

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar

**Inhibition von Aurorakinasen zur Therapie der  
akuten myeloischen Leukämie**

Katarina Lind

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. Priv.-Doz. Dr. K. S. Götze

2. Univ.-Prof- Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 11.12.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2014 angenommen.



*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Akute myeloische Leukämien (AML)	1
1.1.1	Definition und Klassifikation der AML	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese der AML	3
1.1.3	Zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen bei AML	5
1.1.4	Therapie der AML	6
1.2	Die Aurorakinasen A, B und C	8
1.2.1	Aufbau und Struktur der Aurorakinasen	8
1.2.2	Aufgaben der Aurorakinasen während der Mitose	10
1.2.3	Die Rolle von Aurorakinasen in der Tumorgenese	11
1.2.4	Aurorakinaseinhibitoren	12
1.2.5	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Materialien	14
2.1.1	Materialien für die Zellkultur	14
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Antikörper	16
2.1.4	Zelllinien	17
2.1.5	Primäre AML Zellen	18
2.1.6	Aurorakinaseinhibitor AS703569	18
2.1.7	Laboraausstattung und Zubehör	18
2.1.8	Software	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	Zellkultur	20
2.2.1.1	Zellkulturbedingungen	20
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	21
2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau	22
2.2.1.4	MTT-Proliferationsassay	22
2.2.1.5	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-FITC und Propidium-Iodid (PI)	23

2.2.1.6	Isolierung von CD34+ Zellen.....	23
2.2.1.7	CFC Assay mittels Methylcellulose.....	24
2.2.1.8	Langzeitkultur (LTC).....	25
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.2.2.1	Präparation von Proteinlysaten.....	26
2.2.2.2	Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.2.2.4	Westernblot.....	28
2.2.2.5	Immunpräzipitation.....	29
2.2.2.6	Strippen der PVDF-Membran.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Einfluss des Aurorakinaseinhibitors auf murine Ba/F3-Zellen.....	30
3.1.1	AS703569 wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose in murinen Ba/F3-Zellen.....	30
3.1.2	Einfluss des Inhibitors auf Histon H3, FLT3 und STAT5.....	32
3.2	Charakterisierung des zytotoxischen Potentials des Aurorakinaseinhibitors AS703569 auf AML-Zelllinien.....	34
3.2.1	AS703569 führt zur Proliferationshemmung in AML-Zelllinien.....	34
3.2.2	AS703569 induziert Apoptose in AML-Zelllinien.....	36
3.2.3	AS703569 dephosphoryliert Histon H3 an Ser10.....	37
3.2.4	Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 inhibiert die Autophosphorylierung von FLT3 und STAT5 in humanen AML Zellen.....	39
3.2.5	Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 hemmt die Autophosphorylierung von c-KIT.....	40
3.3	Analyse des Wirkungsspektrums von AS703569 auf Primärzellen- weisen Patienten mit einer FLT3-ITD eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor auf?.....	41
3.3.1	AS703569 induziert Apoptose in peripheren AML-Blasten.....	41
3.3.2	Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit humaner Knochenmarkszellen.....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>45</b>
4.1	Das zytotoxische Potential von AS703569 gegenüber Zelllinien.....	45
4.2	AS703569 inhibiert die Wirkung der Aurorakinasen.....	47
4.3	FLT3 als Targetprotein des Aurorakinaseinhibitors.....	48
4.4	c-KIT als weitere Zielstruktur von AS703569.....	48

4.5	FLT3-ITD exprimierende primäre AML-Zellen zeigen keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor .....	49
4.6	Aurorakinaseinhibitoren - Anwendung in klinischen Studien.....	50
5 Zusammenfassung.....		52
Literaturverzeichnis .....		53
Tabellenverzeichnis .....		61
Abbildungsverzeichnis .....		62
Danksagung.....		64
Ehrenwörtliche Erklärung .....		65

**Abkürzungsverzeichnis**

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bzw.	beziehungsweise
CD34+	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplikation
IC <sub>50</sub> -Wert	Inhibitorische Konzentration, bei der 50% der Zellen viabel sind
IL-3	Interleukin 3
KIT	Stammzellfaktorrezeptor
LTC	Long-term culture
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCF	Stammzellfaktor
SFM	Serumfreies Medium
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TPO	Thrombopoetin
u.a.	und andere
usw.	und so weiter
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## **1 Einleitung**

### **1.1 Akute myeloische Leukämien (AML)**

#### **1.1.1 Definition und Klassifikation der AML**

Der Begriff Leukämie bedeutet „weißes Blut“ und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation bei Leukämiepatienten mit hohen Leukozytenzahlen. Im Jahr 1895 wurde dieser Begriff erstmals von Rudolf Virchow bei einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) geprägt (Tefferi 2008). 1891 entwickelte Paul Ehrlich Färbefahren für Blutausstriche, was in der Folge eine Differenzierung zwischen der myeloischen und lymphatischen Leukämie ermöglichte.

