anzahl erreicht haben. Sie sollten auch nicht kontaktinhibiert sein. Die Zellen wurden pro T75 Zellkulturflasche zu 1,5 Millionen ausplattiert. Je nach Zelllinie wuchsen die Zellen zwei bis vier Tage, nachdem sie ausplattiert waren. Hatten die Zellen die gewünschte Dichte erreicht, so wurden sie mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit 9ml Medium verdünnt und abzentrifugiert. Alle diese Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das gewonnene Pellet wurde von einem 10ml Falcon auf ein 1,5ml Reaktionsgefäß umgefüllt und erneut bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zunächst mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80° C weggefroren.

4.3.2 Proteinlyse

4° C kalter Lysis Puffer wurde auf das gefrorene Pellet gegeben und durch langsames Pipettieren auf Eis gelöst und aufgetaut. Je nach Zellmenge wurden 50- 200µl pro Pellet verwendet. Danach erfolgte eine Inkubation von 15min auf Eis. Das Lysat wurde sieben bis acht Sekunden mit Cycle 4 und 30% Power auf Eis sonifiziert und anschließend kurz auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat zwei Minuten auf höchster Geschwindigkeit und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß umgefüllt.

4.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford und Biorad

Das Farbstoffkonzentrat Bio- Rad Protein Assay wurde im Verhältnis 1:5 mit sterilem Wasser verdünnt. Danach wurde es gut vermischt und anschließend eine Probe von jeweils 1ml entnommen. Je nach Anzahl der Lysate wurden UV-undurchlässige Küvetten mit 1ml befüllt. Anschließend wurde 1µl Lysat hinzu pipettiert und die Küvette über Kopf geschwenkt. Abhängig von der Proteinmenge färbte sich die Mischung blau. Je mehr blau, desto mehr Protein. Am Photometer wurde dann die Konzentration bestimmt. Die Konzentration sollte bei 2 und 20mg/dl liegen.

4.3.4 Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden in 7,5%, 10% und 12%igen Trenngelen und Sammelgel aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteinproben in Aurora A und B Kinase erfolgte mithilfe von 10%igen Trenngelen. EGFR wurde mit 7,5%igen Trenngelen dargestellt. Phospho Histon H3 konnte mit 12%igen Trenngelen dargestellt werden.

Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngelen

	Trenngel			Sammelgel
%	7.5	10	12	
Acryl/BIS	2,8ml	3,75ml	4,5ml	0,9ml
4×Tris/H Cl pH 8,8	2,8ml	3,75ml	4,5ml	
4×Tris/H Cl pH6,8				1,75ml
H ₂ O	5,63ml	4,69ml	3,94ml	4,3ml
10% APS	37,5µl	37,5µl	37,5µl	50µl
TEMED	7,5µl	7,5µl	7,5µl	10µl

Die Polymerisation der Gele erfolgte in einem Gießsystem. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Methanol beschichtet. Dazu wurden ca. 10,5ml des Trenngels zwischen die Gelplatten gefüllt. Nach ca. 30 Minuten wurde das Trenngel fest und das Methanol konnte abgegossen werden. Die Reste konnten mit Whatman Paper aufgenommen werden. Zum Schluss füllte man das Sammelgel auf das Trenngel bis zum Rand der Gelplatten und setzte den Kamm ein. Nach weiteren 30 Minuten war auch das Sammelgel fest. Die Gele wurden in die zum System gehörige Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit ca. 500ml einfach konzentriertem Laufpuffer gefüllt. Die Gel-taschen wurden von links nach rechts mit 10µl Proteinstandard und 30µl Proteinproben, die 40µg Protein entsprachen, gefüllt.

Die Gelelektrophoresekammer wurde an das Power- Pac angeschlossen. Zunächst ließ man die Proben ca. 30 Minuten bei 100 Volt aus den Taschen in das Sammelgel laufen. Danach konnte die Voltzahl auf 120 Volt erhöht werden. Nach ca. 3 Stunden hatte sich die Probe komplett aufgetrennt.

4.3.5 Semi- Dry und Nass- Transfer

4.3.5.1 Semi- Dry- Transfer

Der Semi- Dry Transfer wurde für alle Proteine <50kDa durchgeführt, d.h. Aurora A Kinase, Aurora B Kinase, β Actin, Histon H3 und pAurora A.

Für den Transfer verwendet man pro Gel zwei dicke Whatman Paper und eine Nitorzellulose Membran in der Größe des Gels. Die Whatman Paper wurden in Transferpuffer eingeweicht bis sie komplett befeuchtet waren. Die Nitrozellulosemembran wurde kurz im Transferpuffer angefeuchtet. Eines der nassen Paper wurde dann auf die platinbeschichtete Bodenplatte des Transfergeräts gelegt. Die Membran wurde dann über das Paper gelegt und die Luftblasen zwischen Membran und Paper mit einer Pipette ausgerollt. Das Gel wurde dann auf die Membran gelegt und das zweite Paper auf die Membran gelegt.

Nun wurden die Luftblasen erneut ausgerollt und anschließend die beiden Deckel der Semi- Dry Kammer geschlossen. Der Transfer wurde bei 20 Volt ca. 60 Minuten durchgeführt. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers konnte die Membran mit Panceaurot angefärbt werden bis die Banden sich darstellten. Danach wurde die Membran kurz mit PBS gewaschen.

4.3.5.2 Nass- Transfer

Der Nass Transfer wurde für alle Proteine >50kDa durchgeführt, d.h. EGFR. Für den Transfer benötigte man je Gel zwei dicke Whatman Paper und eine PVDF 45µM Membran. Die Transferkammer wurde bis zum oberen Drittel mit Transferpuffer gefüllt. Die Membran wurde gut in Methanol angefeuchtet und schließlich zwischen die beiden Paper in die Kassette platziert. Die Kassette konnte dann in die Transferkammer gesteckt und die Deckel aufgesetzt werden. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 800mA über drei Stunden durchgeführt.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers konnte die Membran mit Amido-Black angefärbt werden bis die Banden sichtbar wurden. Danach wurde die Membran kurz mit PBS gewaschen.

4.3.6 Blockierung unspezifischer Reaktionen

Nach dem Transfer wurde die Membran, zum Blocken unspezifischer Reaktionen, für eine Stunde bei Raumtemperatur, über Nacht bei 4°C oder eine halbe Stunde bei 37°C in 20ml 10%iger Milch in PBST auf den Schüttler gestellt. Anschließend konnte das Blockmedium abgeschüttet werden.

4.3.7 Primärantikörper Inkubation

Der Antikörper wurde in 5ml 5%iger Milch gelöst und in einem Tube über Nacht im Kühlschrank bei 4°C rotieren lassen.

4.3.8 Sekundärantikörper Inkubation

Am nächsten Morgen konnte der Primärantikörper abgeschüttet und die Membran zweimal mit PBS Tween für zehn Minuten gewaschen werden. Der

Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:10000 in 20ml 5%iger Milch verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nochmals wurde die Membran zweimal mit PBS Tween und zum Schluss noch einmal für mindestens 20 Minuten mit PBS gewaschen.

4.3.9 Entwickeln

Anschließend wurde die Membran mit der Entwicklungslösung von Pierce entwickelt. 0,5ml Super Signal Luminol und 0,5ml Super Signal Stable Peroxide Solution wurden gemischt und mehrfach auf die Membran pipettiert bis sie komplett bedeckt war. Es kamen drei unterschiedliche Entwicklerlösungen zum Einsatz. Je nach Bedarf wurde Pico, Dura oder Femto verwendet. Eine glatte Plastikfolie wurde nun aufgeschnitten und in die Mitte der Entwicklerkassette fixiert. Die Membran wurde in die Mitte gelegt und die Luftblasen herausgestrichen. In der Dunkelkammer konnte schließlich der Film auf die Membran gelegt und für bestimmte Zeit mit Chemilumneszenz beleuchtet werden. Der beleuchtete Film konnte anschließend in das Entwicklungsgerät eingelegt werden.

4.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Zunächst wurden pro Zelllinie 10.000 Zellen ausplattiert und drei Tage anwachsen lassen. Am dritten Tag wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, abzentrifugiert und in FACS Röhren umgefüllt.

Zur Zellzyklusanalyse wurde die Durchflusszytometrie (Facs=fluorescence activated cell sorting) angewendet. Da Aurora Kinasen maßgeblich am Zellzyklus beteiligt sind und Versuche mit einem Aurora Kinase Inhibitor durchgeführt wurden, lag es nahe, auch den Zellzyklus der Tumorzellen zu betrachten. Die Zellen mit 70% Ethanol fixiert und nach einer Inkubation von mindestens 4 Stunden bei 4°C abzentrifugiert und resuspendiert in PI Staining Solution. Nach einer weiteren Inkubation von etwa 15 Minuten konnten die Zellen mithilfe von Flusszytometrie analysiert werden.

Um die Apoptose messen zu können wurden 5×10^5 Zellen mit FITC markiertem Annexin V gefärbt und mit Propidium Jodid gegengefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und in PBS resuspendiert und schließlich mit der Durchfluss-

zytometrie analysiert. Die Fraktion der Annexin V-positiven (FL2 Kanal) und PI-negativen Zellen wurden als apoptotisch angesehen.

Die Durchflusszytometrie Analyse des DNA- Gehalts wurde mit PI im FL2 Kanal linearen Modus durchgeführt. Zellen mit weniger als diploiden DNA- Gehalt wurden als tot eingeordnet (sub-G1). Zellen mit mehr als 2N DNA- Gehalt wurden als polyploid eingeordnet.

4.5 PCR

RNA Isolation

Die RNA Gewinnung erfolgte unter der Einhaltung der Syntheseschritte des RNeasy Mini Kit (Qiagen). Pro Isolation wurden jeweils 3×10^6 Zellen eingesetzt. Die Isolation erfolgte 15 Minuten bei 37°C inklusive DNase Verdau. Dabei wurden die Zellen zunächst mit Lysepuffer homogenisiert und in einer Säule flitriert. Die Isolation von RNA erfolgte durch Bindung an spezielle Membranen. Die RNA wurde in mehrfachen Waschschritten von den Membranen mittels 30-60 μl Elutionspuffer gelöst und in einem 1,5ml Gefäß aufgefangen. Pro Ansatz ergaben sich Schwankungen zwischen 3×10^6 bis zu 1×10^7 Zellen. Die gewonnene RNA wurde am Fotometer quantifiziert und auf die Reinheit untersucht. Bis zur cDNA- Synthese wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das Qiagen Omniscript RT Kit und oligo-dT-Primer (Invitrogen) verwendet. 2 μg der RNA wurden mit RNase-freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 24 μl aufgefüllt. Danach wurde 4 μl des 10 \times Puffer RT, 4 μl dNTP, 4 μl oligo-dT, 2 μl RNase out und 2 μl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Probe wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann auf 93°C für fünf Minuten zur Inaktivierung der Enzyme erhitzt.

4.5.1 RT-PCR

Die Amerikanerin Kary Mullis veröffentlichte 1984 eine Methode zur in- vitro- Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten- die Polymerase- Kettenreaktion. Ausgehend

von ganz wenigen Einzelmolekülen lässt sich die DNA im Reagenzglas in einen Größenordnungsbereich vervielfältigen, der ausreicht, um die DNA nachzuweisen, zu charakterisieren oder zu klonieren. Die Basis der DNA- Amplifizierung durch die PCR ist die DNA- Synthese.

Die verwendete Primersequenz entstammt der Publikation von Sok et al. 2006: ATGCGACCCTCCGGGACG. Diese sollte sowohl den EGFR Wildtyp bei 1037bp, als auch die Mutation EGFRvIII bei 236bp detektieren.

PCR- Ansatz	Volumen/Reaktion
RNAse freies Wasser	14,2µl
10× PCR Puffer	2,5µl
dNTP Mix	1µl
Q- Solution	5µl
cDNA	1µl
Primer reverse	0,4µl
Primer forward	0,4µl
Taq- Polymerase	0,5µl
Endvolumen	25µl

Um eine höhere Genauigkeit zu erreichen wurden alle Zusätze außer die cDNA und die Taq- Polymerase als Master Mix pipettiert. In jedes Reaktionsgefäß wurden 23,5µl pipettiert. Anschließend wurde jeweils 1µl der entsprechenden cDNA in das zugehörige Reaktionsgefäß pipettiert und ganz zum Schluss die Taq- Polymerase.

PCR Profil

1. Initiale Aktivierung	95°C	15 Minuten
2. Zyklus (35 Wiederholungen)		
Denaturierung	94°C	60 Sekunden
Anlagerung	55°C	60 Sekunden
Extension	72°C	60 Sekunden
3. Finale Extension	72°C	10 Minuten
4. Ende	4°C	

4.5.1.2 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PT-PCR wurden 1,2%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1,2g Agarose abgewogen und mit TAE Puffer (2M Tris, 1M Essigsäure und 0,05M EDTA) auf 100ml aufgefüllt, in der Mikrowelle erhitzt und zu einem Gel gegossen. 20µl PCR Produkt und 4µl sechsfach Ladepuffer wurden vermischt und 10µl davon aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem BioRad Geldoc System zur Fotografie der Gele und zur Videodensitometrie.

4.5.2 quantitative RT-PCR

Die Real- Time PCR ist eine etablierte Methode zur Quantifizierung von spezifischen DNA oder RNA Sequenzen. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerase- Kettenreaktion (PCR). In dieser Arbeit wurde sie zur für den quantitativen Vergleich von Aurora A und B Kinasen herangezogen.

Hierfür wurde die mRNA zu cDNA umgeschrieben und die cDNA wurde für die Real- Time PCR Reaktion genutzt. Um die Ergebnisse in Verhältnis zu setzen wurde ebenfalls mit Ubiquitin, dem Housekeeping Gen, das gleichermaßen in allen Zellen exprimiert wird, eine real time PCR durchgeführt.

Folgende Bestandteile wurden für die Reaktion in 60 well Platten pipettiert:

SYBR Green	15,6µl
Rox	0,5µl
Primer A	0,05µl
Primer B	0,05µl
H ₂ O	8µl
cDNA	0,8µl

Die Platte wurde mit Plastikfolie abgedeckt und im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die realtime PCR mithilfe des Taqmen durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm benutzt:

1.	50°C	2min
2.	95°C	10min
3. 40 Wiederholungen	95°C	15sec
	60°C	1min

4.6 Proliferationsmessung

4.6.1 Proliferation unter 0nM, 200nM und 400nM Cetuximab

4.6.1.1 Ausplattieren

Es wurden jeweils 500000 Zellen in T25 Flaschen ausplattiert und mit 5ml Medium ohne Cetuximab, 5ml 200nM Cetuximab oder 5ml 400nM Cetuximab versetzt.

4.6.1.2 Zellzahlbestimmung

Nach drei, sieben, zehn und 14 Tagen wurden die Zellen mit 0,5ml Trypsin gelöst und 4,5ml Medium in einen Falcon zum Zählen gefüllt. Die Zählung erfolgte mit einer Zellkammer. 20µl wurden abgenommen und mit 20µl Methylenblau gemischt. 20µl wurden dann in der Zellkammer gezählt. Die gezählte Zellzahl wurde mit 10^4 multipliziert, um einen Näherungswert zu erhalten. Danach wurden die Zellen wieder zu 500000 ausplattiert und mit 5ml Medium, 200nM Cetuximab oder 400nM Cetuximab versetzt. Dieser Prozess wurde mindestens bis zum 14. Tag wiederholt.

4.6.2 Proliferation unter 0nM, 200nM Cetuximab, 5nM AS und 200nM Cetuximab&5nM AS

4.6.2.1 Ausplattieren

Es wurden ebenfalls jeweils 500000 Zellen in T25 Flaschen ausplattiert und mit 5ml Medium ohne Cetuximab, 5ml 200nM Cetuximab, 5ml 5nM AS oder 5ml 200nM Cetuximab&5nM AS versetzt.

4.6.2.2 Zellzahlbestimmung

Nach drei, sieben, zehn und 14 Tagen wurden die Zellen mit 0,5ml Trypsin gelöst und 4,5ml Medium in einen Falcon zum Zählen gefüllt. Die Zählung erfolgte mit einer Zellkammer. 20µl wurden abgenommen und mit 20µl Methylenblau gemischt. 20µl wurden dann in der Zellkammer gezählt. Die gezählte Zellzahl wurde mit 10^4 multipliziert. Danach wurden wieder die Zellen zu 500000 ausplattiert und mit 5ml Medium, 200nM Cetuximab, 5nM AS oder 5ml 200nM Cetuximab&5nM AS versetzt. Dieser Prozess wurde bis zum 14. Tag wiederholt. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung.

4.7 Immunohistochemie

Die Immunohistochemie ist eine Darstellungsform zum Nachweis von bestimmten Proteinen. Sinn und Zweck in dieser Arbeit war es hohe oder niedrigere Proteinlevel

durch unterschiedlich stark ausgeprägte Farbreaktionen in verschiedene Gruppen zu unterteilen.

Zunächst wurde von jedem der 180 Patienten ein Paraffin Block ausgewählt und der repräsentative Anteil markiert. Durch Feinnadelbiopsie mittels Arrayer konnten Proben des Tumors entnommen werden und in einen anderen Paraffin Block positioniert werden. Es wurden mindestens 3 Gewebszylinder pro Tumor mit einem Durchmesser von 0,6mm von jeder Probe entnommen.

Folgende Reaktionsschritte mussten nacheinander durchgeführt werden:

1. Entparaffinieren

Xylol	10min
Xylol	10min
Xylol	10min
Isopropanol	5min
Isopropanol	5min
96% Ethanol	5min
70% Ethanol	5min
Aqua dest	5min

Durch das Entparaffinieren wird Wasser in das Gewebe eingeschleust.

2. Vorbehandlung und Antigendemaskierung

- a) zunächst im Kochtopf 7min in Citratpuffer mit pH 6 aufkochen
- b) danach in der Mikrowelle 2mal 10min bei 900W mit Puffer pH6 und pH9, nach den ersten 10min mit Wasser auffüllen
- c) 5min mit Tris- Puffer waschen

3. Peroxidase- Quench

- a) 15min in 3% H₂O₂
- b) 3×5min in Tris- Puffer waschen

Durch diesen Schritt wird die endogene Peroxidase geblockt.

4. Avidin- und Biotin- Block

- a) 15min mit Avidin blocken
- b) 5min mit Tris- Puffer waschen
- c) 15min mit Biotin blocken
- d) Überschüssige Flüssigkeit abschütten

5. Blockierung

- a) 30min in 5% Normal Goat Serum in TBS Puffer für den Sekundärantikörper
- b) ohne Blockierung

6. Antikörperinkubation

Die Immunohistochemie wurde mit Antikörpern gegen die Aurora A Kinase (Novocastra, Leica- Microsystems, Wetzlar) und gegen EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) gefärbt

- a) Verdünnung in Dako Antikörperverdünnungslösung (STK15 für EGFR 1:100)
- b) Inkubation bei 4°C über Nacht
- c) 3×5min mit Tris- Puffer waschen

7. Detektion

Zur Visualisierung wurden Sekundärantikörper von Dako verwendet (LSAB Kit, DAKO, Hamburg, D)

Die Detektion erfolgt mit DakoReal DAB+ Chromogen Kit, Dako

- a) Biotinylated Secondary Antibody 15min bei Raumtemperatur 3×5min mit Tris- Puffer waschen
- b) Streptavidin Peroxidase Antibody 15min bei Raumtemperatur 3×5min mit Tris- Puffer waschen
- c) DAB- Chromogen für 4min inkubieren, danach für 10min mit Tris- Puffer waschen

8. Gegenfärben und Eindeckeln

- a) Haemalaun für 5min inkubieren
- b) 10min Differenzierung unter fließendem Wasser
- c) danach aufsteigende Alkoholreihe zur Entfernung des Wassers aus dem Gewebe:

aqua dest	2min
70% Ethanol	2min
96% Ethanol	2min
Isopropanol	2min
Isopropanol	2min
Xylol	2min
Xylol	2min
Xylol	2min

d) Eindeckeln und 10min im Trockenschrank bei 56°C inkubieren

Die Immunoreaktivität wurde in sieben Gruppen unterteilt. Die Einteilung war abhängig von der Prozentzahl und der Intensität der zytoplasmatischen, nuklearen und membranösen Färbung. Proben mit mehr als 60% angefärbten Zellen wurden als stark positiv klassifiziert (4+). Waren 30-60% der Zellen angefärbt so wurden sie als moderat positiv klassifiziert (3+). Bei 10-20% angefärbten Zellen lag eine schwach positive Farbreaktion (2+), bei nur weniger als 10% angefärbten Zellen eine sehr schwache Farbreaktion (1+) vor. Proben ohne angefärbte Zellen wurden als negativ klassifiziert. Die Intensität der Farbreaktion wurde in starke (4+), moderate (3+), schwache (2+) und sehr schwache (1+) Farbreaktion unterteilt. Intensität und Prozentzahl der angefärbten Zellen wurden zur Unterteilung in die sieben Gruppen verwendet. Alle Einteilungen wurden von zwei unabhängigen Personen durchgeführt. Um hohe mit geringen Expressionsleveln zu vergleichen wurde eine Median- Split- Analyse durchgeführt. Ein Expressionslevel von ≥ 5 für EGFR und ≥ 5 für Aurora A Kinase wurde als hohe Expression klassifiziert.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar. Verwendet wurden Funktionen wie T-Test (wenn nicht anders beschrieben) von GraphPad Prism (GraphPad Software, LaJolla, CA). Für quantitative Variablen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben, für kategoriale Daten sind absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Die Baren zeigen Mittelwert und Standardabweichung oder den Standardfehler des Mittelwerts. Der Zusammenhang zwischen Aurora A Expression und EGFR Expression wurde mit dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizient durchgeführt. Überlebenskurven wurden mit dem Log- Rang- Test verglichen. Nur zweiseitig ermittelte p- Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Alle Western- Blots wurden mindestens drei Mal wiederholt. Die in den Abbildungen dargestellten Western- Blots sind repräsentative Abbildungen.

4.9 Material

4.9.1 Laborgeräte

<u>Art des Geräts</u>	<u>Gerätebezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank	HERA cell240	Heraeus (Hanau, D)
Entwicklerkassette	Hyperkassette	Amersham Life Scientific
Eismaschine		Ziegra (Hannover, D)
Gefrierschrank -80°C	Ultra low	Sanyo (München, D)
Gefrierschrank -20°C	Premium	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Gelelektrophoresekammer	Multigel- Long	Biometra (Göttingen, D)
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	Megafuge 3. ORS	Heraeus (Hanau, D)
Heizschüttler	Thermomix comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Isoliergummis		Biometra (Göttingen, D)
Kämme	Whatman Biometra Comb Horizon, 20 well 1mm und 2mm	Whatman® GmbH (Dassel, D)
Klammern		Laurel (Aichwald, D)
Kühlschrank	Liebherr premium	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Kühlzentrifuge	BIOFUGE fresco	Heraeus (Hanau, D)
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen, D)
Mikrowelle	MWS 2820	Bauknecht (Schorndorf, D)
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf (Hamburg, D)
PCR- Cyclor	PTC- 100 Peltier Thermal Cyclor	MJ Research
PCR- Maschine, realtime	Taqman	Applied Biosystems
Photometer	Smart Spec™ Plus	Bio- Rad (München, D)
Pipetten, verstellbare	1-10µl 10-100µl	Eppendorf (Hamburg, D)

	200-1000µl	
Schüttler		Biometra (Göttingen, D)
Sonifizierungsgerät(Homogenisator)	SONOPLUS	Bandelin Electronic (Berlin, D)
Stromgeber	Power Pack P25T	Kern (Ballingen- Frommern, D)
Sterile Werkbank	Bio Hit	Steril- Antares
Transfergerät	Trans- Blot SD Semi- Dry transfer cell	Bio- Rad (München, D)
Tischzentrifuge		Roth (Karlsruhe, D)
Videodensitometer	Geldoc	Bio-Rad (München, D)
Vortexer	MS1 Minishaker	Ika (Staufen, D)
Waage	PLJ 2100-2M	Kern (Ballingen- Frommern, D)
Wasserbad	SUB	Grant Instruments (Cambridge, UK)
Zählkammer		Neubaucher (Marienfeld, D)

4.9.2 Chemikalien

Acrylamid- Lösung	Roth (Karlsruhe, D)
Annexin- FITC	Caltag Laboratories/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Annexin-V-Puffer	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)
APS	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
AS 203569	EMD- Serono (Rockland, USA)
Bradford- Reagenz	Bio-Rad (München, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Kölbe, Deutschland
Brdu	BD Pharminogen™ (Franklin Lakes, USA)

Cetuximab	Apotheke Klinikum rechts der Isar (München, D)
EDTA	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Entwicklerlösung	Pierce Biotechnology (Bonn, D)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)
FACS	EPICS®XL (Rochester, USA)
Isopropanol	Apotheke Klinikum rechts der Isar (München, D)
Milchpulver	Fluka, Chemie GmbH (Buchs, CH)
MLN 8237	Selleck (Houston, USA)
Methanol	JT Baker (Deventer, NL)
NAF 0,5M 10×	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
dNTP's	Quiagen (Hilden, D)
10×Puffer	Stratagene (Zürich, CH)
PBS Dulbecco	Life Technologies (Carlsbad, USA)
PCR- Standard	BioLabs (New England
PMSF 1mM 100×	Roche (Mannheim, D)
Precision Plus Protein Standard	Bio- Rad Laboratories (München, D)
Propodium- Jodid 25mg	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
Protease Inhibitor Tablette	Roche (Mannheim, D)
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Q- Solution	Quiagen (Hilden, D)
SYBR	Quiagen (Hilden, D)
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH)
Taq- Polymerase	Invitrogen (Darmstadt, D)
RNeasy Mini Kit	Quiagen (Hilden, D)
ROX	Invitrogen (Darmstadt, D)
Tris	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin	PAA Laboratories (Pasching, A)

Tween®	Sigma- Aldrich (Steinheim, D)
--------	-------------------------------

4.9.3 Verbrauchsmaterialien

Objekträger	
45µM Nitrocellulose- Transfermembran	Bio- Rad Laboratories (München, D)
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Pipettenspitzen 0,5-10µl 10-100µl 100-1000µl	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Röntgenfilm, Hyperfilm	Thermo Scientific (München, D)
Sterilfilter 45mm	Millipore (Schwalbach, D)
Whatmanpaper	Whatman® GmbH (Dassel, D)

4.9.4 Antikörper

Actin	Sigma (München, D)
Aurora A Kinase	Sigma (München, D)
Aurora B Kinase	Sigma (München, D)
EGFR	Santa Cruz (Heidelberg, D)
S10-Histon H3	Millipore (Schwalbach, D)
pAkt	New England Biolabs (Frankfurt, D)
pAurora A	BioLegend (München, D)
pErk	New England Biolabs (Frankfurt, D)
pEGFR	Invitrogen (Darmstadt, D)
Anti- Maus- Antikörper	ECL™ GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)

Anti- Kaninchen- Antikörper	ECL™ GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire)
-----------------------------	---

4.9.5 Zellkultur

4.9.5.1 Zelllinien

Die Zelllinie BHY wurde aus dem hochdifferenzierten Tumor im Zahnfach eines 52jährigen Japaners entwickelt. Der Tumor war bereits sehr invasiv und breitete sich auf den Unterkieferknochen und die Muskelschicht des Mundbodens aus. Es handelt sich um epithelartige, polygonale oder runde, flache Zellen (manchmal spindelförmig und sehr unterschiedliche Morphologie). Die Zellen wachsen mehrschichtig.

CAL- 27 wurde aus einem Resektionsfragment eines 56jährigen Patienten mit schlecht differenziertem Zungenkarzinom entwickelt. Es handelt sich um adherente Epithelzellen, die mehrschichtig wachsen.

Die Zelllinie HN wurde aus einem moderat differenzierten Tumor eines 60jährigen Japaners entwickelt. Es handelte sich um einen Tumor des weichen Gaumens, der sich bereits auf die Muskelschicht ausgebreitet hatte. Die Zellen sind epithelartig polygonal oder rund und flach (manchmal spindelförmig und sehr unterschiedliche Morphologie). Die Zellen wachsen in Gruppen.

FaDu wurde aus einem biopsierten Hypopharynxkarzinom eines 56jährigen Hindu entwickelt wurde. Es handelt sich um adherent wachsende Plattenepithelkarzinomzellen.

Die Zelllinie SAS ist ebenfalls eine humane Zelllinie, die aus einem Zungenkarzinom entwickelt wurde.

Bei XF354 handelt es sich um eine humane Zelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase eines oralen Plattenepithelkarzinoms gewonnen wurde.

4.9.5.2 Plastikmaterialien

Alle Plastikwaren, die in der Zellkultur Verwendung fanden, wurden steril von Greiner (Frickenhausen, D) oder Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

Einweg Pipetten, CELL STAR	2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml
Falcons	10ml, 50ml
Filter	100µm
Gewebekultur Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche(cm/cm ²): 14,5/145, 9,4/58 und 6,0/21
Makroplatten	6-Loch, 12-Loch und 24-Loch
Mikroplatten	96- Loch
Zellkulturflaschen	Kulturfläche/Volumen (cm ² /ml): 75/250 und 25/50

5 Ergebnisse

5.1 Die Koexpression von Aurora A Kinase und EGFR führt zu einem signifikant herabgesetzten Gesamtüberleben

Die grundsätzliche Frage, die sich am Anfang dieser Arbeit stellte war inwieweit Aurora Kinasen und EGFR die Prognose für die Patienten beeinflussen. Dieser Frage wurde zum einen mit öffentlich zugänglichen Datenbanken (www.oncomine.com) und zum anderen über die erhobenen Patientendaten nachgegangen. Von der Abteilung für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar wurden Daten von 180 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich (Tabelle1) sowie die dazu gehörigen Resektate analysiert und uns zu Verfügung gestellt (Abb. 5-3).

Die Analyse der Genexpression für Aurora- A ergab, dass die Transkripte signifikant höher ($p=0,002$) im Tumorgewebe als in normalem Gewebe vorliegen. Bei überlebenden Patienten waren die Transkriptionslevel geringer als bei verstorbenen Patienten. Die Analyse der Genexpression für EGFR zeigte keinen signifikanten Unterschied der Transkripte von gesunden, erkrankten oder verstorbenen Patienten.

Tabelle 1

Merkmal		Anzahl (%)
Geschlecht	Männlich	17 (9)
	Weiblich	163 (91)
Lokalisation	Mundhöhle	33 (18)
	Oropharynx	58 (32)
	Hypopharynx	33 (18)
	Larynx	56 (31)
Primäre Tumorkategorie (pT)	pT1	25 (14)
	pT2	66 (37)
	pT3	48 (27)

Lymphknotenstatus (c/pN)	pT4	41 (23)
	c/pN0	94/52
	pN1	23 (13)
	pN2a	2 (1)
	pN2b	39 (22)
	pN2c	20 (11)
	pN3	2 (1)
Tumorigradung	G1	10 (6)
	G2	110 (61)
	G3	60 (33)

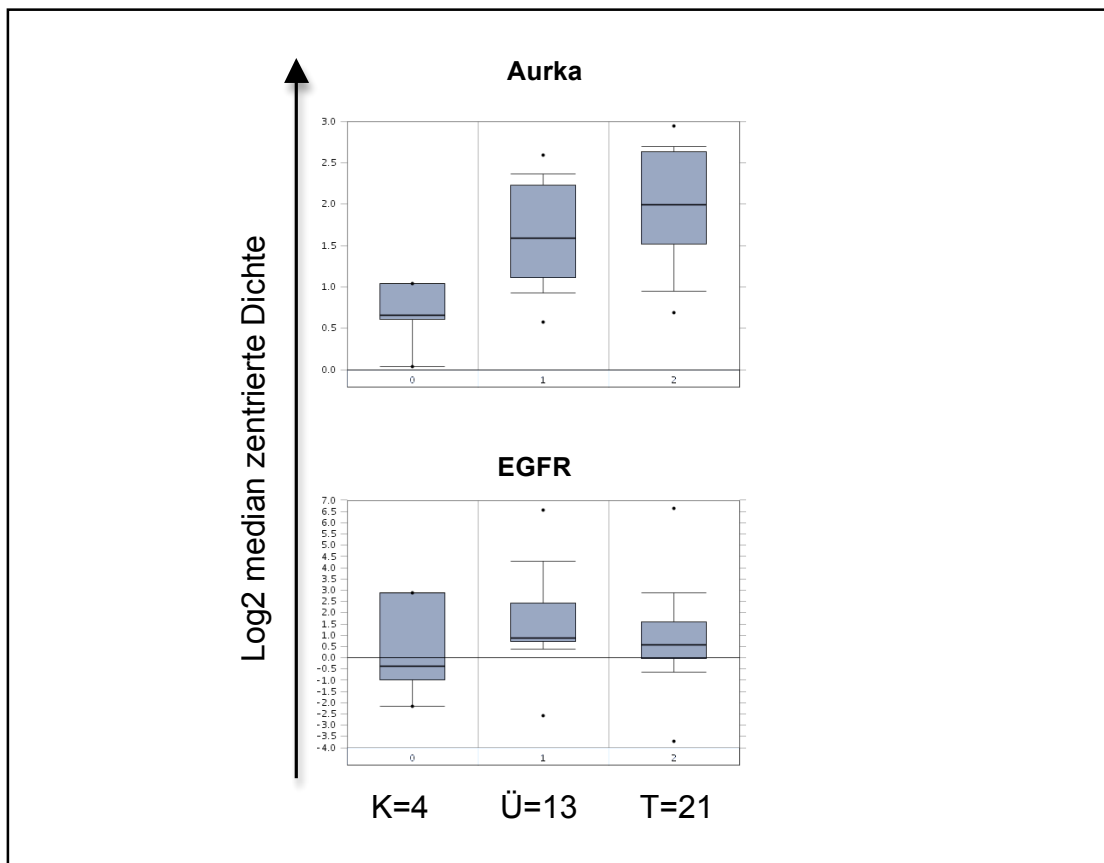


Abbildung 5-1: Vergleich der Genexpressionslevel Aurora-A und EGFR von Kontrollgeweben (K), Tumorgewebe von Überlebenden (Ü) und Tumorgewebe von verstorbenen Patienten (T). Es besteht ein signifikant höheres Genexpressionslevel von Aurka für das Tumorgewebe im Vergleich zu dem normalen Gewebe ($p=0,002$). Die Genexpressionslevel für EGFR wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Zunächst wurden ebenfalls von der Abteilung für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde die Resektate auf das Ausmaß der Expression von Aurora A Kinase und EGFR durch Immunhistochemie untersucht und in verschiedene Gruppen unterteilt. Die Schnitte des Tumorgewebes sowie des angrenzenden gesunden Gewebe wurden angefärbt und mit Hilfe eines Farbindexes unterteilt. Wie in *Abbildung 5-2A* dargestellt, konnten verschiedene Farbreaktionen abgrenzt werden. Es wurde zwischen normaler, geringer oder moderat bis hoher Expression unterschieden. Im Vergleich von normalem Mukosagewebe zu Tumorgewebe fällt ein hoch signifikanter Unterschied der Proteinexpression für Aurora A Kinase ($p < 0,001$) und EGFR ($p < 0,001$) auf. Das Tumorgewebe exprimiert signifikant höhere Proteinlevel von EGFR als auch Aurora A Kinase im Vergleich zum angrenzenden gesunden Gewebe (*Abbildung 5-2B*).

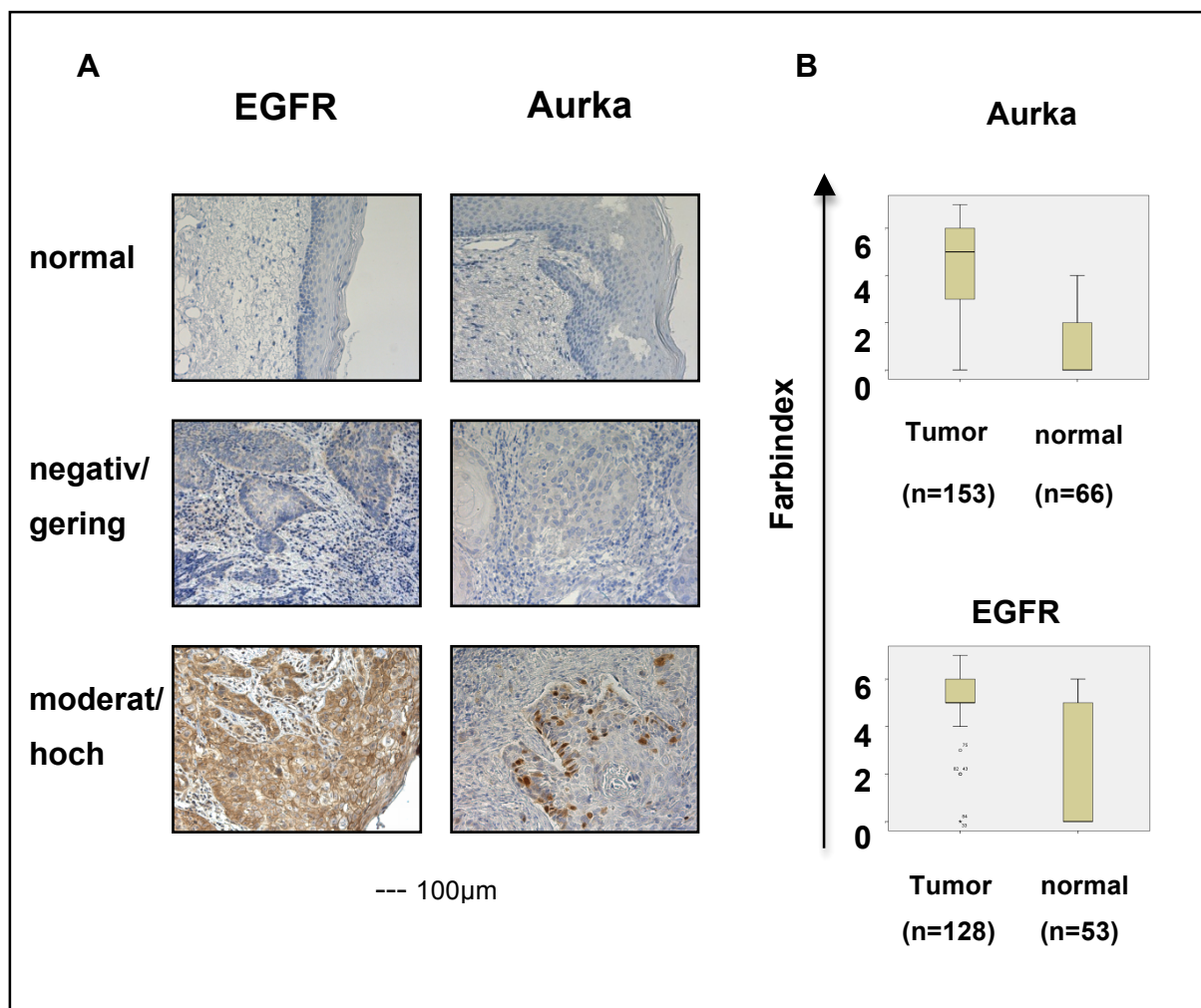


Abbildung 5-2: EGFR und Aurora A Expression in Tumorgewebe und dem angrenzenden Mukosagewebe. (A) Histologische Untersuchung auf EGFR und Aurka Proteinexpression durch Immunhistochemie. Gezeigt werden alle repräsentativen Tumorstadien, die als negativ, normal oder hoch eingestuft wurden. Der in den Abbildungen angegebene Maßstab entspricht 100µm. (B) Für jede Tumorstadium wurde das Expressionslevel von Aurka und EGFR bestimmt und mit normalem Mukosagewebe verglichen. Die Ergebnisse waren hochsignifikant (Aurka: $p < 0,001$, EGFR: $p < 0,001$)

Die Immunohistochemischen Abbildungen wurden nun von der Abteilung für Hals-Nasen- Ohrenheilkunde zur weiteren Auswertung mit den zugehörigen Patientendaten bezüglich des Überlebens korreliert und uns freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Das Proteinlevel des Tumorgewebes wurde mithilfe eines Farbindexes klassifiziert, der in dem Abschnitt Material und Methoden näher erläutert wird. Es sollte in der Kaplan Meier Analyse überprüft werden, inwieweit eine hohe Proteinexpression von Aurora A und EGFR im Zusammenhang mit dem Überleben steht. Hierfür wurden die erhobenen Patientendaten ausgewertet (n=180). Es zeigte sich ein Unterschied zwischen der alleinigen Expression von Aurora A Kinase und EGFR im Vergleich zur erhöhten Expression von sowohl Aurora A Kinase als auch EGFR. In *Abbildung 5-3A* sind die Jahre mit krankheitsfreiem Überleben von Patienten mit erhöhten (grüne Kurve) gegen niedrigen (blaue Kurve) EGFR Proteinleveln aufgetragen. Auffällig ist, dass kein signifikanter Unterschied besteht ($p=0.10$). In *Abbildung 5-3B* sind die Jahre mit krankheitsfreiem Überleben von Patienten mit hohem (grüne Kurve) gegen niedrige (blaue Kurve) Aurora A Kinase Proteinlevel aufgetragen. Hier besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0.10$). In *Abbildung 5-3C* wurde eine Gruppe von Patienten mit EGFR und Aurora A Kinase Überexpression (lila Kurve) gegen eine Gruppe von Patienten mit geringen Proteinleveln (blaue Kurve) und der Expression von Aurora A Kinase (gelbe Kurve) und EGFR (grüne Kurve) aufgetragen. Überraschenderweise zeigt sich zwischen der geringen und der hohen Expression von sowohl Aurora A Kinase als auch EGFR ein signifikanter Unterschied ($p=0.024$). Die Koexpression von erhöhten Aurora A Kinase und EGFR Proteinleveln wirkt sich somit negativ auf das Überleben aus.

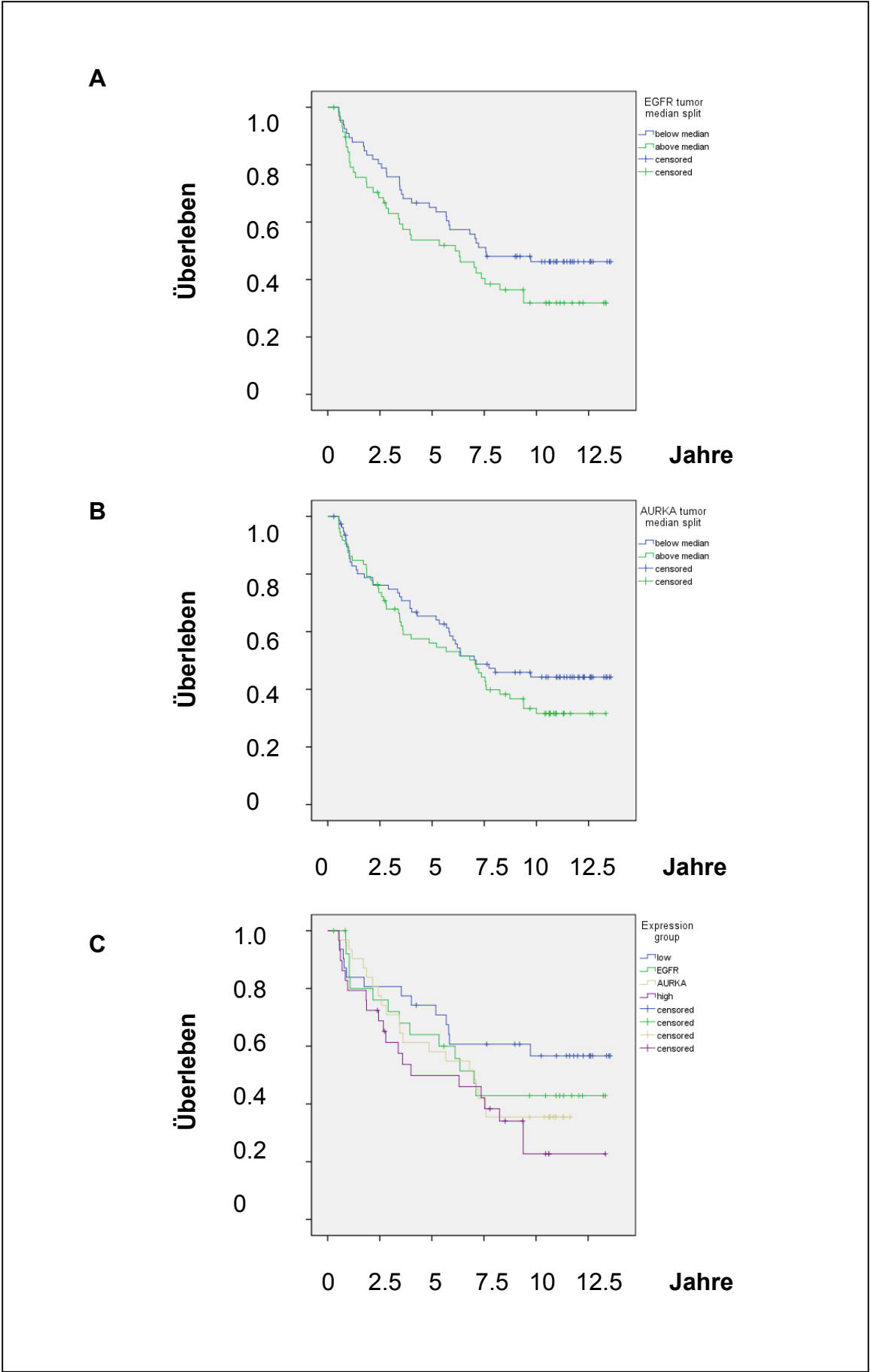


Abbildung 5-3: Koexpression von EGFR und Aurora A Kinase hat eine schlechtere Prognose

als die alleinige Expression jeweils von Aurka oder EGFR. (A) Der Unterschied zwischen dem Überleben von Patienten mit erhöhtem EGFR Level (grüne Kurve) unterscheidet sich statistisch nicht von dem Überleben von Patienten mit geringem Level (blaue Kurve), $p=0.10$. (B) Der Unterschied zwischen dem Überleben von Patienten mit erhöhtem Aurka Level (grüne Kurve) unterscheidet sich statistisch nicht von dem Überleben von Patienten mit geringem Level (blaue Kurve), $p=0.10$. (C) Es besteht ein statistischer Unterschied zwischen dem krankheitsfreien Überleben von Patienten mit hohen EGFR und Aurka Leveln zu den Patienten mit jeweils niedrigen EGFR oder Aurka Leveln, $p=0.024$.

5.2 Nachweis der Expression von Aurora A und B Kinase und EGFR in sechs humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien

Die qualitative Untersuchung der Zelllinien wurde mittels Western Blot für Aurora A Kinase und Aurora B Kinase sowie Western Blot und PCR für EGFR durchgeführt. Abgebildet wurden jeweils representative Ergebnisse. Die quantitative Untersuchung beruhte auf realtime PCR und wurde nur für Aurora A und Aurora B durchgeführt, um diese mengenmäßig vergleichen zu können.

Bei den sechs verwendeten Zelllinien handelte es sich um humane Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf- Hals- Bereich. Es konnte in allen Zelllinien eine Expression auf Proteinebene für Aurora A Kinase und Aurora B Kinase nachgewiesen werden.

Im Western Blot zeigte sich eine unterschiedliche Expression der sechs Zelllinien. Aurora Kinase A wurde am meisten in FaDu, SAS und XF354 exprimiert. CAL und HN wiesen ein unwesentlich geringeres Proteinlevel auf. Die mit Abstand geringste Expression zeigte sich in BHY.

Aurora B Kinase war auf Proteinebene am meisten in XF354 und SAS nachzuweisen. Mittlere Expression war in CAL, HN und FaDu zu beobachten und die geringste Expression, ebenso wie in Aurka, in der Zelllinie BHY. Verglichen mit den Daten aus der realtime PCR kann keine signifikante Übereinstimmung festgestellt werden.

Es ergeben sich unterschiedliche Expressionsmuster für die jeweiligen Zelllinien und es konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von Aurora A und B auf Transkriptionsebene von BHY, CAL, HN und SAS nachgewiesen werden. FaDu zeigte ein höheres mRNA- Level in Aurora A. XF354 besaß ein höheres

mRNA- Level in Aurora B. Auf genetischer Ebene zeigte sich die größte Expression in Aurka bei der Zelllinie HN, ein fast genauso großer Anteil wurde in SAS und etwas weniger in FaDu beobachtet. Die geringste genetische Ausprägung zeigte sich in XF354 und etwas höhere Anteile jeweils in BHY und CAL.

Die Proteinexpression von EGFR erscheint im Western Blot sehr heterogen. BHY konnte nicht nachgewiesen werden, da es offensichtlich nur sehr gering ausgeprägt war. Nach BHY war auch in FaDu eine geringfügige Expression zu beobachten. Die weitaus höchste Expression zeigte sich in CAL, moderate Expression in HN, SAS und XF354. Es konnte somit festgestellt werden, dass BHY nur sehr wenig EGFR exprimiert. Diese Beobachtung bestätigte sich sowohl auf Proteinebene, als auch auf genetischer Ebene. CAL hingegen zeigte ein hohes Maß an EGFR auf Proteinebene im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. Auf Genebene war kein nennenswerter Unterschied zu den restlichen Zelllinien festzustellen.

EGFR konnte in allen Zelllinien auf Transkriptionsebene mithilfe von PCR nachgewiesen werden. Im Unterschied zu dem Western Blot von *Abbildung 5-4A* kann die PCR schon geringste Mengen an Nukleinsäuren amplifizieren und somit auch ein EGFR- Level für BHY auf Transkriptionsebene nachweisen. Dazu wurde ein Primer verwendet, der sowohl den Wildtyp, als auch die Mutation erkennen sollte. Der Wildtyp wurde bei 1037bp exprimiert. Die trunkierte vIII Mutation wurde auf genetischer Ebene in keiner der untersuchten Zelllinien gefunden. Als Positivkontrolle wurde eine vIII Vektor transfizierte Lymphomzelllinie gewählt, die bei 236bp exprimiert wurde. Als Negativkontrolle wurde für EGFR und vIII ein Leervektor verwendet. Zur Kontrolle wurde auch Actin in allen Zelllinien bei 506bp nachgewiesen. BHY zeigte auch auf genetischer Ebene die geringste Ausprägung von EGFR. Die restlichen Zelllinien wiesen keinen nennenswerten Unterschied in der Expression auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unterschiedliche Expressionsmuster für Aurora A Kinase, Aurora B Kinase und EGFR in den sechs Zelllinien vorliegen. Basierend auf dieser Feststellung sollte man, zur weiteren Differenzierung der Zelllinien auch die Kinaseaktivität bestimmen.

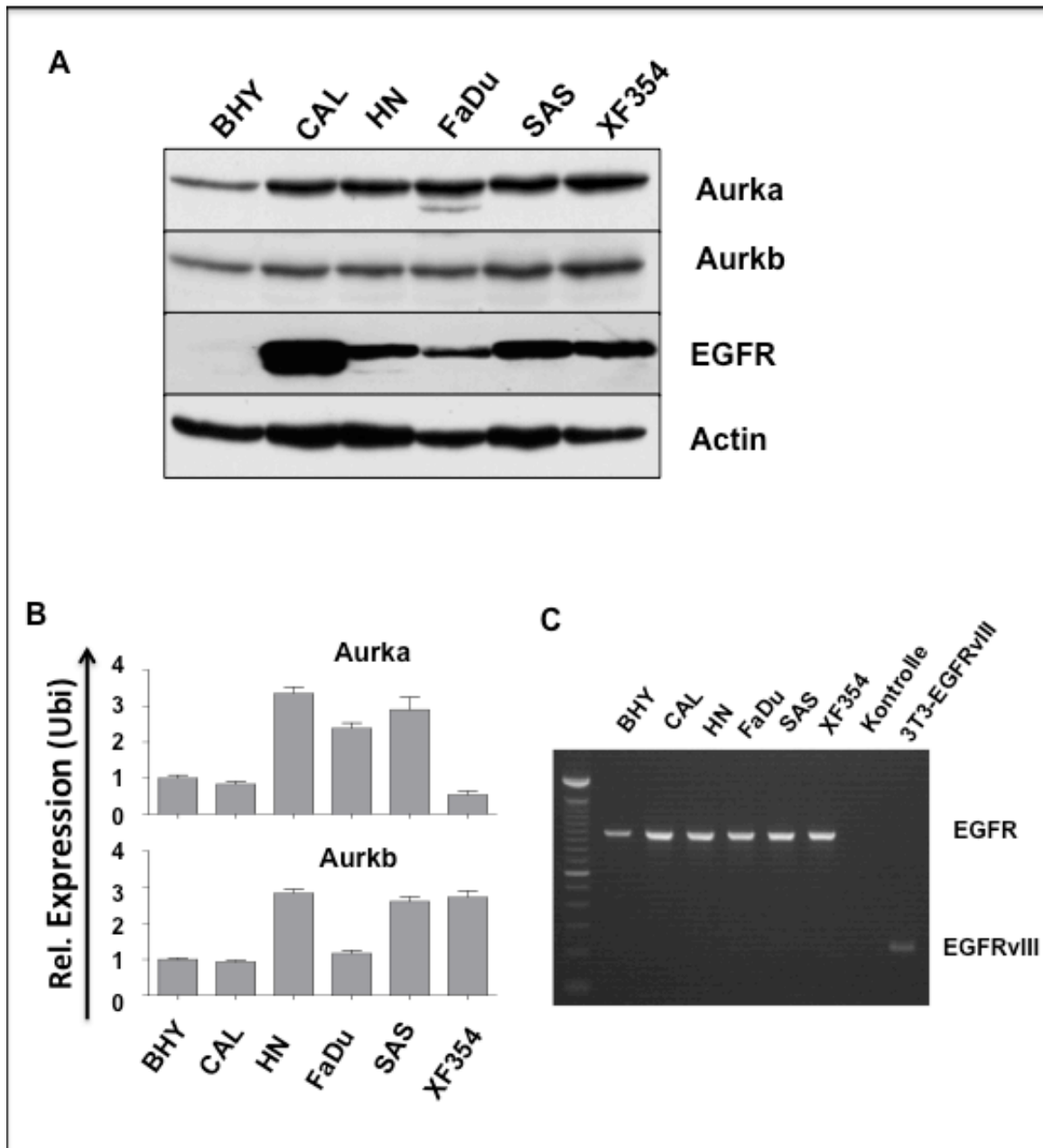


Abbildung 5-4: Nachweis der Expression von Aurora Kinasen und EGFR in sechs Plattenepithelkarzinom Zelllinien des Kopf- Hals- Bereichs. (A) In den sechs Zelllinien konnte Aurora A Kinase und Aurora B Kinase Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. EGFR konnte bis auf BHY in allen Zelllinien auf Proteinebene nachgewiesen werden. (B) Darstellung der Transkriptionslevel von Aurora A und Aurora B Kinase mit realtime pRT-PCR, relativiert durch Ubiquitin. (C) Expression der verschiedenen Zelllinien auf Transkriptionsebene. Es konnte kein Nachweis auf die EGFRvIII Mutation erbracht werden. Als Kontrolle wurde eine transfizierte NIH 3T3 Zelllinie verwendet.

5.3 Nachweis unterschiedlicher Aktivitätslevel der Aurora Kinasen und EGFR in humanen Plattenepithelkarzinom Zelllinien

Um die Zelllinien noch weiter zu charakterisieren, wurden Western Blots zum Aktivitätsnachweis von Aurora A Kinase und Aurora B Kinase angefertigt. Liegt die Aurka in ihrer aktiven Form vor, so kommt es zur Autophosphorylierung. Somit konnte pAurora A als Aktivitätsmarker für die Aurora A Kinase angesehen werden. Die Aurkb phosphoryliert Histon H3, was somit als Aktivitätsmarker für die Aurora B Kinase in unseren Versuchen fungierte.

In *Abbildung 5-5* werden die phosphorylierte Aurora A Kinase und Histon H3 als Aktivitätslevel für Aurora A Kinase und Aurora B Kinase im Western Blot dargestellt.

Die größte Aurora A Kinaseaktivität sah man in CAL und HN, wobei sich nicht unterscheiden ließ, wo mehr Aktivität vorhanden war. Etwas geringere Aktivität war in BHY zu erkennen. Wenig Kinaseaktivität sah man in FaDu, SAS und XF354. Es ließ sich kein Aktivitätsunterschied in diesen drei Zelllinien feststellen. Weiterhin gab es auch keine Korrelation zwischen der Expression auf Proteinebene von Aurora A Kinase und der Kinaseaktivität.

Die größte Aurora B Kinaseaktivität konnte in CAL und XF354 und etwas geringere Aktivität in HN detektiert werden. Die Zelllinie FaDu zeigte mittlere Aktivität. BHY und SAS wiesen kaum Aktivität auf. Verglichen mit der Aurora B Kinase-Aktivität konnten Übereinstimmungen nachgewiesen werden. Sowohl CAL, als auch HN wiesen in beiden Aurora Kinasen eine hohe Aktivität auf. FaDu und SAS hatten noch ein geringes Aktivitätslevel. Keine Übereinstimmung zeigten XF354, die bei Aurora B ein hohes Aktivitätslevel hatte und bei Aurora A ein geringes und BHY, die die geringste Aktivität in Aurora B und ein erhöhtes Aktivitätslevel in Aurora A aufwies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Zelllinien sowohl Aurora A Kinaseaktivität, als auch Aurora B Kinaseaktivität aufwiesen. Die höchste Kinaseaktivität für Aurora A Kinase und für Aurora B Kinase konnte in CAL und HN nachgewiesen werden. FaDu und SAS besaßen eine weitaus geringere Aktivi-

tät von Aurora A Kinase und gleichermaßen eine erheblich verminderte Kinaseaktivität für Aurora B im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. XF354 wies neben CAL die höchste Aktivität für Aurora B Kinase auf, aber mit FaDu und SAS die geringste Aktivität von Aurora A Kinase.

Weder korrelierte die Kinaseaktivität von Aurora A mit der von Aurora B, noch die Proteinexpression mit der Aktivität. Es konnten verschiedene Aktivitätslevel, als auch verschiedene Proteinexpressionmuster detektiert werden. Dementsprechend ist ebenfalls mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf Aurora Kinase Inhibitoren und monoklonalen Antikörper, die EGFR blockieren, zu rechnen.

Basierend auf diesen Daten sollte nun der Effekt von Kinaseinhibitoren beziehungsweise monoklonaler Antikörper gegen EGFR untersucht werden. Entscheidend ist dabei, ob sich bestimmte Expressionsmuster günstig beziehungsweise ungünstig auswirken.

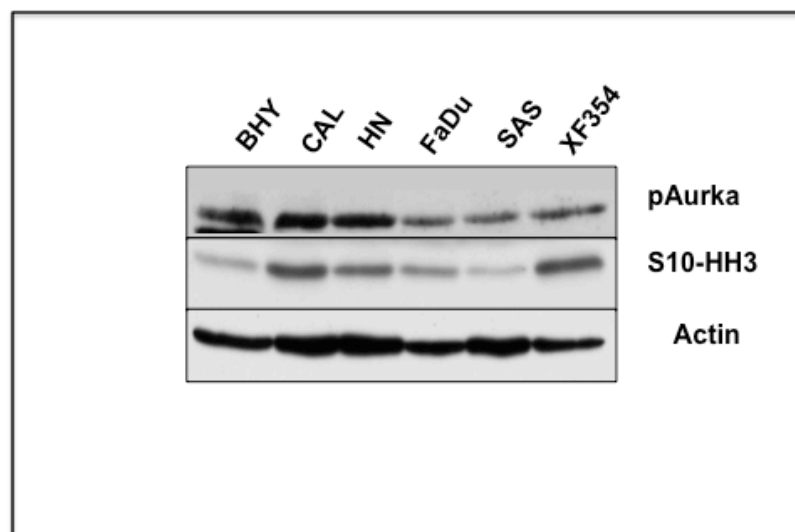


Abbildung 5-5: Nachweis der Aurora A und B Kinaseaktivität. Es konnte in allen sechs Zelllinien eine Phosphorylierung sowohl von pAurora A Kinase durch die Aurora A Kinase als auch von Serin10-Histon H3 durch die Aurora B Kinase nachgewiesen werden.

5.4 Inhibition der Aurora Kinasen durch AS703562 bewirkt eine verminderte Phosphorylierung von S10/HH3 durch Aurora B Kinase, einen G2/M-Arrest des Zellzyklus' sowie eine Zunahme der apoptotischen Zellen

Aurora A Kinase, Aurora B Kinase und EGFR sind beliebte Angriffspunkte für die zielgerichtete Tumorthherapie. Da in allen sechs Zelllinien eine Expression nachgewiesen werden konnte und in manchen sogar eine Überexpression detektiert wurde, lag es nahe, die unterschiedlichen Effekte mit dem panAurora Kinase Inhibitor auf die Zelllinien darzustellen. Dabei war es von besonderem Interesse, ob eine Überexpression mit dem Effekt der Inhibition korreliert und inwieweit die Kinaseaktivität beeinträchtigt wird.

Als erstes wurden MTT Assays für alle sechs Zelllinien durchgeführt. Acht verschiedene Konzentrationen des panAurora Kinase Inhibitors AS wurden dabei verwendet (0nM, 3.125nM, 6.25nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM und 200nM) und jeweils Messungen der Extinktion nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Bei vitalen Zellen wird der Farbstoff umgesetzt und es erfolgt eine Farbänderung. Kommt es zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen wird weniger Farbstoff umgesetzt und die Extinktion sinkt. Diese Methode diente als Screening Methode und sollte helfen herauszufinden, ab welcher kleinstmöglichen Konzentration bereits ein messbarer Effekt in Form einer Zunahme der apoptotischen Zellen auftritt und nach wie vielen Stunden dieser Effekt am besten sichtbar wird. So sollte der zeitliche und experimentelle Rahmen eingegrenzt werden und der Versuchsablauf vereinfacht werden.

Die Zelllinie BHY zeigte nach 24 Stunden nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen einen geringen Effekt (ca. 60nM AS). Nach 48 Stunden zeigte sich dann bereits bei geringer Konzentration (ca. 6nM AS) eine deutliche Abnahme der Extinktion. Den besten Effekt allerdings konnte man nach 72 Stunden beobachten. Der Umsatz des Farbstoffes durch die proliferierenden Zellen ging deutlich zurück.

Bei der Zelllinie CAL zeigte sich nach 24 Stunden kein maßgeblicher Effekt des Aurora Kinase Inhibitors unabhängig von dessen Konzentration. Die 48 Stunden Messung zeigte schon eine Inhibition bei ca. 6nM AS an. Die stärkste Inhibition er-

folgte allerdings nach 72 Stunden. Bereits ab ca. 4nM AS sank die Anzahl der vitalen Zellen deutlich ab.

Die Zelllinie HN zeigte innerhalb des gemessenen Zeitraumes eine gewisse Inhibitorresistenz. Sowohl nach 24, als auch nach 48 Stunden war unabhängig von der Erhöhung der Konzentrationen kein Unterschied zu erkennen. Nach 72 Stunden sank die Extinktion ab einer Konzentration von ca. 4nM AS, allerdings bei Weiten nicht so stark, wie bei den anderen Zelllinien. Höhere Konzentrationen (ab ca. 16nM) zeigten dann keinen additiven Effekt mehr.

Bei der Zelllinie FaDu war, ähnlich wie HN, eine Resistenz nach 24 Stunden zu erkennen. Es zeigte sich keinerlei Abweichung der Extinktion unabhängig von der Inhibitorkonzentration. Nach 48 Stunden konnte bei sehr hohen Konzentrationen (ca. 250nM AS) ein Abfall der Extinktion beobachtet werden. Am besten jedoch inhibierte AS die Zelllinie nach 72 Stunden. Es kam bereits bei ca. 30nM zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen und bei ca. 250nM zu einem weiteren Abfall des Farbstoffumsatzes.

Bei der Zelllinie SAS war die Extinktion nach 24 Stunden auf einem konstant niedrigen Level. Nach 48 Stunden nahm die Extinktion auch nicht weiter ab, sondern blieb ebenso auf einem konstanten Level. Lediglich nach 72 Stunden konnte ab einer Inhibitorkonzentration von ca. 16nM AS ein weiterer Abfall beobachtet werden. Mit steigender Konzentration sank die Extinktion von SAS proportional dazu.

Die Zelllinie XF354 zeigte den stärksten Effekt der Inhibition - allerdings erst nach 72 Stunden. Die Extinktion blieb nach 24 Stunden und nach 48 Stunden mit aufsteigender Inhibitorkonzentration konstant auf dem Level der unbehandelten Zellen. Es zeigte sich eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor bei kürzerer Exposition als 48 Stunden. Nach 48 Stunden ging der Umsatz des Farbstoffes zurück, jedoch erst bei hohen (>250nM AS) Inhibitorkonzentrationen. Einen erheblichen Abfall der Proliferation konnte man nach 72 Stunden bereits bei ca. 2nM AS erkennen.

Im Vergleich zeigten alle sechs Zelllinien ein unterschiedliches Ansprechen auf den Aurora Kinaseinhibitor AS703569. Die Ergebnisse ergaben, dass weitere Messungen immer nach 72 Stunden erfolgen sollten, da zu diesem Zeitpunkt bei allen Zelllinien es zu einer Zunahme an apoptotischen Zellen kam. XF354 und CAL sprachen am besten auf den Inhibitor an. Alle Zelllinien sprachen nach 72

Stunden bereits bei geringen Konzentrationen an (ca. 5nM AS). HN zeigte nach allen Expositionen eine gewisse Inhibitorresistenz. BHY, FaDu und SAS sprachen gut auf den Inhibitor an.

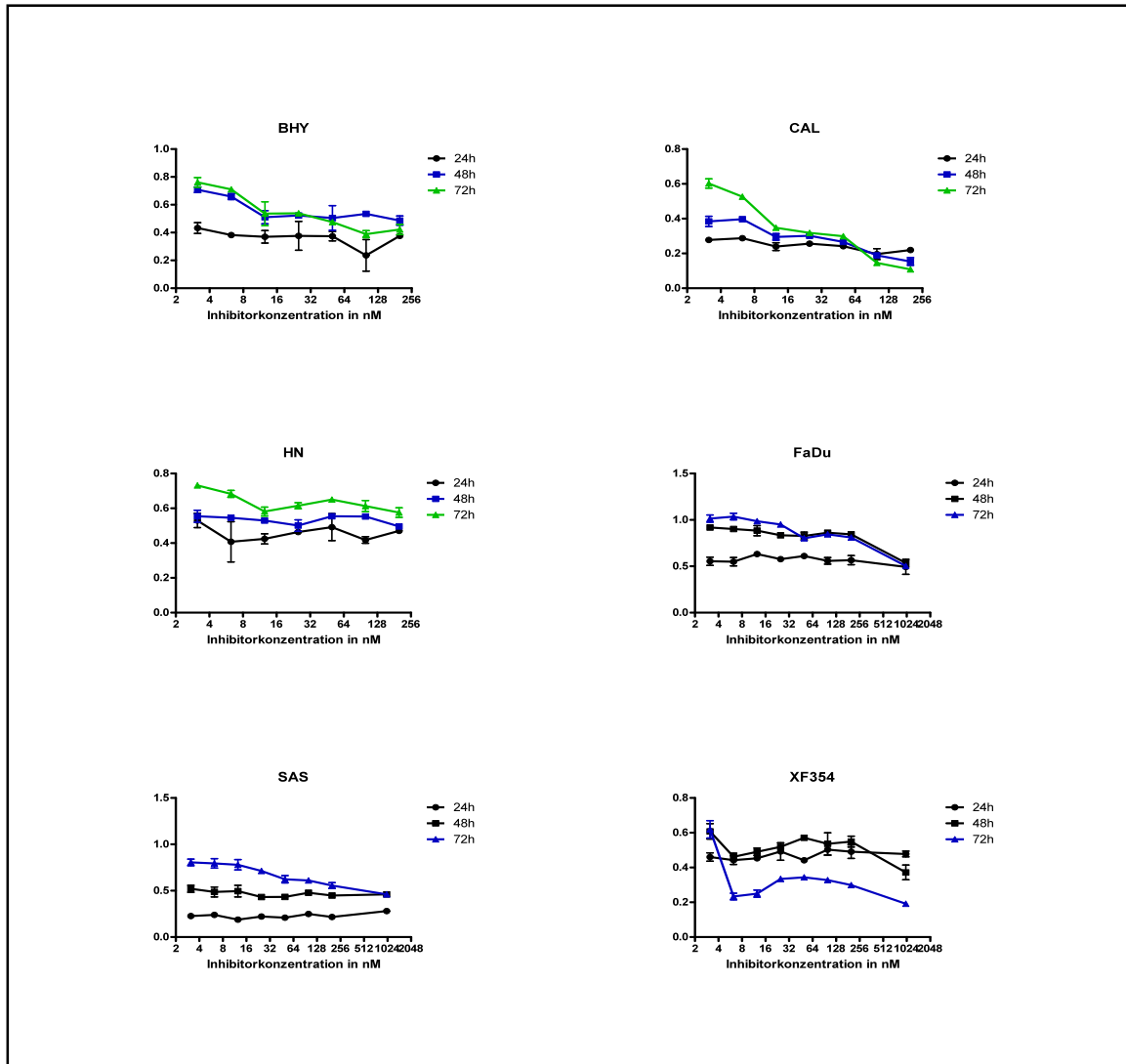


Abbildung 5-6: Darstellung der Vitalitätsabnahme unter verschiedenen Konzentrationen und Zeitpunkten unter dem panAurora Kinase Inhibitor AS im MTT- Assay. Es wurden nach 24h, 48h und 72h Messungen mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen vorgenommen. Nach 72h kommt es in allen Zelllinien zu einem vermehrten Auftreten von Apoptose. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus 3 unterschiedlichen Messungen angegeben.

Die Ergebnisse der Extinktionsmessungen (MTT Assays) gaben Anlass für weitere Versuche. Der panAurora Kinase Inhibitor bewirkte eine Zunahme der apoptotischen Zellen bei allen Zelllinien. Es ist bekannt, dass der Inhibitor einen G₂/M-Zellzyklusarrest verursacht. Der Zellzyklus unter 0nM, 25nM und 100nM AS703569 wurde mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert.

Bereits bei einer InhibitorKonzentration von 25nM zeigte sich bei der Zellzyklusanalyse von BHY ein G₂/M- Arrest. Bei 100nM lag ebenso ein Zellzyklusarrest vor. Die Zellzyklusanalyse von CAL zeigte ebenso wie bei BHY einen G₂/M- Arrest bei einer InhibitorKonzentration von 25nM.

Die Zelllinien HN und FaDu zeigten bereits bei 25nM InhibitorKonzentration einen G₂/M- Zellzyklusarrest. Bei 100nM war dieser Zellzyklusarrest noch deutlicher zu erkennen.

Die Zelllinie SAS zeigte bei 25nM AS703569 einen G₂/M- Zellzyklusarrest. Der gleiche Effekt ließ sich bei 100nM beobachten.

Die Zelllinie XF354 zeigte einen Wirkungseintritt von dem Kinaseinhibitor bei 25nM AS703569, allerdings kam es erst bei 100nM zu einem G₂/M- Zellzyklusarrest.

Im Vergleich war in der Zellzyklusanalyse in allen Zelllinien ein G₂/M- Arrest zu erkennen. Bei BHY, CAL, HN, FaDu und SAS trat der Zellzyklusarrest schon bei 25nM auf. XF354 ging in diesen Zustand erst bei der höheren Konzentration von 100nM über.

Der panAurora Kinase Inhibitor AS703569 wirkte bei allen Zelllinien und sorgte schon bei geringer Konzentration (ca. 5nM AS) für eine Zunahme der apoptotischen Zellen und führte zu einem Zellzyklusarrest (ca. 25nM). Somit konnte effektiv die Mitose und Zellteilung verhindert werden. Es kam nicht sofort, sondern erst nach ca. 72 Stunden zum Wirkungseintritt.

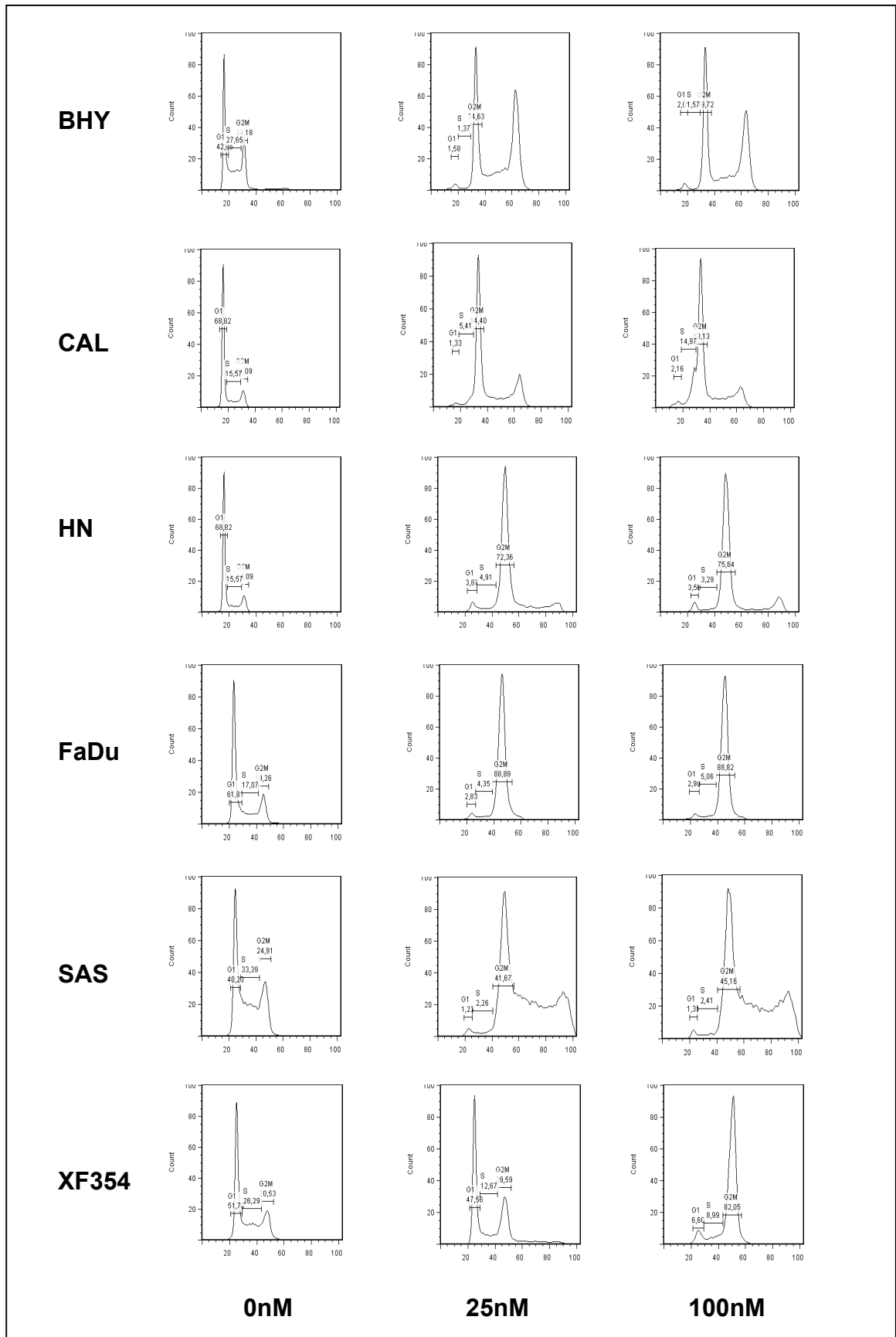


Abbildung 5-7: PanAurora Kinase Inhibition mit AS führt zum Zellzyklusarrest im FACS. Die sechs Zelllinien mit jeweils 25nM und 100nM panAurora Kinase Inhibitor AS zeigen einen G2/M- Arrest in der Zellzyklusanalyse

Im Western Blot konnte eine Abnahme der Phosphorylierung von S10-HH3 im Sinne eines Aktivitätsverlusts der Aurora B Kinase bereits nach fünf Minuten und die vollständige Aufhebung nach 30 Minuten unter der Behandlung mit dem panAurora Kinase Inhibitor festgestellt werden. Die Zelllinie FaDu wurde dabei entweder mit 0nM oder mit 5nM AS jeweils fünf, 30, 60 und 240 Minuten inkubiert. Unbehandelt konnte eine starke Phosphorylierung beobachtet werden, die schon nach fünf Minuten unter der Behandlung mit dem panAurora Kinase Inhibitor deutlich vermindert war. Danach war keine Phosphorylierung mehr nachweisbar. Die Abbildung ist stellvertretend für die anderen Zelllinien ausgewählt worden.

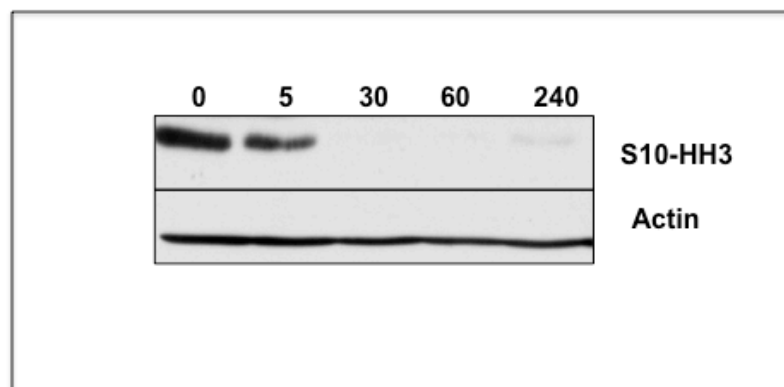


Abbildung 5-8: Abnahme der Aurora B Kinaseaktivität unter dem panAurora Kinase Inhibitor AS. Die Zelllinie FaDu wurde mit 5nM AS für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Bereits nach 5min nahm die Kinaseaktivität ab und nach 30min ist keine Aktivität mehr nachzuweisen. Dargestellt ist eine representative Abbildung.

5.5 Inhibition von EGFR durch Cetuximab schränkt die Proliferation bei bereits 200nM ein

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen EGFR. Da in allen Zelllinien eine unterschiedliche EGFR Expression nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit diese Expression durch Inhibition durch Cetuximab beeinflusst wird. Daher wurden Zellzahlmessungen unter verschiedenen Cetuximab Konzentrationen (0nM, 200nM und 400nM) durchgeführt. Die Zellen wurden nach drei,

sieben, zehn und 14 Tagen gezählt. Da es sich lediglich um eine Screening Methode handelte, wurde der Versuch nur einmal durchgeführt. In den folgenden Versuchen konnte das Ergebnis dieser Versuchsreihe validiert werden.

Das Wachstum der Zelllinie BHY wurde kaum durch die Hemmung von EGFR beeinträchtigt. Nach 14 Tagen zeigte sich fast kein Unterschied im Wachstum sowohl unter 200nM als auch unter 400nM. BHY ist aufgrund der sehr geringen Expression von EGFR resistent gegenüber Cetuximab.

Das Wachstum von CAL ist konzentrationsabhängig gesunken. Aufgrund der hohen EGFR Expression war der Effekt erst nach langer Exposition (>14 Tage) zu beobachten.

Der größte inhibitorische Effekt zeigte sich bei HN, FaDu und SAS. Diese zeigten eine mittlere EGFR Expression.

Die Zelllinien HN und FaDu zeigten einen konzentrationsunabhängigen Effekt von Cetuximab. Es ließ sich kein Unterschied im Wachstum unter 200nM und 400nM Cetuximab feststellen. Beide Konzentrationen hemmten das Wachstum effektiv.

Die Zelllinie SAS zeigte einen leicht konzentrationsabhängigen Unterschied im Wachstum. Sowohl bei 400nM, als auch bei 200nM kam es zu einer erheblichen Minderung der Proliferation. Bei 400nM kam es tendenziell zu weniger Proliferation als bei 200nM.

Die Zelllinie XF354 zeigte erst nach dem zehnten Tag einen Abfall der Proliferation unter Cetuximab. Bis zum 14. Tag war kein Unterschied zwischen 200nM und 400nM Cetuximab zu erkennen. Erst am 17. Tag hemmte 400nM Cetuximab die Proliferation stärker als 200nM. Insgesamt hemmte Cetuximab die Proliferation von XF354 schwächer, als bei HN, FaDu und SAS. BHY und CAL erschienen, aufgrund der geringeren/höheren Expression von EGFR, resistenter gegenüber Cetuximab.

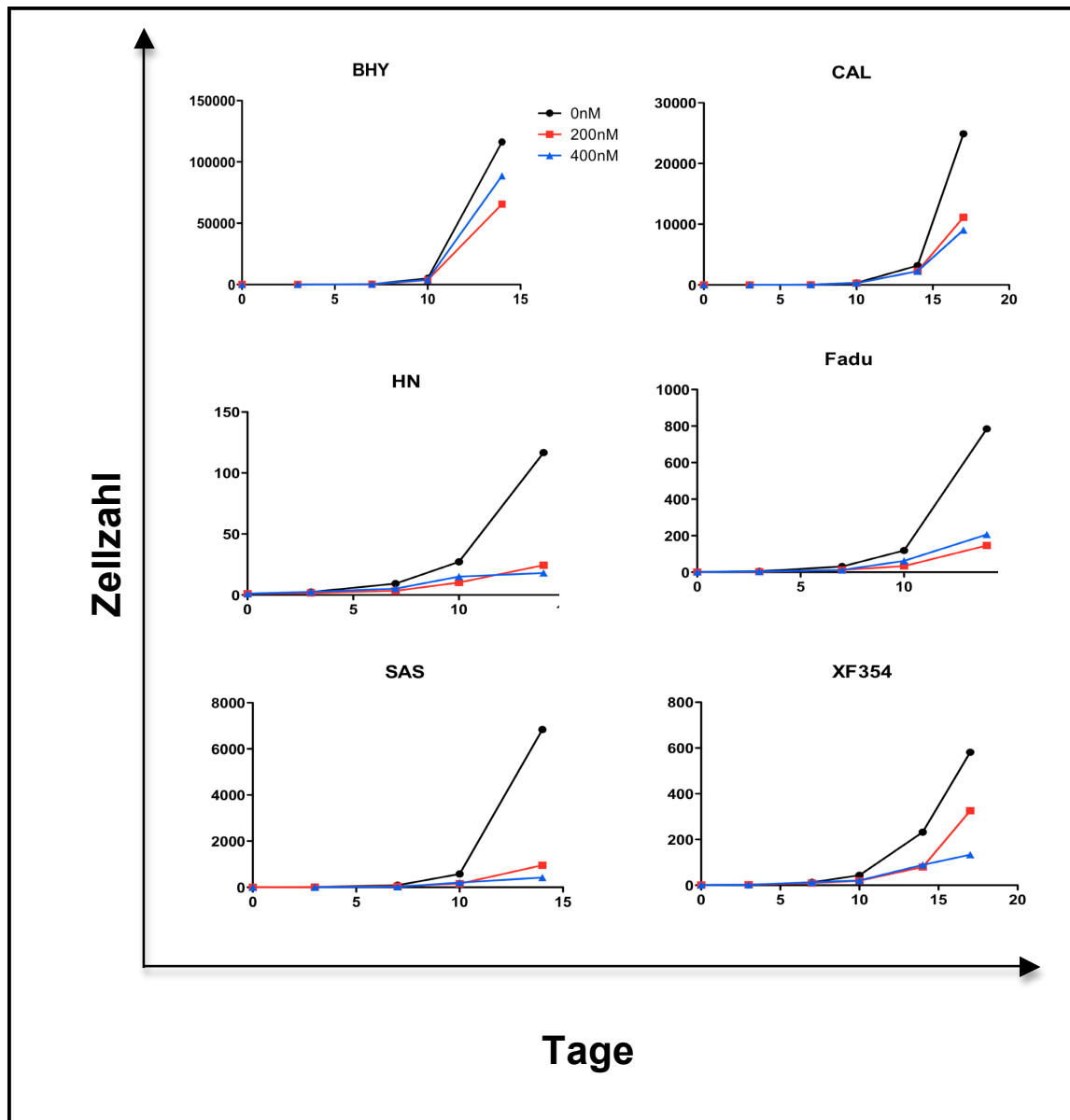


Abbildung 5-9: Proliferationsmessung bei Inhibition durch 200nM und 400nM Cetuximab. Die sechs verschiedenen Zelllinien wurden über mindestens 14 Tage behandelt. Dabei zeigte sich kaum Unterschied zwischen Behandlung unter 200nM und 400nM, aber ein deutlicher Unterschied zum Wachstum der unbehandelten Zellen.

Nachdem der experimentelle Rahmen festgelegt werden konnte und somit die kleinstmögliche effektive Konzentration von Cetuximab und die Mindestdauer der Behandlung bestimmt wurden, stellte sich nun die Frage, inwieweit die Aktivität durch Inhibition vermindert wird und ab wann ein Aktivitätsverlust nachweisbar ist.

Als Aktivitätsmarker im Western Blot diente für EGFR pEGFR, pAkt und pErk. Die in *Abbildung 5-10* dargestellten Aktivitätslevel sind representative Ergebnisse. Die

Zelllinie CAL wurde für diese Versuchsreihe ausgewählt und mit 200nM Cetuximab fünf, 30, 60 und 240 Minuten inkubiert sowie unbehandelt belassen. Wie in *Abbildung 5-10* dargestellt wird, kam es nach fünf Minuten zu einer Abnahme der Autophosphorylierung von EGFR. Nach 30 Minuten kam es wieder zu einem Anstieg von pEGFR. pAkt und pErk hingegen zeigten nach 30 Minuten eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung.

Konnte zuvor gezeigt werden, dass eine Konzentration von 200nM Cetuximab effektiv die Proliferation hemmte und eine Einschränkung des Wachstums bei den meisten Zelllinien erst ab zehn Tagen nachweisbar war, so zeigt sich in *Abbildung 5-10*, dass die Abnahme der EGFR Aktivität nach einer deutlich kürzeren Inkubationszeit erreicht werden kann (für pEGFR bereits nach fünf, pErk nach 30 und pAkt nach 60 Minuten).

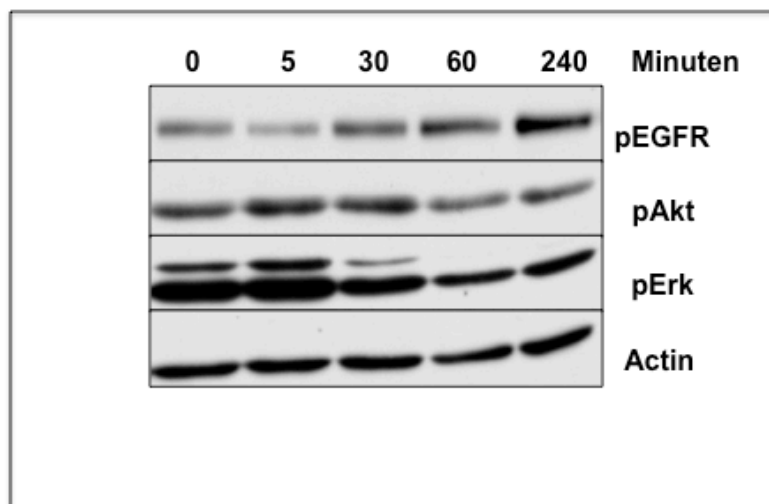


Abbildung 5-10: Veränderung der EGFR- Aktivität durch Inhibition mit 200nM Cetuximab. Abnahme der Aktivität in der Zelllinie CAL wurde zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt. Als Aktivitätsmarker dienten pErk, pAKT und pEGFR.

5.6 Synergistische Wirkung von panAurora Kinase Inhibitor und EGFR- Antikörper überwindet die Cetuximab Resistenz

Die Wirkung von AS703569 und Cetuximab als jeweilige Mono- sowie als Kombinationstherapie wurde mithilfe von Proliferationsmessungen überprüft. Die Messungen der Zellzahl erfolgten jeweils nach drei, sieben, zehn und 14 Tagen. Es wurden jeweils Messungen mit 0nM, 5nM AS, 200nM Cetuximab und 5nM AS&200nM Cetuximab durchgeführt.

Alle Zelllinien zeigten nach 14- tägiger Behandlung mit den Chemotherapeutika einen Abfall der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Betrachtet man die jeweiligen Zelllinien, so bestehen auch Unterschiede bezüglich der Sensibilität auf die eingesetzten Therapeutika.

Auffallend bei der Zelllinie BHY war vor allem, dass unter alleiniger Behandlung mit 200nM Cetuximab die Proliferation kaum von der Proliferation der nur mit Medium behandelten Zellen abweicht. Es war keine Hemmung der Proliferation zu beobachten. Gleichmaßen wie bei den vorherigen Versuchen zeigte sich eine Resistenz der Zelllinie BHY gegenüber Cetuximab, was auf die geringe EGFR Expression in BHY zurückgeführt werden kann. Den stärksten supprimierenden Effekt auf die Proliferation wies die Kombinationsbehandlung mit 5nM AS&200nM Cetuximab auf. Die alleinige Behandlung mit AS war zwar effektiver als mit Cetuximab, aber bei weitem nicht so effektiv wie die Kombination aus beiden Therapeutika. Daraus lässt sich schließen, dass durch einen unbekanntem Pathomechanismus die Resistenz von BHY gegenüber Cetuximab durch die Kombination aus beiden überwunden werden kann.

Ebenfalls zeigte die Kombinationsbehandlung bei CAL die effektivste Inhibition der Proliferation. Allerdings konnte keine so zytostatische Wirkung wie zuvor bei BHY erzielt werden. Im Vergleich zu der Proliferation ohne Inhibition konnte eine deutliche Einschränkung der Proliferation festgestellt werden. Auch mit 5nM AS703569 konnte ein guter Effekt erzielt werden, allerdings nicht ganz so effektiv wie bei der Kombination oder unter der Behandlung mit Cetuximab.

Eine nahezu identische Inhibition der Proliferation von HN erreichten 5nM AS, 200nM Cetuximab. Lediglich die Kombination aus Cetuximab und AS703569 zeigte ab dem zehnten Expositonstag einen stärkeren zytostatischen Effekt. 5nM AS

und die Kombination waren geringfügig effektiver. Dennoch konnte mit allen Inhibitoren eine erhebliche Einschränkung der Proliferation erzielt werden.

Erwartungsgemäß zeigte sich bei der Zelllinie FaDu der schlechteste Effekt unter 200nM Cetuximab. Verglichen mit den übrigen Zelllinien exprimierte FaDu das geringste EGFR Level nach BHY. Die Inhibition ist daher weniger einschränkend für das Tumorwachstum. Ähnlich wie bei BHY konnte durch die Kombinationsbehandlung die Cetuximab Resistenz überwunden und eine sehr effektive Proliferationssinhibition erzielt werden. Die Proliferationsmessung zeigte die größte Einschränkung des Wachstums bei HN, FaDu und SAS im Vergleich mit den anderen Zelllinien. Die Effektivität ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Aurora A Kinase, Aurora B Kinase und EGFR ein mittleres Expressionsmuster aufweisen. Die gewählten Inhibitorkonzentrationen sowie Expositionen können folglich eine gute Wirkung erzielen. Die Zelllinie XF354 zeigte relativ ähnliche Effekte von Cetuximab und AS. Etwas besser wurde die Proliferation durch AS gehemmt. Die Kombination 5nM AS&200nM Cetuximab erreichte wie zuvor schon die effektivste Inhibition der Proliferation. Im Vergleich mit den restlichen Zelllinien wird das Wachstum aber insgesamt etwas weniger effektiv gehemmt. Es zeigt sich zwar ein deutlicher Unterschied zu den Zellen nur mit Medium, aber kein großer Unterschied zu den nur mit Cetuximab oder nur mit AS behandelten Zellen im Vergleich zu der Kombination.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die synergistische Hemmung mit 200nM Cetuximab und 5nM AS703569 in allen Zelllinien am effektivsten die Proliferation hemmte ($p < 0.05$). Das Wachstum aller Zelllinien wurde sowohl von Cetuximab, als auch von AS gehemmt. BHY zeigte eine Resistenz gegenüber Cetuximab, die aber erstaunlicherweise durch die Kombinationstherapie überwunden werden konnte. Eine geringe inhibitorische Wirkung von Cetuximab konnte auch bei der Zelllinie FaDu festgestellt werden. Dies kann auch auf die geringe Expression der Zelllinie von EGFR zurückgeführt werden. Es konnte keine Zytotoxizität von AS703569 oder Cetuximab alleine nachgewiesen werden, lediglich eine zytostatische Wirkung. AS703569 hemmt bereits nach ca. 30 Minuten effektiv die Kinaseaktivität bei einer Konzentration von 25nM. Cetuximab kann das Wachstum ab einer Konzentration von ca. 200nM hemmen. Die Kombinationstherapie

schränkte das Wachstum unabhängig von Resistenzen gegenüber AS703569 oder Cetuximab am effektivsten ein.

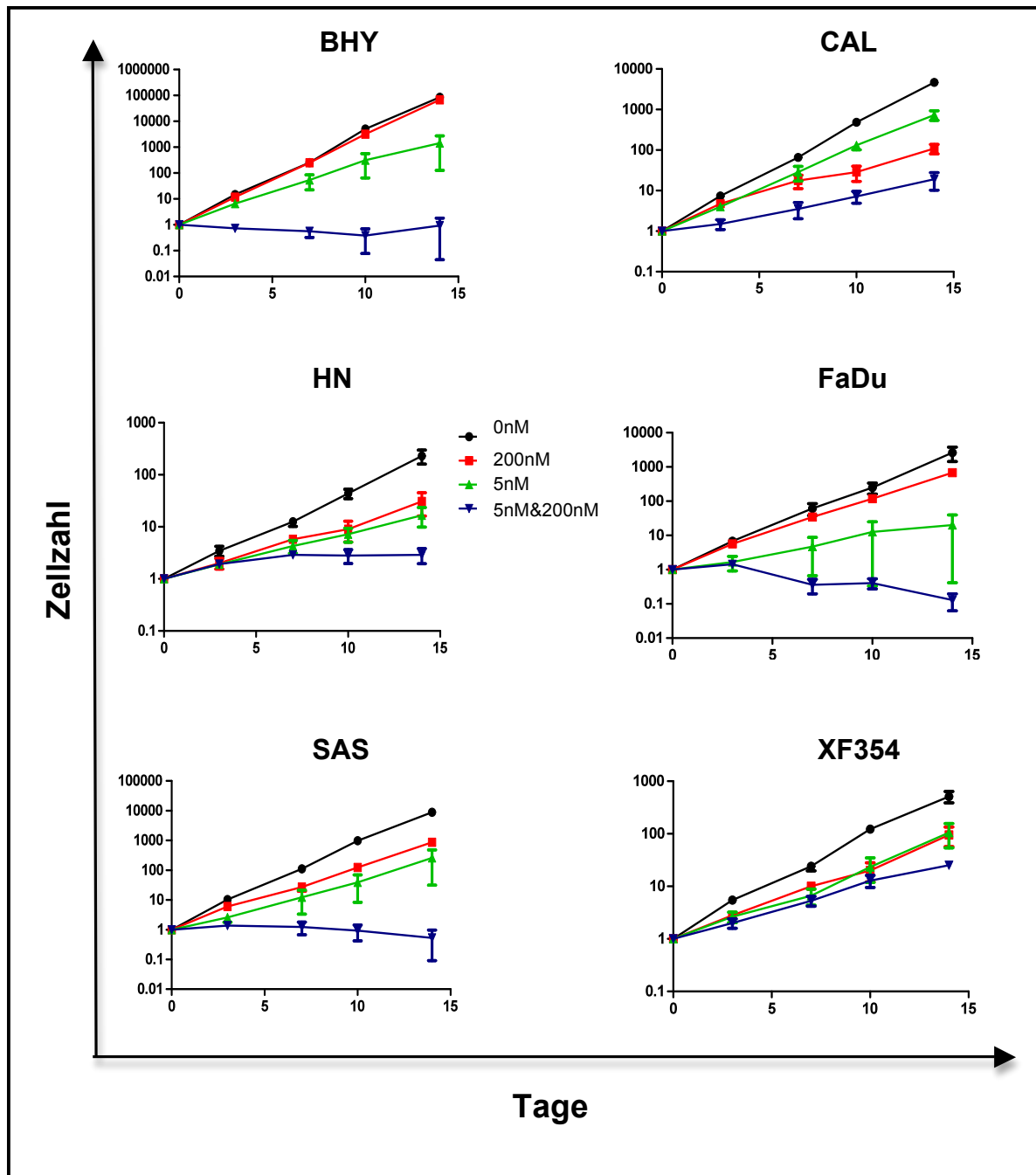


Abbildung 5-11: Die Kombinationstherapie von EGFR Antikörper und Aurora Kinase Inhibitor führt zu stärkerer Hemmung der Proliferation und vermehrter Apoptose im Vergleich zur Monotherapie. Die sechs Zelllinien wurden jeweils mit 200nM Cetuximab, 5nM und der Kombination aus Cetuximab und AS für eine Dauer von insgesamt 14 Tagen behandelt. Es erfolgten Zellzahlmessung nach null, drei, sieben, zehn und 14 Tagen. Als Kontrolle wurde jeweils mit 0nM behandelt und das Wachstum mit den behandelten Zellen verglichen. Die Zellzahl wird hierbei in einem logarithmischen Maßstab angegeben. Die Kombinationstherapie bewirkt nach 14 Tagen Behandlung eine signifikante Reduzierung des Wachstums im Vergleich zu den anderen Bedingungen ($p < 0.05$).

Zur Beurteilung der nukleären Veränderung und des Apoptoseverhaltens wurden die Zelllinien 48 Stunden mit den bei uns bereits etablierten Dosierungen behandelt. Die Zellen wurden, ebenfalls wie bei den Proliferationsmessungen, mit 0nM, 200nM Cetuximab, 5nM AS und der Kombination aus 200nM Cetuximab und 5nM AS behandelt.

In der Durchflusszytometrie (FACS) zeigte sich sowohl eine erhöhte Anzahl der polyploiden Zellen, als auch der apoptotischen Zellen. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen hat Cetuximab keinen nachweislichen Einfluss auf die Entstehung von polyploiden Zellen. Zu einem signifikant erhöhten Anteil der polyploiden Zellen führte in allen Zelllinien die Behandlung mit 5nM AS und die Kombination aus 200nM Cetuximab und 5nM AS. Dabei konnte nicht abgegrenzt werden, ob die Kombination zu einem höheren Anteil als die alleinige Behandlung mit AS führt oder umgekehrt. Betrachtet man *Abbildung 5-12A* so zeigte entweder AS alleine oder die Kombination einen höheren Anteil an polyploiden Zellen.

In BHY führte die Behandlung mit AS zu einem leicht höheren Anteil der polyploiden Zellen im Vergleich zu der kombinierten Behandlung mit 200nM Cetuximab und 5nM AS. Insgesamt lag BHY mit einem Anteil von ca. 15% polyploiden Zellen verglichen mit den anderen Zelllinien eher im unteren Bereich.

CAL wies einen höheren Anteil an mehrkernigen Zellen durch die Monotherapie von AS, als durch die Kombination auf. Diese erreicht einen mittleren Effekt in an betracht der Erhöhung der polyploiden Zellen auf ca. 20%. Die Kombinationstherapie erreicht einen Anteil von etwa 15%.

In HN konnte schon im unbehandelten Zustand ein recht hoher Anteil von ca. 5% an mehrkernigen Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil der polyploiden Zellen unter Cetuximab lag ebenfalls bei ca. 5%. Dementsprechend hoch war auch der Anteil der polyploiden Zellen unter AS und der Kombination aus AS und Cetuximab mit über 20%. Die Monotherapie erschien dabei geringfügig effektiver.

Erstaunlicherweise wiesen sowohl FaDu ebenso wie SAS ein sehr gutes Ansprechen auf die Monotherapie von AS und der Kombination von AS und Cetuximab auf, obwohl sie im unbehandelten Zustand den geringsten Anteil mehrkerniger Zellen besaßen. Der Anteil lag jeweils bei 60% polyploiden Zellen. Interessanterweise war dabei die Kombinationstherapie bei beiden leicht effektiver.

XF354 zeigte das insgesamt schlechteste Ansprechen auf die Therapeutika. Die Kombination führte zu einem Anstieg von nur etwa 9% der mehrkernigen Zellen und die alleinige Behandlung mit AS sogar nur zu einem Anstieg auf etwa 7%.

Betrachtet man die Ergebnisse von *Abbildung 5-12A* so wird deutlich, dass hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der Effektivität von AS in der Monotherapie von der Kombinationstherapie von AS und Cetuximab abgegrenzt werden konnte. Das beste Ansprechen konnte jedoch bei FaDu und SAS nachgewiesen werden und das schlechteste Ansprechen bei XF354. Ebenfalls zeigte sich, dass Cetuximab keinen Einfluss auf die Entstehung von polyploiden Zellen zu haben scheint.

In *Abbildung 5-12B* wurde dann der Einfluss von den verschiedenen Dosierungen auf den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen überprüft. Gleichermaßen wie im vorherigen Versuch zeigte die Monotherapie mit Cetuximab in allen Zelllinien ein schlechteres Ansprechen als AS alleine oder der Kombination aus AS und Cetuximab. Es konnte jedoch in allen Zelllinien ein leicht vermehrter Anteil von apoptotischen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden.

In BHY zeigte sich, ähnlich wie bei der Untersuchung auf den DNA- Gehalt, kaum ein Anstieg der Apoptose durch die Behandlung mit Cetuximab. Mit ca. 7% apoptotischen Zellen im Vergleich zu ca. 6% bei der alleinigen AS Behandlung, war die Kombination etwas effektiver.

Bezogen auf die restlichen Zelllinien wies CAL den höchsten Anteil an apoptotischen Zellen mit ungefähr 17% unter der Kombinationstherapie auf. AS alleine war etwas weniger effektiv mit einem Anteil von ca. 14%. Kaum Differenz war zwischen den Kontrollzellen und den Cetuximab behandelten Zellen festzustellen. Cetuximab war um etwa 1% effektiver.

In HN stellten sich AS und die Kombination fast gleich dar. Insgesamt war das Ansprechen auf alle Therapeutika am schlechtesten. Unbehandelt waren ca. 1%, mit Cetuximab etwa 1,5% und unter AS und der Kombination aus AS und Cetuximab auch nur ca. 2,5% der Zellen apoptotisch. Somit war auch kein deutlicher Unterschied zwischen den sonst viel effektiveren Therapeutika abzugrenzen.

Deutliche Unterschiede zwischen Cetuximab/Kontrollzellen und AS und der kombiniert behandelten Zellen zeigte sich in FaDu. Die Kombination erwies sich als mit einem Anteil von ca. 4% an apoptotischen Zellen am effektivsten. Im Gegensatz dazu lag der Anteil bei den unbehandelten Zellen bei etwa 0,5% und etwa ebenso viel bei den mit Cetuximab behandelten Zellen. Unter der alleinigen Therapie mit AS lag der Anteil bei ca. 2,5% apoptotischen Zellen.

Signifikant höhere Anteile der sich in Apoptose befindlichen Zellen unter der Kombinationstherapie mit AS und Cetuximab zeigten SAS und XF354. Dabei konnte in SAS ein Anteil von ca. 10% beobachtet werden und den weitaus signifikantesten Unterschied in XF354 mit einem Anteil von über 10% im Vergleich zu ungefähr 3% mit AS und noch geringerem Anteil der Cetuximab behandelten und unbehandelten Zellen. Hierbei bestand auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Monotherapien mit Cetuximab und AS.

Schlussfolgernd ist somit anzumerken, dass sich der DNA- Gehalt unter der Behandlung mit AS erhöht, aber kein signifikanter zusätzlicher Anstieg durch die kombinierte Therapie erzielt werden kann. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass der Anteil der in Apoptose übergehenden Zellen sehr wohl zusätzlich durch die Kombinationstherapie erhöht wird. Dieser Anteil war in allen Zelllinien der größte und führte sogar bei SAS und XF354 zu einer signifikanten Erhöhung der apoptotischen Zellen. Cetuximab scheint keinen Anfluss auf den DNA- Gehalt oder die Apoptose zu haben.

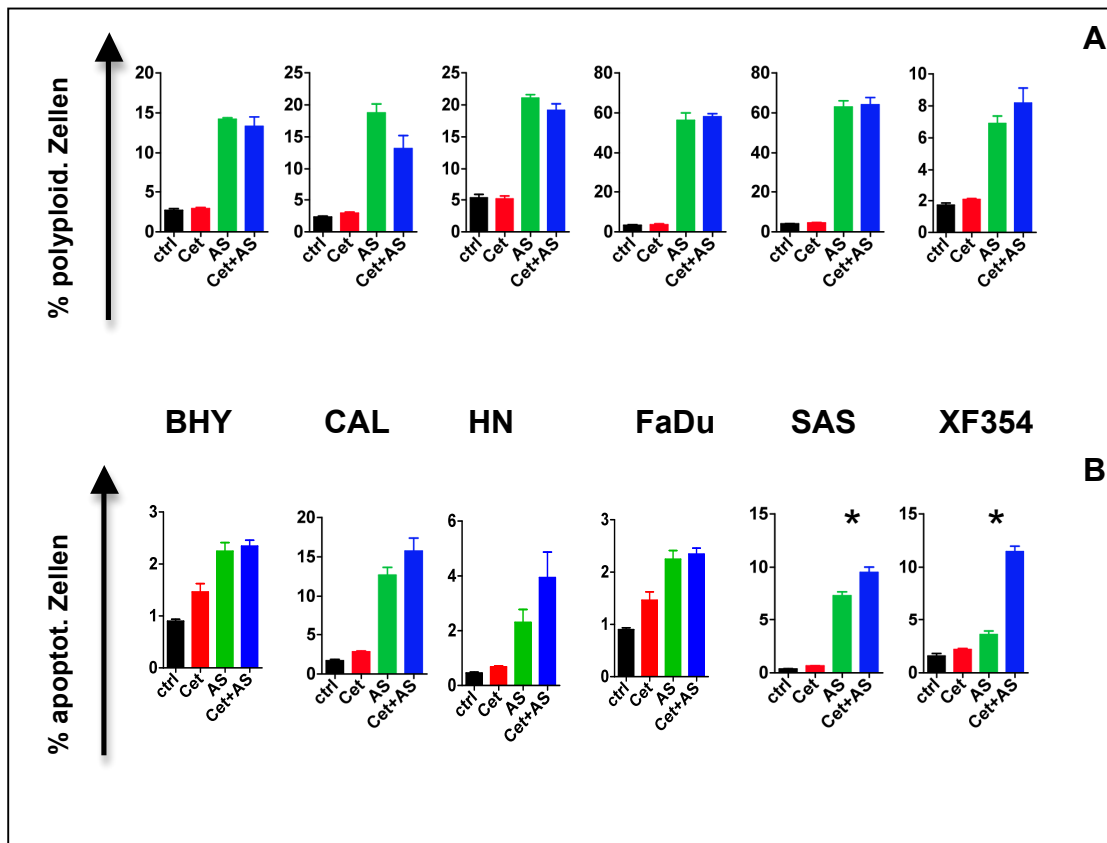


Abbildung 5-12: Darstellung der Effekte von Monotherapie mit Cetuximab und AS und der Kombinationstherapie auf den DNA- Gehalt und die Apoptose unter FACS. (A) Prozentualer Anteil der polyploiden Zellen in der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie. (B) Prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie. Bei SAS und XF354 führte die Kombinationsbehandlung zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Anzahl der apoptotischen Zellen.

Stellvertretend für alle Zelllinien wurden die Effekte der Kombinationstherapie auf die Zelllinie XF354 im Western Blot untersucht. Als Aktivitätsmarker diente für EGFR pErk und für die Aurora Kinasen S10-HH3. XF354 zeigte zuvor bei der Untersuchung des DNA- Gehalts und beim Apoptoseverhalten sogar eine signifikante Erhöhung unter der Kombinationstherapie.

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass EGFR sogar geringer unter der kombinierten Behandlung mit 5nM AS und 200nM Cetuximab, als unter der Monotherapie mit 200nM Cetuximab exprimiert wird. Die Aktivität kann im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sowohl durch 200nM Cetuximab als auch durch die Kombinationstherapie herabgesetzt werden. Insgesamt kann die Aktivität am besten durch die kombinierte Behandlung herabgesetzt werden. Durch die alleinige Behandlung mit dem Aurora Kinase Inhibitor konnte keine Aktivitätsminderung festgestellt werden, ebenso wenig durch 200nM Cetuximab.

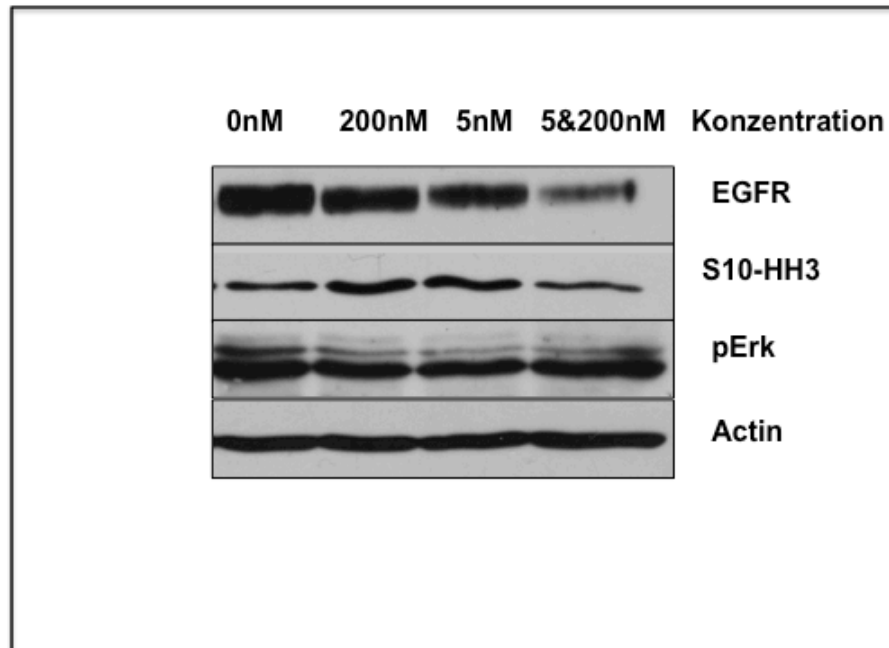


Abbildung 5-13: Aktivitätsminderung durch die Kombinationstherapie auf Proteinebene. Behandlung mit 0nM, 200nM Cetuximab, 5nM AS und der Kombination aus 200nM Cetuximab und 5nM AS nach 24h im Western Blot bei der Zelllinie XF354 zeigt die größte Aktivitätsminderung durch die Kombinationstherapie.

5.7 Unterschiede zwischen panAurora Kinase Inhibitoren und gezielter Inhibition von Aurora A Kinase

Die zuvor besprochenen Ergebnisse zeigten, dass die panAurora Kinase Inhibitoren sehr effektiv die Aktivität und das Wachstum bei den Plattenepithelkarzinom Zelllinien einschränken können und es vermehrt zu einer chromosomalen Instabilität in Form von polyploiden Zellen kommt. Daher stellt sich nun die Frage, ob ein Unterschied zwischen der selektiven und der gesamten Inhibition besteht beziehungsweise welcher Aurora Kinase Inhibitor effektiver ist.

MLN8237 ist ein selektiver Aurora A Kinase Inhibitor. Um die Effizienz dieses Inhibitors zu überprüfen wurden Untersuchungen zur Aktivität mit Hilfe von Western Blot, PI FACS zur Überprüfung des DNA- Gehalts und Wachstumskurven zur Bestimmung der Zellzahlen durchgeführt. *Abbildung 5-14A* zeigt eine repräsentative Darstellung der Abnahme der Kinaseaktivität nach ca. 30 Minuten. Nach 60 Minuten ist die Aktivität vollkommen aufgehoben. Unter der Behandlung des panAurora Kinase Inhibitors war nach 30min bereits keine Aktivität mehr nachweisbar (*Abb. 5-6*). Betrachtet man den DNA- Gehalt unter der selektiven Aurora Kinase Inhibition (*Abb. 5-14B*), so fällt eine deutliche Zunahme der polyploiden Zellen von 4% auf 7% auf. Hierbei wurde die Zelllinie FaDu mit 10nM MLN für 24 Stunden behandelt. Zur Darstellung der Abnahme der Zellzahl durch die kombinierte Behandlung mit 10nM MLN und 200nM Cetuximab wurden Wachstumskurven angefertigt. Die Zellzahl wurde jeweils nach fünf, zehn, 15 und 20 Tagen bestimmt. Bereits nach fünf Tagen kommt es zur Einschränkung des Wachstums. Somit konnte bestätigt werden, dass MLN, ebenso wie AS in der Kombinationsbehandlung mit Cetuximab, signifikant die Proliferation einschränkt.

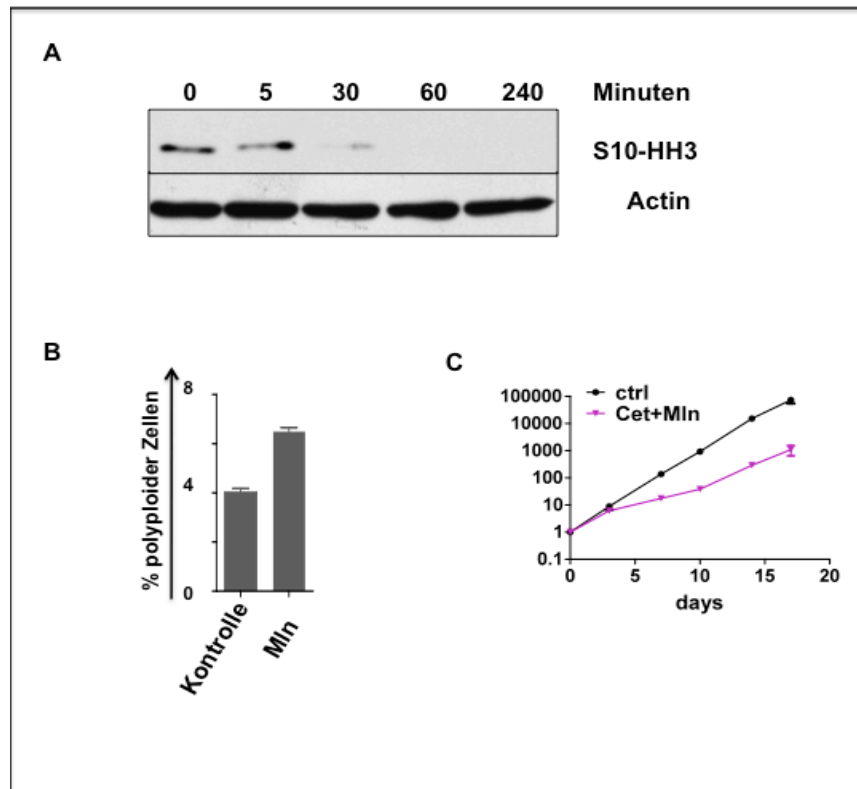


Abbildung 5-14: Selektive Inhibition mit dem Aurora A Kinase Inhibitor MLN. (A) Behandlung der Zelllinie FaDu mit 10nM MLN für die angegebenen Zeitpunkte. Die Inhibition der Aurka wurde durch eine representative Abbildung im Western Blot durch Abnahme von S10-HH3 dargestellt. (B) Nach 48 Stunden Behandlung mit MLN kam es zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der Anzahl der polyploiden Zellen im PI FACS ($>4n$ DNA- Gehalt). (C) Kombinierte Aurora A Inhibition mit 200nM Cetuximab führt zu einer signifikanten Einschränkung des Wachstums

Zum direkten Vergleich zwischen der selektiven Inhibition von Aurka und der vollständigen Inhibition von Aurka und Aurkb wurden das Apoptoseverhalten und der DNA- Gehalt mit Hilfe von PI FACS untersucht. Die Aurora Kinase Inhibitoren wurden mit Cetuximab kombiniert. Die Kombination aus dem Aurora Kinase Inhibitor AS und Cetuximab hat in den vorherigen Versuchen gezeigt, dass sie die effektivste Therapie zur Inhibition des Wachstums darstellt. Darüberhinaus konnte auch ein signifikanter Anstieg der Anzahl von apoptotischen Zellen in zwei Zelllinien und ebenfalls ein moderater Anstieg in den restlichen Zelllinien nachgewiesen werden. Nun stellte sich die Frage, ob die selektive Inhibition von Aurka ebenso effektiv ist wie die gesamte Aurora Kinase Inhibition. Wie in *Abbildung 5-15A-C* dargestellt wird, kann MLN ähnlich wie AS zu einer erhöhten Anzahl von polyploiden Zellen führen. Außerdem wird das Wachstum herabgesetzt in Kombination mit Cetuximab.

Bezüglich des DNA- Gehalts lässt sich ein signifikanter Anstieg der mehrkernigen Zellen in allen Zelllinien unter der Kombination von AS und Cetuximab beobachten. Kaum unterschied sich allerdings die Kombination von MLN und Cetuximab von den unbehandelten Kontrollzellen. Diese Behandlung führt somit wohl zu keiner chromosomalen Instabilität. Betrachtet man die Effekte auf die unterschiedlichen Zelllinien, so zeigt sich bei FaDu und SAS die mit Abstand höchste Anzahl der polyploiden Zellen mit über 60%. Ein mittlerer Anstieg war bei BHY und HN zu beobachten. Hier waren etwa 20% der Zellen polyploid unter der Kombinationstherapie mit Cetuximab und AS. CAL wies einen Anteil von etwa 15% Zellen mit erhöhtem DNA- Gehalt auf und der mit Abstand geringste Anteil ist bei XF354 mit ca. 9% nachweisbar.

Abbildung 5-15C zeigt den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie. Auch hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen durch die Kombination aus Cetuximab und AS im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und den mit MLN und Cetuximab behandelten Zellen. Im Unterschied zu dem DNA- Gehalt ist eine leichte Erhöhung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit Cetuximab und MLN zu beobachten. Diese ist aber weitaus niedriger als unter der Behandlung mit AS und Cetuximab. CAL weist den höchsten Anteil an apoptotischen Zellen mit über 15%

auf. XF354 hat einen Anteil von ca. 12% apoptotischen Zellen. Mittleren Anteil an apoptotischen Zellen besitzen mit ca. 6% BHY und SAS. Bei der Zelllinie FaDu konnte nur ein geringer Anteil von etwa 4% und der geringsten Anteil an Apoptose mit ungefähr 2,5% bei HN nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich anmerken, dass der panAurora Kinase Inhibitor AS effektiver in Kombination mit Cetuximab die Anzahl der apoptotischen Zellen und der polyploiden Zellen in allen Zelllinien erhöht als der selektive Aurka Inhibitor Mln mit Cetuximab. Das Tumorwachstum kann somit erfolgreicher eingeschränkt werden und es kommt zu einer vermehrten chromosomalen Instabilität mit erhöhtem DNA- Gehalt.

Mln wies in den vorangegangenen Versuchen zwar auch eine Einschränkung des Tumorwachstums, Verminderung der Kinaseaktivität und Anstieg der polyploiden Zellen auf, aber im direkten Vergleich im PI FACS war die Effektivität signifikant ($p < 0.05$) schlechter.

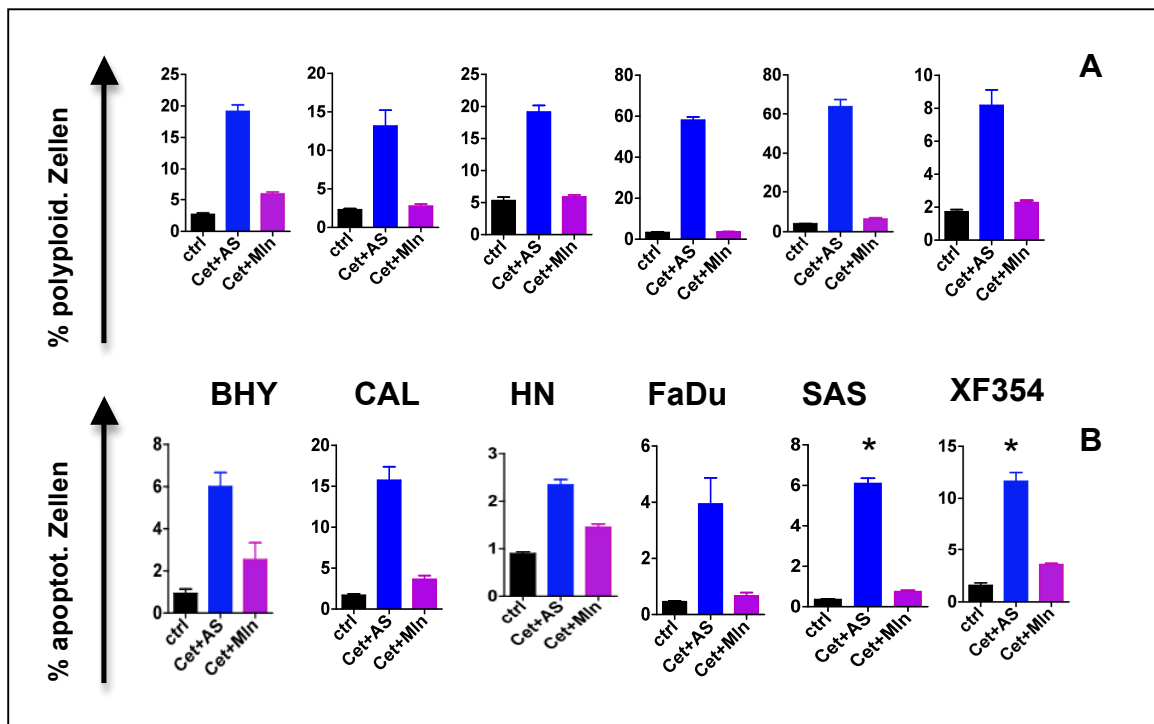


Abbildung 5-15: Vergleich der Effektivität der selektiven Aurka Inhibition mit der panAurora Inhibition in Kombination mit Cetuximab hinsichtlich des DNA- Gehalts und der Apoptose im PI FACS. (A) Darstellung des prozentualen Anteils der polyploiden Zellen 48h nach Behandlung mit Cetuximab und AS und der Behandlung von Cetuximab und MLN im PI FACS. (B) Darstellung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen 48h nach der kombinierten Behandlung mit Cetuximab und AS und Cetuximab und MLN.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bisher noch nicht etablierte Inhibition der Aurora Kinasen als neuer zielgerichteter Ansatzpunkt für die Tumorthherapie bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs identifiziert. Aurora Kinasen wurden in vielen Tumoren nachgewiesen und häufig konnte eine Überexpression festgestellt werden (Kollareddi et al. 2008). Reiter et al. beschrieben als Erste auch den Zusammenhang von Aurka und HNSCC. Viele verschiedene Aurora Kinase Inhibitoren konnten entwickelt werden und finden nun Anwendung in klinischen Studien. In Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs zeigte bislang, außer der Blockierung von EGFR durch Cetuximab, keine andere zielgerichtete Therapieoption klinischen Erfolg und der Therapiestandard für diese Erkrankung konnte noch nicht verändert, beziehungsweise optimiert werden. Die Säule der kurativen Therapie für oropharyngeale und fortgeschrittene Karzinome des Hypopharynx und Larynx ist die Bestrahlung. Systemische Chemotherapie ist zentraler Bestandteil bei der Behandlung von lokal fortgeschrittenen HNSCC. Darüberhinaus gibt es Überschneidungspunkte von Chemo- und Radiotherapie oder die Chemotherapie kann als Induktionstherapie vor der Bestrahlung durchgeführt werden. In sehr frühen Stadien (I-II) kann auch eine chirurgische Behandlung zum Einsatz kommen, die eine exzellente Prognose, aber auch eine hohe Rezidivrate aufweist (Hadad RI et al. 2008). Die größte Herausforderung in der Behandlung von HNSCC ist eine hohe Heilungsrate zu erzielen und dabei die vitalen Strukturen und Funktionen in dieser anatomisch komplexen Region des Kopf- Hals- Bereichs zu erhalten. Vielversprechend sind hierbei schonendere Verfahren, wie die zielgerichtete EGFR- Inhibition durch kleinmolekulare TKIs wie Gefitinib oder Erlotinib sowie durch monoklonalen Ak wie Cetuximab oder Panitumumab. Leider scheint bislang die Ansprechrate von Tyrosinkinase Inhibitoren und monoklonalen Ak auf eine kleine Patientengruppe beschränkt zu sein (Frederick BA et al. 2007). Daher besteht die dringende Notwendigkeit der weiteren Forschung, um weitere Marker zu entwickeln, die ein Ansprechen auf die zielgerichteten Therapeutika prognostizieren können. Bei Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten HNSCC konnte eine verlängerte Stabilisierung ihres Zustands durch die Behandlung mit Erlotinib erreicht werden (Soulieres D et al. 2004). Allerdings scheint die Zugabe von

dem TKI Gefetinib zur Chemotherapie keinen zusätzlichen therapeutischen Erfolg in fortgeschrittenen NSCLC zu erzielen. Zwei klinische Studien konnten sogar beweisen, dass weder die Zugabe von Gefetinib zu Cisplatin (INTACT1) noch zu Paclitaxel plus Carboplatin (INTACT2) das Gesamtüberleben oder den Tumorverlauf bei zuvor unbehandelten Patienten mit HNSCC verbessert (Giaccone G et al. 2004, Herbst SS et al. 2004). Somit liegt vermehrt die Hoffnung auf therapeutischen Erfolg durch die Behandlung mit Cetuximab.

Cetuximab ist bereits in präklinischen Studien in der Kombination mit Bestrahlung und mit Chemotherapie erprobt. In Xenograft Modellen kann durch Zugabe von Cetuximab zu einer first-line Chemotherapie eine Potenzierung der Antitumoraktivität in CRC, fortgeschrittenen NSCLC und rezidivierenden oder metastasierten HNSCC erreicht werden (Pirker R et al. 2009, Vermorken JB et al. 2008). Bei Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenen HNSCC unter Cetuximab und Bestrahlung kommt es zu einem verlängerten Gesamtüberleben (Bonner JA et al. 2009). Ebenso kann eine verbesserte Ansprechrate durch zusätzliche Gabe von Cetuximab bei Behandlung mit Cisplatin bei Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC nachgewiesen werden (Burtneß B et al. 2005).

Tumorzellen mit erhöhtem Aurora A- Level können die Zellzyklus- Kontrollpunkte, die durch Chemotherapeutika wie Paclitaxel (Taxol) aktiviert werden, überwinden. In dieser Situation gehen die Zellen trotz der defekten Mitosespindel- Anordnung in die Anaphase über und werden möglicherweise resistent gegenüber der Paclitaxel induzierten Apoptose (Anand S et al. 2003). EGFR Überexpression und erhöhte mRNA- Level von TGF- α in Tumoren sind meist mit einer verschlechterten Ansprechrate der Bestrahlung assoziiert und sind Vorboten für ein herabgesetztes krankheitsfreies Überleben (Grandis et al. 1993). Die Behandlung dieser Tumore stellt daher höchste Ansprüche an Forschung und Kliniker und muss fortwährend optimiert werden und ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge erreicht werden.

Darüber hinaus zeigte sich, dass in den hier untersuchten Zelllinien sowohl eine Expression von Aurora A, Aurora B Kinase und EGFR vorlag. Aus diesem Grund lag es nahe die Auswirkungen einer Kombinationstherapie näher zu beleuchten. Andere Arbeiten zeigten bereits, dass eine Interaktion zwischen Aurora A und EGFR besteht (Hung LY et al. 2007). Überexpression von Aurka und konstitutive Aktivierung von

EGFR führen zu chromosomaler Instabilität (Dutertre S et al. 2002). Transformierte Zellen mit überexprimiertem EGF bewirken durch nukleare Translokation von EGFR ein erhöhtes Transkriptionslevel von Aurora A. EGFR wird durch Phosphorylierung an Thr845 im Zellkern aktiviert und bindet an der Promotor Region von Aurora A. Da EGFR keine DNA- Bindungsdomäne besitzt wird STAT5 benötigt. STAT5 wirkt an der AT- reichen Region (ATR) des Promotors von Aurka und ermöglicht so deren Transkription. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass EGFR in der Lage ist, Aurora A zu regulieren und dessen Genexpression zu erhöhen. Der Zusammenhang zwischen Aurora Kinasen und EGFR in Tumoren wurde dementsprechend erbracht und sollte noch weiter verfolgt werden.

Die Anti- EGFR Tumorthherapie wirkt in vielen Tumoren, aber bei der Mehrzahl der Patienten kann kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Außerdem entwickeln Patienten, die ursprünglich auf die Anti- EGFR Tumorthherapie angesprochen haben, im Laufe der Behandlung eine Resistenz. Mögliche Mechanismen zur Resistenzentwicklung könnten bedingt sein durch die Aktivierung anderer Tyrosinkinase, die den EGFR- Signalweg umgehen, den nachgeordneten Signalweg von EGFR aktivieren oder zu EGFR- Genamplifikationen und Rezeptormutationen führen (Camp ER et al. 2005). Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, dass in unserer Versuchsreihe mit 200nM Cetuximab kaum ein Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen im PI FACS nachzuweisen war. Unter der Behandlung mit AS kam es zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen, und unter der Kombinationsbehandlung bei zwei Zelllinien sogar noch zu einem signifikant höheren Anteil als unter der Monotherapie. Möglich wäre daher, dass die Kombination von AS und Cetuximab Resistenzen durch bislang unbekannt molekulare Pathomechanismen überwinden kann.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Kombinationstherapie bei allen untersuchten Zelllinien die effektivste Inhibition der Proliferation erreichte. Noch interessanter jedoch war die Tatsache, dass sogar Zelllinien, die beispielsweise weniger sensibel gegenüber Cetuximab waren und bei denen keine signifikante Inhibition des Wachstums in der Einzelbehandlung erzielt werden konnte, diese Resistenz durch die Kombination mit Aurora Kinase Inhibitoren überwinden konnten. Diese Erkenntnis könnte auch für Tumore, die mutiert sind, hilfreich sein. Leider konnte in keiner der untersuchten Zelllinien die häufigste Mutation von EGFR, EGFRvIII, nachgewiesen

werden. Andere Gruppen kamen jedoch zu dem Erkenntnis, dass 40% der HNSCC die trunkierte, mutierte Form von EGFR exprimieren, wodurch dieser Mutation ein erheblicher Stellenwert bemessen wird (Sok JC et al. 2006). Folglich wäre der Effekt der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Cetuximab bei vIII ein lohnenswerter neuer Ansatzpunkt. Ursprünglich wurde angenommen, dass aufgrund der Deletion in den Exons 2 bis 7, die die ligandenbindungs Domäne und die Cetuximab Bindungsstelle beinhalten, EGFRvIII weniger sensibel gegenüber von Cetuximab ist. In NSCLC konnte jedoch gezeigt werden, dass Cetuximab EGFR- Level herabsetzen und das Wachstum von EGFRvIII Zellen in vitro und vivo hemmen kann. EGFRvIII scheint auch in der Lage zu sein Cetuximab zu binden und so eine fast vollständige TK Phosphorylierung und Rezeptor/Antikörper Komplexbildung zu erzielen (Doody JF et al. 2007, Steiner P et al. 2007). Dementsprechend interessant wäre es zu wissen, wie sich die Kombinationstherapie in HNSCC auf die Mutation auswirkt.

Von weiterhin großem Interesse ist die Beteiligung des Zellzykluses an der Tumorentstehung. Der Zellzyklus wird von Cyclin abhängigen Kinasen (CdK), deren nachgeordneten Substraten, den CdK Inhibitoren, und den Tumorsuppressorproteinen p53 und Rb reguliert. Diese Proteine helfen bei der Regulierung des Zellzyklusverlaufs vom G1 Kontrollpunkt zur S- Phase. Die meisten Tumore weisen numerische chromosomale Aberrationen oder Aneuploidie auf. Diese sind durch Defekte bei der Teilung der Chromosomen während der G2/M- Phase entstanden. Erstaunlich ist dennoch, dass es scheinbar keinen Nachweis für die Beteiligung an der Tumorentstehung von G2/M- Regulatorproteinen gibt (Katayama H et al. 2003). Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Tumorthherapie mit Aurora Kinase Inhibitoren zu einem G2/M- Arrest führen kann. Dieser Ansatzpunkt ist von erheblicher Relevanz, da die gegenwärtige konventionelle Chemotherapie am G1/S- Kontrollpunkt des Zellzyklus' angreift. Folglich sollte die Rolle des G2/M- Übergangs in der Tumorentstehung noch besser verfolgt werden.

Ebenso ist zu beachten, dass bei der Therapie größte Rücksicht auf den Allgemeinzustand des zu behandelnden Patienten genommen wird und inwieweit dieser in der Lage wäre eine besonders aggressive Therapie zu tolerieren. Weiterhin muss auch berücksichtigt werden, dass es zu lokalen Rezidiven und Fernmetastasierung kom-

men kann und eine interdisziplinäre Behandlung von großem Interesse ist (Hadad RI et al. 2008). Ein weiterer Punkt der zielgerichteten Tumorthherapie stellt die Entwicklung von kleinstmöglichen wirksamen Dosierungen der Therapeutika dar. In unserem Fall haben wir uns grundsätzlich an bereits beschriebene Dosierungen gehalten und diese weiter entwickelt. McLaughlin et al. beschrieben, dass der panAurora Kinase Inhibitor AS schon bei geringen Konzentrationen die Aktivität von Aurora B einschränkt (14nM AS), aber deutlich höhere Konzentrationen für die Inhibition von Aurora A notwendig sind (100nM AS). Wir konnten nachweisen, dass bereits 5nM ausreichend sind um die Aktivität von beiden Aurora Kinasen zu inhibieren. In der Zellzyklusanalyse musste diese Dosierung aber leicht erhöht werden. In der Kombination könnte darüber hinaus sogar eine noch geringere Dosierung etabliert werden. Cetuximab zeigte in den Wachstumskurven eine deutliche Inhibition der Proliferation bei bereits 200nM. Eine zusätzliche Verbesserung des Effekts konnte durch die deutlich höhere Konzentration von 400nM auch nicht erzielt werden.

Erstaunlicherweise erwies sich die Kombinationstherapie mit Aurora Kinase Inhibitoren und Cetuximab als die effektivste Behandlungsform zur Inhibition der Proliferation. Weiterhin war die Kombination auch in Bezug auf die Anzahl apoptotischer Zellen immerhin in zwei Fällen signifikant höher als unter alleiniger Behandlung mit AS. In den restlichen Zelllinien war sie in etwa genauso effektiv wie mit AS. Im direkten Vergleich von panAurora Kinase Inhibitor mit selektivem Aurora Kinase Inhibitor in der Kombination mit Cetuximab war der panAurora Kinase Inhibitor deutlich überlegen. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob die Inhibition von Aurora B alleine ausreicht, oder ob nur die gemeinsame Hemmung von Aurora A und B Ziel führend ist. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die gemeinsame Inhibition von Aurora A und B im Vergleich zur alleinigen Inhibition von Aurora A effektiver ist. AS ist vor allem ein potenter Inhibitor der Aurkb und weniger wirksam bei der Inhibition von der Aurka. Die Behandlung mit dem selektiven Aurkb Inhibitor AZD konnte in Mammakarzinomzellen Aneuploidie, Polyploidie und verschiedene andere chromosomale Instabilitäten hervorrufen (Gully CP et al. 2010). Ebenfalls kam es zu einer vermehrten Anzahl von apoptotischen Zellen in den Mammakarzinom Zelllinien, wobei dies zuvor schon in Leukämien, Multiplen Myelomen und CRC nachgewiesen wurde (Yang J et al. 2007, Wilkinson RW et al. 2007 und Evans RP et al. 2008). Dem gegenüber steht, dass Aurora A Überexpression in vielen Tumoren nachgewiesen werden konnte (Marumo-

to T et al. 2005). Hata et al. zeigten, dass ein vorübergehender knockdown von AURKA zu einer Einschränkung des Wachstums und der Koloniebildung von Panke-raskarzinomzelllinien in- vivo und in- vitro führte. Darüber hinaus kam es durch den knockdown zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M- Phase und letztendlich zur Apoptose. Manfredi et al. untermauerten die Effektivität des selektiven Aurka In- hibitors MLN. Die Behandlung mit MLN führte in Tumorzellen zur Inhibition des akti- vierenden pT288, zu Spindeldefekten, zur G2/M- Akkumulation und Zelltod durch Apoptose. Die Wirksamkeit der Aurora A Kinase Inhibition wurde allerdings schon oft in Frage gestellt, allein schon deshalb, weil die meisten Aurora Kinase Inhibitoren vermehrt Aurora B inhibieren. Belegt wird diese Feststellung dadurch, dass alle be- kannten Aurora Kinase Inhibitoren stark pHH3 in Ser-10 inhibieren, unabhängig von ihrer Selektivität für eine Aurora Kinase oder beide (Manfredi MG et al. 2007). Keen und Taylor beispielsweise kamen zu dem Schluss, dass die Inhibition von Aurka zu abnormen Mitosespindeln oft in Kombination mit ungeteilten Zentrosomen führt. Da- bei kam es zu einer Verzögerung des Mitoseverlaufs und die Phosphorylierung des Aurora A Substrats TACC3 wurde reduziert, aber dennoch formierten sich die Zellen an bipolaren Spindeln und teilten sich, wenn auch mit Teilungsfehlern. Unsere Er- gebnisse konnten diese Feststellungen bestätigen. Die Aurora B Kinase Inhibition scheint effektiver zu sein, insbesondere in Kombination mit Cetuximab. Fraglich je- doch bleibt, ob Aurora B ein besserer Angriffspunkt für die zielgerichtete Tumorthе- rapie ist, oder ob nur eine panAurora Kinase Inhibition erfolgreich ist. Außerdem gilt es die Ergebnisse von Gully et al. auch in Bezug auf HNSCC zu verfolgen.

Der limitierende Faktor der Aurora Kinase Inhibitoren ist vor allem das erhebliche Nebenwirkungsprofil. Insbesondere die starke Neutropenie führt häufig zum Schei- tern des Therapieversuchs mit Aurora Kinase Inhibitoren.

Da die Entstehung von HNSCC auch im Zusammenhang mit HPV steht, muss dieser Aspekt auch noch näher beleuchtet werden. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die Infektion mit HPV die Entstehung aller Zervixkarzinome verursacht. HPV- DNA wurde schon mehrfach in Kopf- Hals- Tumoren nachgewiesen, die Rolle bei der Ätiologie blieb aber unklar (Paz IB et al. 1997, Haraf DJ et al. 1996). Inzwischen gibt es auch molekulare Beweise, dass HPV, vornehmlich HPV-16, an der Entstehung von

HNSCC beteiligt ist und die Onkogene E6 und E7 häufig überexprimiert sind (Gillison ML et al. 2000). Obwohl HPV- DNA nur in etwa 25% aller HNSCC detektiert wurde, zeigen mehr als 50% aller oropharyngealen Tumore eine Integration des viralen Genoms in den Zellkern der Tumorzellen. Bedingt durch diese Infektion ist eine neue, jüngere Patientengruppe, die meist nicht die typische Anamnese von Alkohol- und/oder Tabakmissbrauch aufweist, betroffen. In unseren Versuchen haben wir HPV gänzlich ausgeklammert und uns nur auf die gemeinsame Beteiligung von Aurora Kinasen und EGFR an der Tumorentstehung konzentriert. HPV assoziierte HNSCC haben generell eine bessere Prognose und diese Tumore weisen eine höhere Sensibilität gegenüber Chemo- und Radiotherapie auf (Fakhry C et al. 2008). Der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen EGFR und HPV wurde bereits an anderer Stelle erbracht. Die Studie belegte, dass HPV- E5 Expression zu einer erhöhten EGFR Expression in- vitro führte (Crusius K et al. 1998). Unsere Erkenntnisse bezüglich der kombinierten Behandlung mit Cetuximab und AS müssten dementsprechend auch an HPV positiven HNSCC getestet werden. Eventuell könnte dann durch die Veränderung der EGFR Expression auch eine Veränderung des HPV- Expressionslevels erreicht werden. Ebenso interessant wäre auch eine Überprüfung der Effekte der HPV Behandlung auf die Tumorentstehung. Neben der Impfung gegen den humanen Papillomavirus gibt es Inhibitoren, die die Progression des Virus' im Zellzyklus verhindern. Aufgrund der Beschränkung der Wirksamkeit der Impfung auf HPV-16/18, stellen die neuen Inhibitoren einen interessanten Ansatzpunkt dar. In der Tat sind ca. 30% der Cervixkarzinome, die durch HPV verursacht wurden nicht durch die Impfung zu erreichen (Wheeler CM et al. 2010). Die Hoffnung bei der Entwicklung dieser Inhibitoren liegt hauptsächlich darin, dass ein panHPV Inhibitor identifiziert werden kann, der bei jedem existierenden Virus wirksam ist.

Einige Studien konnten auch belegen, dass es zu einem verbesserten Gesamtüberleben unter der Behandlung mit EGFR- Antikörpern kommt. In der Cetuximab- Gruppe der Versuchsreihe kam es zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens, des progressionsfreien Überlebens und der Ansprechrate (Rivera F et al. 2009). Unter Therapie mit dem Aurora Kinase Inhibitor MLN kam es in Nacktmäusen mit kolorektalem Tumor und Prostatakarzinom zur Tumorrückbildung bei einer Rate von 10-30mg/kg BID (Manfredi MG et al. 2007). Dies gilt auch weiter zu untersuchen. In unseren Versuchen konzentrierten wir uns auf Parameter, die in Zelllinien nachweisbar

sind, wie Apoptose, Wachstum oder DNA- Gehalt. In in- vivo Versuchen sollte dann aber auch die Wirksamkeit der Kombinationstherapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens getestet werden.

Wie schon in einigen Studien gezeigt wurde, ist die Kinaseaktivität notwendig um Zellen zu verändern oder Metastasierung hervorzurufen (Anand S et al. 2003). Für die Persistenz von Tumoren ist somit entscheidend, dass sich die Aurora Kinasen in ihrem aktiven Zustand befinden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien sowohl Aurora A als auch Aurora B Kinaseaktivität im Western Blot nachweisbar war. Werden die Zellen mit den Aurora Kinase Inhibitoren AS und Mln behandelt, so kommt es bereits nach fünf Minuten zu einer Abnahme der Aktivität. Ein entscheidender, zur Tumorentstehung beitragender Faktor kann daher ausgeschaltet werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von EGFR durch die Behandlung von Cetuximab im Western Blot nach fünf Minuten abnimmt. Eine Fehlregulation der ErbB/HER Signalwege, hervorgerufen durch Überexpression oder Aktivierung, kann Tumorprozesse wie Angiogeneese und Metastasierung aktivieren und ist mit einer schlechten Prognose in vielen menschlichen Tumoren assoziiert (Salomon DS et al. 1995, Hemming AW et al. 1992). Ebenfalls scheint die dauerhafte Aktivierung von EGFR eine Rolle bei chromosomaler Instabilität zu spielen (Ma PC et al. 2006, Tomida S et al. 2005). Aktivierung des zytoplasmatischen Signalwegs von EGFR führt zu Tumorentstehung, Metastasierung, erhöhtem Wachstum und Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung. In manchen Fällen wird der membranständige EGF- Rezeptor durch Stimulation mit Liganden in den Zellkern transloziert und nach der Translokation interagiert der nukleare EGFR mit anderen Transkriptionsfaktoren, die DNA binden und die Genexpression aktivieren können (Lo HW et al. 2006). Weiterhin sollte überprüft werden wie sich die kombinierte Behandlung mit AS und Cetuximab auf die Aktivität der Aurora Kinasen und EGFR auswirkt. In der Zelllinie XF354 konnten wir nachweisen, dass die Kombinationstherapie am effektivsten die Aurorakinaseaktivität einschränkt, die EGF- Rezeptorzahl im Vergleich mehr abnimmt und die EGFR- Aktivität genauso vermindert ist wie unter Cetuximab. Die Rolle der Aktivität ist demnach ein interessanter Aspekt in Bezug auf die Tumorentstehung im Kopf- Hals- Bereich und es müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Effektivität der Kombinationstherapie diesbezüglich zu erläutern.

Ebenso konnte unter der Behandlung mit Aurora Kinase Inhibitoren eine erhöhte Anzahl polyploider Epithelzellen *in-vitro* nachgewiesen werden (Ditchfield C et al. 2002). Unsere Zellzyklusanalyse der sechs Zelllinien zeigte, dass die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von AS (25nM, 100nM) über 24 Stunden zu einem G2/M- Arrest führte. Ein weiteres Fortschreiten der Mitose konnte somit nicht mehr gewährleistet werden, was zum programmierten Zelltod der Tumorzelle führte. Im PI Facs wurde unter der Behandlung mit AS und Cetuximab sogar ein signifikanter Zuwachs an polyploiden Zellen beobachtet. Zellen, die nur mit AS behandelt wurden, wiesen einen fast identischen prozentualen Anteil polyploider Zellen auf. Polyploidie ist ein Faktor, der entweder zur Tumorentstehung beiträgt oder durch die Kontrollpunkte erkannt wird und diese Zellen können dann aussortiert werden. Die Zellen werden dann apoptotisch. Wenn die aktive Kinase überexprimiert ist, werden die Zellen unsterblich. Liegt die Kinase allerdings im inaktiven Zustand vor so geht sie zur Apoptose über (Tatsuka M et al. 1998). Das Überleben der Zellen hängt somit auch stark von den mitotischen Kontrollpunkten ab. Polyploidie kann zum einen durch Überexpression der aktiven Aurora A und B Kinase und zum anderen durch deren Inaktivität entstehen. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch die Überexpression der aktiven Kinase diese als ein dominanter negativer Mutant wirkt und somit andere Aurora Kinasen inhibiert. Die überexprimierte Aurora A Kinase kann beispielsweise als eine dominante negative Form der Aurora B Kinase fungieren und den Zellzyklus inhibieren (Giet R und Prigent C 1999).

Die abnorme Anordnung der Mitosespindel ruft eine Aktivierung der Spindel- Kontrollpunkte hervor, wodurch es zum Abbruch der Mitose ohne vollständige Zellteilung kommt. Es entstehen tetraploide Zellen mit 4N DNA- Gehalt und zwei Zentrosomen. In normalen Zellen kontrolliert der p53- Rb Signalweg den postmitotischen G1- Kontrollpunkt, der den G1- Arrest bei tetraploiden Zellen induziert. Als Konsequenz dessen würden die meisten Zellen durch Apoptose terminiert. Wenn Aurora A jedoch überexprimiert in p53-/- Zellen vorliegt, in denen es durch das Fehlen von p53 keinen funktionsfähigen postmitotischen G1- Kontrollpunkt gibt, dann können die neugebildeten tetraploiden Zellen weiter den Zellzyklus durchlaufen mit DNA- Replikation und Zellteilung. Da die Zellen durch das Fehlen von p53 die Hyperploidie nicht erkennen können, kommt es zur Aneuploidie und abnormer Zentrosomenzahl (Meraldi P et al. 2002, Goepfert TM et al. 2002). Fraglich ist hierbei auch, ob die Apoptose nach Auro-

ra Kinase Inhibition abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von p53 ist (Gizatullin F et al. 2006). Der Grad der Endoreduplikation und die Lebensfähigkeit von Zellen, die mit Aurora Kinase Inhibitoren behandelt wurden, sind abhängig von der Integrität des postmitotischen Kontrollpunkts.

Auch wenn die meisten Therapien anhand eines bestimmten Tumors getestet werden, so sollten diese in der Theorie in jedem Tumor wirken, der über diesen Signalweg gesteuert wird. Bei unseren Versuchen arbeiteten wir nur mit HNSCC, um den zeitlichen und experimentellen Rahmen einzugrenzen. Dennoch findet Cetuximab in vielen Tumoren Anwendung und auch Aurora Kinase Inhibitoren wurden bereits in anderen Einsatzgebieten getestet. Ebenfalls ist der Gedanke an eine kombinierte Behandlung bei Tumoren kein Novum. Cetuximab wurde beispielsweise schon mit Radiatio oder Chemotherapie kombiniert. Aurora Kinase Inhibitoren fanden Anwendung in Kombination mit Chemotherapie. Dennoch konnte bislang nicht die perfekte Therapie entwickelt werden und es gilt weiterhin daran zu arbeiten eine Verbesserung des Therapieregimes zu erzielen. Die Kombinationstherapie sollte demnach auch in anderen, Aurora Kinase und EGFR exprimierenden Tumoren, erprobt werden.

Es ist denkbar, dass in der Zukunft die Tumore nur noch anhand von biologischen Markern behandelt werden. Diese könnten dann zusätzlich nach Mutation, Genexpression oder anhand von Proteinleveln und Funktion charakterisiert werden. Es ist daher von höchster Priorität, möglichst viele Daten zu generieren, um eine bessere, auf diese Merkmale ausgerichtete Behandlung zu ermöglichen. Nebenwirkungen, die durch Chemo- oder Radiotherapie entstehen, könnten ausgeschaltet werden, weil die Therapeutika nur die Tumorzellen schädigen und nicht angrenzende Gewebe oder Gewebe mit ähnlichen Merkmalen. Die meisten Medikamente, die in der Tumortherapie eingesetzt werden, greifen insbesondere sich teilende Zellen an. Unkontrollierte Zellteilung ist eine wichtige Eigenschaft von Tumorzellen. Der Erfolg von Vinca-Alkaloiden und Taxanen hat bewiesen, dass die Mitose eine vulnerable Zellzyklusphase im Tumorwachstum darstellt. Diese Zytostatika unterbrechen die Dynamik der Mikrotubuli durch die Quervernetzung der Tubuli oder durch Unterbrechung der Polymerisation von Tubulin und aktivieren den mitotischen Kontrollpunkt, was zu massiver Apoptose führt (Zhou J und Giannakakou P 2005). Leider führt der Angriff an den

Mikrotubuli auch zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen wie unter anderem Mukositis, Neuropathien oder zu kardiovaskulären Beschwerden. Demnach wäre es wünschenswert durch Kombination der molekularen Agenten dieses Nebenwirkungsprofil weiter zu reduzieren, aber dennoch die Wirksamkeit maximal zu nutzen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zielgerichtete Tumorthherapie eine neue, hoffungsvolle Möglichkeit darstellt, die noch lange nicht ausreichend erforscht ist. Wir haben einen neuen Ansatzpunkt bei der Behandlung von HNSCC identifiziert und gleichzeitig auch modifiziert. Aurora Kinase Inhibitoren fanden bislang keinen Einsatz bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich. Cetuximab ist in der Behandlung, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Radiatio oder Chemotherapie erprobt. Eine Kombination mit Aurora Kinase Inhibitoren stellt allerdings eine Neuerung dar. Aufgrund unserer erhobenen Daten ist davon auszugehen, dass die Kombination Resistenzen überwinden kann. Diese Erkenntnis könnte auch für die Behandlung der EGFRvIII Mutation hilfreich sein. Ebenfalls konnten wir nachweisen, dass die panAurora Kinase Inhibition effektiver ist als die selektive Inhibition von Aurora A. Es konnte allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden, dass für die Inhibition die selektive Inhibition von Aurora B Kinase ausreicht. Andere molekulare Faktoren sollten weiterhin untersucht werden, wie beispielsweise die Rolle von HPV und p53 bei der Entstehung von HNSCC. Unsere erhobenen Daten müssen nun auch in in- vivo Versuchen verifiziert werden. Dabei sollte auch ein Augenmerk auf die Auswirkung von der Kombinationstherapie auf das Gesamtüberleben geworfen werden. Darüberhinaus müssen auch Nebenwirkungen der Tumorthherapie berücksichtigt werden und inwieweit es sinnvoll wäre andere Kombinationen von zielgerichteten Therapeutika zu wählen. Die Anwendung unserer Kombinationstherapie könnte auch auf andere Tumore, die ähnliche Expressionsmuster aufweisen, ausgeweitet werden.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 3-1	T-Klassifikation von Lippen, Mundhöhlen- und Oropharynxmalignomen.....	10
Abbildung 3-2	Schematische Darstellung der Substrate von Aurora A Kinase.....	15
Abbildung 3-3	Schematische Darstellung der Substrate von Aurora B Kinase sowie deren Wirkungszeitpunkte.....	18
Abbildung 3-4	Schematische Darstellung des EGFR Signalwegs.....	20
Abbildung 5-1	Vergleich der Genexpressionslevel Aurora-A und EGFR von Kontrollgeweben (K), Tumorgewebe von Überlebenden (Ü) und Tumorgewebe von verstorbenen Patienten (T).....	46
Abbildung 5-2	EGFR und Aurora A Expression in Tumorgewebe und dem angrenzenden Mukosagewebe.....	47
Abbildung 5-3	Koexpression von EGFR und Aurora A Kinase hat eine schlechtere Prognose als die alleinige Expression jeweils von Aurka oder EGFR.....	49
Abbildung 5-4	Nachweis der Expression von Aurora Kinasen und EGFR in sechs Plattenepithelkarzinom Zelllinien des Kopf- Hals- Bereichs.....	52
Abbildung 5-5	Nachweis der Aurora A und B Kinaseaktivität.....	54
Abbildung 5-6	Darstellung der Vitalitätsabnahme unter verschiedenen Konzentrationen und Zeitpunkten unter dem panAurora	

	Kinase Inhibitor AS im MTT- Assay	57
Abbildung 5-7	PanAurora Kinase Inhibition mit AS führt zum Zellzyklusarrest im FACS.....	59
Abbildung 5-8	Abnahme der Aurora B Kinaseaktivität unter dem panAurora Kinase Inhibitor AS.....	60
Abbildung 5-9	Proliferationsmessung unter Inhibition mit 200nM und 400nM Cetuximab	62
Abbildung 5-10	Veränderung der EGFR- Aktivität durch Inhibition mit 200nM Cetuximab.....	63
Abbildung 5-11	Die Kombinationstherapie von EGFR Antikörper und Aurora Kinase Inhibitor führt zu stärkerer Hemmung der Proliferation und vermehrter Apoptose im Vergleich zur Monotherapie.....	67
Abbildung 5-12	Darstellung der Effekte von Monotherapie mit Cetuximab und AS und der Kombinationstherapie auf den DNA- Gehalt und die Apoptose unter FACS.....	71
Abbildung 5-13	Aktivitätsminderung durch die Kombinationstherapie auf Proteinebene.....	72
Abbildung 5-14	Selektive Inhibition mit dem Aurora A Kinase Inhibitor Mln.....	74
Abbildung 5-15	Vergleich der Effektivität der selektiven Aurka- Inhibition mit der panAurora- Inhibition in Kombination mit Cetuximab hinsichtlich des DNA- Gehalts und der Apoptose im PI FACS.....	76

8 Literaturverzeichnis

Agnese V, Bazan V, Fiorentino FP, Fanale D, Badalamenti G, Colucci G, Adamo V, Santini D und Russo A: The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy, European Society of Medical Oncology 2007, 18: 47-52

Anand S, Penrhyn- Lowe S, Venkitaraman AR: Aurora-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol, Cancer Cell 2003, 3:51-62

Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR: Mitotic mechanics: the auroras come into view, Cell Biology 2003, 15:672-683

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CSM, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD: A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, EMBO J 1998, 17, 3052-3065

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur Ranjan K, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapie plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab- induced rash and survival, Lancet Oncology 2009, 11:21-28

Bozec A, Gros F-X, Penault- Llorca F, Formento P, Cayre A, Dental C, Etienne-Grimaldi M-C, Fischel J-L, Milano G: Vertical VEGF targeting: A combination of ligand blockade with receptor tyrosine kinase inhibition, Eur. J. Cancer 2008, 13:1922-1930

Burtneß B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA: Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study, J Clin Oncol 2005, 23:8646-8654

Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM: Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor, Clin Cancer Res 2005, 11:397-405

Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK: Aurora Kinases: New Targets for Cancer Therapy, Clin Cancer Res 2006, 12:6869-6875

Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella- Garcia M, Parker J, Parker N, Jarett c, Carter J, Murphy BA, Netteville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR: Increased Epidermal Growth Factor Receptor

gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas, *J Clin Oncol* 2006, 19:358-365

Copper MP, Jovanic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck, *Arch Otolaryngeal Head Neck Surg* 1995, 121:157-160

Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P: Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases, *Mol Cell Biol* 2002, 22:874-85

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A: The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT, *Exp Cell Res* 1998, 241: 76-83

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML: Case control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer, *New Engl J Med* 2007, 356:1944-56

Dewar H, Tanaka K, Nasmym K, Tanaka TU: Tension between two kinetochores suffices for their biorientation on the mitotic spindle, *Nature* 2004, 428:93-7

Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS: Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores, *J Cell Biol* 2003, 161:267-80

Doody JF, Wang Y, Patel SN, Joynes C, Lee SP, Gerlak J, Rosler RL, Li Y, Steiner P, Bassi R, Hicklin DJ, Hadari YR: Inhibitory activity of cetuximab on epidermal growth factor receptor mutations in non small cell lung cancers, *Mol Cancer Ther* 2007, 6:2642-2651

Evans RP, Naber C, Steffler T, Checkland T, Maxwell CA, Keats JJ, Belch AR, Pilski LM, Lai R, Reiman T: The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 is a potential new treatment for multiple myeloma, *Br J Haematol* 2008, 140:295-302

Fakhry C, Westra WH, Li S: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial, *J Natl Cancer Inst.* 2008, 100:261-269

Farrugio DC, Townsley FM, Ruderman J: Cdc20 associates with the kinase aurora/Aik, *Proc Nat Acad Sci USA* 1999, 96:7306-7311

Forastiere A, Maor M, Weber RS, Pajak T, Glisson B, Trotti A, Ridge J, Ensley J, Chao C, Cooper J: Long-term results of Intergroup RTOG 91-11: A phase III trial to preserve the larynx—Induction cisplatin/5-FU and radiation therapy versus concurrent cisplatin and radiation therapy versus radiation therapy, Paper presented at : ASCO Atlanta, GA 2006

Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C: Roles of aurora kinases in mitosis and tumorigenesis, *Mol Cancer Res* 2007, 5:1-10

Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, Wong AJ, Testa JR, Bigner DD, Weiner LM: Expression of mutated epidermal growth factor by non- small cell lung carcinomas, *Cancer Res* 1993, 53:3217-20

Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Gandara DR: Aurora kinases as Anticancer Drug Targets, *Clinical Cancer Research* 2008, 14:1639-1648

Ge H, Gong X, Tang CK: Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis, *Int J Cancer* 2002, 98:357-61

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemaier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johanson DH: Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non- small- cell lung cancer: a phase III trial – IN-TACT 1, *J Clin Oncol* 2004, 22:777-784

Giet R und Prigent C: Aurora/lp11p- related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine- threonine kinases, *Journal of Cell Science* 1999, 112:3591-3601

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D: Evidence for a casual association between human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol* 2000, 92:709-20

Gizatullin F, Yao Y, Kung V, Harding MW, Loda M, Shapiro GI: The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function, *Cancer Res* 2006, 66:7668-7677

Goepfert TM, Adigun YE, Zhong L, Gay J, Medina D, Brinkley WR: Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis, *Cancer Res* 2002, 62:4115-4122

Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H: Molecular targeted therapies in head and neck cancer- An update of recent developments, *Head&Neck Oncology* 2010, 2:8

Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinsträsser HH: HPV & head and neck cancer: a descriptive update, *Head Neck Oncol* 2009, 1:36

Grandis JR, Tweardy DJ: Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer, *Cancer Res* 1993, 53:3579-3584

Gruneberg U, Neef R, Honda R, Nigg EA, Barr FA: Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2, *The Journal of Cell Biology* 2004, 166(2): 167-72

Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeung JA, Velequez-Torres G, Wang E, Jim Yeung SC, Lee MH: Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer, *Mol Cancer* 2010, 9:42

Hadad RI, Dang MS: Recent Advances in Head and Neck Cancer, *The New England Journal of Medicine* 2008, 359:1143-1154

Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR: Human papillomavirus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival, *Clin Cancer Res* 1996; 2:755-62

Hata T, Furukawa T, Sunamura M, Egawa S, Motoi F, Ohmura N, Marumoto T, Saya H, Horii A: RNA interference targeting aurora kinase A suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells, *Cancer Res* 2005, 65:2899-2905

Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G: Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res* 2005, 11(23):8288-8294

Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, LeRiche J: Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67, *J Surg Oncol* 1992, 51:147-152

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johanson DH: Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 2, *J Clin Oncol* 2004, 22:785-794

Hirsch- Kauffmann M, Schweiger M: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Thieme Verlag 1996, Seite 59-70

Hoang T, Huang S, Armstrong E, Eickhoff JC, Harari PM: Augmentation of radiation response with the vascular targeting agent ZD6126, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006, 5:1458-1465

Hoar K, Chakravarty A, Rabino C, Wysong D, Bowman D, Roy N, Ecsedy JA: MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy, *Mol and Cell Biology* 2007, 27:4513-4525

Hoellein A, Pickhard A, von Keitz F, Schoeffmann S, Piontek G, Rudelius M, Baumgart A, Wagenpfeil S, Peschel C, Dechow T, Bier H, Keller U: Combined Targeting

overcomes cetuximab resistance of Squamous Cell Carcinoma of the head and neck, *Oncotarget* 2011, 2(8):599-609

Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K und Urano U: Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase- promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway, *Oncogene* 2000, 19: 2812-2819

Hunag SM, Bock JM, Harari PM: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer Res.* 1999, 8:1935-1940

Hung LY, Joseph T, Tseng, Yi- Chao Lee, Weiya Xia, Ying-Nai Wang, Min-Li Wu, Yu-Hsuan Chuang, Chein- Hsien Lai, Wen-Chang Chang: Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcriptions 5(STAT5) in activating Aurora-A gene expression, *Nucleic Acids Research* 2008, 36(13):4337-4351

Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, Tatsuka M: Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras- mediated cell transformation, *Oncogene* 2005, 24(49):7266-72

Katayama H, Brinkley WR, Sen S: The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis, *Cancer and Metastasis Rev* 2003, 22:451-464

Keen N, Taylor S: Mitotic drivers-inhibitors of the Aurora B Kinase, *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28:185-95

Kim ES, Khuri FR, Herbst RS: Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225), *Curr Opin Oncol* 2001, 13:506-13

Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y: Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lp1-related protein kinase, AIK3, *J Biol Chem* 1999, 274:7334-40

Kimura M, Uchida C, Takano Y, Kitagawa M, Okano Y: Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 316(3):930-6

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y: Biochemical and clinical implications of the Erb/HER signaling network of growth factor receptors, *Adv Cancer Res* 2000, 77:25-79

Kojima K, Konopleva M, Tsao T, Nakakuma H, Andreeff M: Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora kinases activates the p53-dependent checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia, *Blood* 2008, 112(7):2886-95

Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M: Aurora Kinases: Structure, functions and their association with cancer, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2008, 152:27-33

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam HK, Park WS, Nam SW, Kim MS, Sun DI, Lee YS, Jang JJ, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH: Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck, Clin Cancer Res 2005, 11:1879-82

LeRoy PJ, Hunter JJ, Hoar KM, Burke KE, Shinde V, Ruan J, Bowman D, Galvin K, Ecsedy JA: Localization of human TACC3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on Ser558 by Aurora A: a novel pharmacodynamic method for measuring Aurora A activity, Cancer Res 2007, 67:5362-5370

Lin YG, Immaneni A, Merritt WM, Mangala LS, Kim SW, Shahzad MMK, Tsang YTM, Armaiz- Pena GN, Lu C, Kamat AA, Han LY, Spannuth WA, Nick AM, Landen CN Jr., Wong KK, Gray MJ, Coleman RL, Bodurka DC, Brinkeley WR, Sood AK: Targeting Aurora Kinase with MK-0457 inhibits Ovarian Cancer Growth, Clinical Cancer Research 2008, 14(17):5437-46

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wie Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC: Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNO/NO pathway, Cancer Cell Jun 2005, 7(6):575-589

Loeffler- Ragg J, Witsch- Baumgartner M, Tzankov V, Hilbe W, Schwentner I, Sprinzi GM, Utermann G, Zwierzina H: Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma, Eur J Cancer 2006, 42:109-11

Lui VW, Grandis JR: EGFR-mediated cell cycle regulation, Anticancer Res 2002, 22:1-11

Lurje G und Lenz HJ: EGFR Signaling and Drug discovery, Oncology 2009, 77:400-410

Ma P, Zhang X, Wang ZJ: High- throughput mutational analysis of human cancer genome, Pharmacogenomics 2006, 7:597-612

Mackay AM, Ainsztein AM, Eckley DM, Earnshaw WC: A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis, J Cell Biol 1998, 140:991-1002

Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, Balani SK, Burenkova O, Chen W, Galvin KM, Hoar KM, Huck JJ, LeRoy PJ, Ray ET, Sells TB, Stringer B, Stroud SG, Vos TJ, Weatherhead GS, Wysong DR, Zhang M, Bolen JB, Clariborne CF: Antitumor activity of MLN8054, an orally active small- molecule inhibitor of Aurora A kinase, Proc Natl Acad Sci USA 2007, 27:4513-4525

Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, Jiang T, Li Q, Neve RM, Gray JW, Cai WW, Balmain A: Crosstalk between Aurora- A and p53: Frequent Deletion or Downregulation of Aurora- A in Tumors from p53 Null Mice, *Cancer Cell* 2007, 11(2):161-73

Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb A, Lock R, Carol H, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Wu J, Smith MA, Houghton PJ: Initial Testing of the Aurora Kinase A Inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP), *Pediatr Blood Cancer* 2010, 55(1): 26-34

Marumoto T, Zhang D, Saya H: Aurora A- a guardian of poles, *Nature Rev Cancer* 2005, 5(1):42-50

Mazedumar A, Henderson YC, El-Naggar AK, Sen S, Clayman GL: Aurora Kinase A Inhibition and Paclitaxel as targeted combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma, *Wiley InterScience* 2008, 25/26:1-34

McLaughlin J, Markovtsov V, Li H, Wong S, Gelman M, Zhu Y, Franci C, Lang DW, Pali E, Lasaga J, Low C, Zhao F, Chang B, Gururaja TL, Xu W, Baluom M, Sweeny D, Carroll D, Sran A, Thota S, Parmer M, Romane A, Clemens G, Grossbard E, Qu K, Jenkins Y, Kinoshita T, Taylor V, Holland SJ, Argade A, Singh R, Pine P, Payan DG, Hitoshi Y: Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569 identified through an image-based phenotypic screen, *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, 136:99-113

Mehra R, Cohen RB, Burtneess B: The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck, *Clin Adv Hematol Oncol.* 2008, 6:742-750

Mendelsohn J, Baselga J: Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer, *J. Clin. Oncol.* 2003, 14:2787-2799

Meraldi P, Honda R, Nigg EA: Aurora A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells, *EMBO J* 2002, 21:483-492

Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S: Association of chromosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers, *Int J Cancer* 2001, 92:370-3

Moscatello DK, Holgado- Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ: Frequent Expression of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Multiple Human Tumors, *Cancer Res* 1995, 55:5536-9

Nagel , Gürkov: Hals- Nasen- Ohrenheilkunde 2009, S106/107

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis, *Eur J Cancer* 2001, 37(4):9-15

Nigg EA: Mitotic Kinases as regulators of cell division and its checkpoints, *Nature Review* 2001, 2:21-32

Okamoto I, Kenyon LC, Emllet DR, Mori T, Sasaki J, Hirosako S, Ichikawa Y, Kishi H, Godwin AK, Yoshioka M, Suga M, Matsumoto M, Wong AJ: Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer, *Cancer Sci* 2003, 94:50-6

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring, *Cancer* 1997, 79:595-604

Probst R, Grevers G, Iro H: Hals- Nasen- Ohren- Heilkunde, Thieme 2008, 86-87

Reiter R, Gais P, Jüttung U, Steuer-Vogt MK, Pickhard A, Bink K, Rauser S, Lassmann S, Höfler H, Werner M und Walch A: Aurora Kinase A Messenger RNA Overexpression is Correlated with Tumor Progression and Shortened Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Clinical Cancer Research* 2006, 5136-5140

Rivera F, Garcia-Castano A, Vega N, Vega-Villegas ME, Gutiérrez-Sanz L: Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial, *Expert Rev Anticancer Ther* 2009, 9(10):1421-8

Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R: Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation, *Br J Cancer* 2001, 84:824-831

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19:183-232

Sasai K, Katayama H, Stenoien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S: Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement aurora-B kinase function in mitotic cells, *Cell Motil Cytoskeleton* 2004, 59:249-63

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N, Kiessling M: Amplification of the Epidermal- Growth- Factor- Receptor Gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma, *International Cancer Journal* 1994, 56:72-77

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene, *Science* 1987, 235:177-82

Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, Booton R, Santibáñez-Koref MF, Heighway J: Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability, *Br J Cancer* 2005, 93:719-29

Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR: Mutant Epi-

dermal Growth Factor Receptor (EGFRvIII) Contributes to Head and Neck Cancer Growth and Resistance to EGFR Targeting, *Clinical Cancer Research* 2006, 12(17):5064-73

Song JI, Grandis JR: STAT signaling in head and neck cancer, *Oncogene* 2000, 19(21):2489-2495

Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL: Multicenter phase II study of erlotinib, an oral growth factor receptor tyrosin kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck, *J Clin Oncol* 2004, 22:77-85

Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS: Epidermal growth factor receptor- independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp 130 cytokine system, *Cancer Res* 2003, 63(11):2948-2956

Steiner P, Joynes C, Bassi R, Wang S, Tonra JR, Hadari YR, Hicklin DJ: Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild- type and mutated epidermal growth factor receptor, *Clin Cancer Res* 2007, 13:1540-1551

Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H, Okano Y: Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast, *Cancer Research* 1999, 59: 2041-2044

Tao Y, Zhang P, Frascogna V, Lecluse Y, Auperin A, Bourhis J, Deutsch E: Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells, *British Journal of Cancer* 2007, 97(12):1664-72

Tatsuka M, Katayama H, Ota T, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y: Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells, *Cancer Res* 1998, 58:4811-6

Tomida S, Yatabe Y, Yanagisawa K, Mitsudomi T, Takahashi T: Throwing new light on lung cancer pathogenesis: updates on three recent topics, *Cancer Sci* 2005, 96:63-68

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Sheperd FA: Erlotinib in Lung Cancer- Molecular and Clinical Predictors of Outcome, *The New Engl Journal* 2005, 353:133-44

Vader GV, Medema RH, Lens SMA: The chromosomal passenger complex: guiding Aurora- B through mitosis, *Journal of Cell Biology* 2006, Vol. 173, 6:833-837

Vermorken JB, Bourhis J, Trigo J, Kies M, Leon X, Mueser M, Amellal, Schueler A, Baselga J: Cetuximab (Erbix) in recurrent/metastatic (R&M) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) refractory to first- line platinum- based therapies, American Society of Clinical Oncology 2005, Abstract 5505

Vivanco L, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:489-501

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol* 1999;189:12-19

Weaver BA, Cleveland DW: Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death, *Cancer Cell* 2005, 8:7-12

Wheeler CM: HPV genotypes: implications for worldwide cervical cancer screening and vaccination, *Lancet Oncol* 2010, 11:1013-4

Wilkinson RW, Odedra R, Heaton SP, Wedge SR, Keen NJ, Crafter C, Foster JR, Brady MC, Bigley A, Brown E, Byth KF, Barrass NC, Mundt KE, Foote KM, Heron NM, Jung FH, Mortlock AA, Boyle FT, Green S: AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis, *Clin Cancer Res* 2007, 13:3682-3688

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H, Yokoyama A: 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* 2007, 110:2034-2040

Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF: CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis, *J Cell Biol* 2001, 155:1147-57

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nature Genetics* 20, 189- 193 (1998)

Zhou J, Giannakakou P: Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005, 5:65-71

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Anitkörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATR	AT-reiche Region
Aurka	Aurora A Kinase
Aurkb	Aurora B Kinase
BIS	Bisphosphonat?
BSA	Bovines Kälberserum
CdK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cet	Cetuximab
cm	Zentimeter
CPC	Chromosomal- Passenger- Complex
CRC	Kolorektale Karzinome
Ctrl	Kontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
FACS	Fluoreszenz- Durchflusszytometrie
H	Stunden
H ₂ O	Wasser

HH3	Histon H3
HNO	Hals- Nasen- Ohrenheilkunde
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf- Hals- Bereichs
HPV	Humanes Papillomavirus
INCENP	Inner centrosome Proteine
kDA	Kilodalton
µl	Mykroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nm	Nanomol
NSCLC	großzelliges Bronchialkarzinom
pAurora A	phosphoAurora A Kinase
pAct	phosphoActin
pErk	phosphoErk
PBS	Phosphat buffered saline= Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PI FACS	Propidium Iodide Durchflusszytometrie
Rb	Retinoblastom
S10	Serin 10
STAT 5	Signal transducer and activator of transcrption 5
TACC3	Human Transforming, acidic colled- coil containing protein 3
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF-α	Transformierter Wachstumsfaktor α

TK	Tyrosinkinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

10 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Peschel dafür, dass ich meine Promotion im sehr gut ausgestatteten hämatologischen Forschungslabor der III. Medizinischen Klinik durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. med. Ulrich Keller für die Überlassung des Themas und die erstklassige Betreuung. Seine immerwährende Unterstützung und sehr gute fachliche Anregung waren mir eine große Hilfe.

Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. med. Alexander Höllein, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Vielen Dank auch an die AG Keller, die mich von Anfang an unterstützte und mir immer weitergeholfen hat. Im Besonderen gilt hier mein Dank Stephanie Schöffmann für die fachliche Unterstützung und Christina Stadler und Viktorya Nikolova für die schöne gemeinsame Zeit.

Der Abteilung für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar möchte ich für die hervorragende Kooperation und den uns freundlicherweise zu Verfügung gestellten immunohistochemischen Abbildungen und klinischen Daten von 180 Patienten danken. Allen voran Anja Pickhard und Guido Piontek, sowie Henning Bier für das Zustandekommen der Kooperation.

Für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit gebührt Stefan Wagenpfeil besonders großer Dank.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie sehr für die motivierenden Gespräche und die Unterstützung danken.

11 Veröffentlichung der Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden im Juli 2011 zur Veröffentlichung bei Oncotarget mit dem folgenden Titel eingereicht:

Combined Targeting overcomes Cetuximab Resistance in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck

Alexander Hoellein¹, Anja Pickhard², Fabienne von Keitz¹, Stephanie Schoeffmann¹, Guido Piontek², Martina Rudelius³, Anja Baumgart¹, Stefan Wagenpfeil⁴, Christian Peschel¹, Tobias Dechow¹, Henning Bier² und Ulrich Keller¹

¹ III. Medical Department, Technische Universität München, Munich, Germany

² Department of Head and Neck Surgery, Technische Universität München, Munich Germany

³ Institute of Pathology, Technische Universität München, Munich, Germany

⁴ Institute for Medical Statistics and Epidemiology, Technische Universität München, Munich, Germany

Abstract

Squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN) is the sixth leading cause for cancer deaths worldwide. Despite extensive knowledge of risk factors and pathogenesis about 50 percent of all patients and essentially every patient with metastatic SCCHN eventually die from this disease. We analyzed the clinical data and performed immunohistochemistry for Epidermal growth factor receptor (EGFR) and Aurora kinase A (Aurora-A) expression in 180 SCCHN patients. Patients characterized by elevated Aurora-A protein expression in tumor tissue represent a risk group with poor disease-free and overall survival (EGFR^{low} Aurora-A^{low} versus EGFR^{high} Aurora-A^{high}, p=0.024). SCCHN cell lines were assessed for effects of single and combined Aurk and EGFR inhibition. Treating SCCHN cell lines with a Pan-Aurora kinase inhibitor

resulted in defective cytokinesis, polyploidy and apoptosis, which is effective irrespective of the EGFR status. Combined Aurora kinase and EGFR targeting using a monoclonal anti-EGFR antibody was more effective compared to single EGFR and Aurora kinase inhibition. Comparing Pan-Aurora kinase and Aurora-A targeting hints towards a strong and clinically relevant biological effect mediated via Aurora kinase B (Aurora-B). Taken together, our findings characterize a new poor risk group in SCCHN patients defined by elevated EGFR and Aurora-A protein expression. Our results demonstrate that combined therapeutic targeting of EGFR and Aurora kinases represents a therapeutic means to activate cell cycle checkpoints and apoptosis in SCCHN.