Akute myeloische Leukämien (AML) sind maligne klonale Stammzellerkrankungen, die zu einer Vermehrung unreifer myeloischer Zellen (Blasten) im Knochenmark und zu einer konsekutiven Knochenmarkinsuffizienz führen. Nach dem Modell der hierarchischen Organisation der Hämatopoese findet die maligne Transformation auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzelle statt. Die unterschiedlichen Subtypen der AML zeigen eine Ausreifung entsprechend den normalen Differenzierungsstufen myeloischer Progenitorzellen. Die Ursache der Transformation sind erworbene genetische Veränderungen in der leukämischen Stammzelle. Bei bis zu 75% der Patienten mit AML werden in den malignen Zellen chromosomale Aberrationen nachgewiesen. Diese sind z.T. für bestimmte morphologische Varianten der AML spezifisch und haben vor allem auch prognostische Bedeutung.

Die AML entsteht in mehreren Schritten durch maligne Transformation pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen, welche unkontrolliert proliferieren, ihre Fähigkeit zur Differenzierung allerdings verloren haben (Lowenberg, Downing et al. 1999; Appelbaum, Rowe et al. 2001). Im Knochenmark kommt es folglich zur Ansammlung unreifer Vorläuferzellen und deren Ausschwemmung ins Blut. Durch Verdrängung der normalen Hämatopoese leiden die Patienten an Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie.

Rund 35% der Patienten sind bei Diagnosestellung älter als 75 Jahre, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren. Die Inzidenz der AML liegt bei ca. 3,54/100.000/Jahr (Ries LAG 2008).

Die Einteilung der AML erfolgt nach der FAB-(French-American-British) Klassifikation von Bennett aus dem Jahr 1976, wonach sowohl der Reifungsgrad der Zellen, wie auch deren Zugehörigkeit zu einer hämatopoetischen Zelllinie von Bedeutung ist (Bennett, Catovsky et al. 1976). Die FAB-Klassifikation ist eine rein morphologische Klassifikation. Die zunehmende Bedeutung chromosomaler und molekulargenetischer Aberrationen bei der AML hat die Einführung einer neuen Klassifikation erforderlich gemacht. Die WHO-Klassifikation berücksichtigt neben morphologischen Kriterien auch zytogenetische und molekulargenetische Befunde, wie in Abbildung 1.2 dargestellt ist.

Die WHO-Klassifikation definiert das Vorliegen einer AML bereits ab einem Blastenanteil im Blut oder Knochenmark von 20%, im Gegensatz dazu sieht die FAB-Klassifikation eine Diagnosestellung erst ab 30% Blasten vor (Vardiman, Harris et al. 2002).

Bezeichnung		Häufigkeit (%)
<b>M0</b>	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung	5
<b>M1</b>	AML ohne Ausreifung	15-20
<b>M2</b>	AML mit Ausreifung bzw. t(8;21) (AML1/ETO)	30-40
<b>M3</b>	Akute Promyelozytenleukämie	5-10
<b>M3v</b>	AML mit t(15;17) (PML/RARa)	
<b>M4</b>	Akute myelomonozytäre Leukämie	20
<b>M4eo</b>	AML mit inv16 oder t(16;16) (CBFβ/MYH11)	5
<b>M5a</b>	Akute Monoblastenleukämie	5
<b>M5b</b>	Akute Monozytenleukämie	5
<b>M6</b>	Akute Erythroleukämie	5
<b>M7</b>	Akute Megakaryoblastenleukämie	1

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML

**AML mit rekurrenten genetischen Alterationen**

- AML mit t(8;21);(q22;q22), (RUNX1-RUNX1T1)
- AML mit inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(p13;q22) (CBFB-MYH11)
- Akute promyelozytäre Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), (PML-RARA)
- AML mit t(9;11) (p22;q23) und MLL-Varianten (MLL-MLLT3)
- AML mit t(6;9) (p23;q34) (DEK-NUP214)
- AML mit inv(3) (q21;q26) oder t(3;3) (q21;q26) (RPN1-EVI1)
- AML mit t(1;22) (p13;q13) (RBM15-MKL1) Down-Syndrom

**AML mit Genmutationen**

- AML mit NPM1-Mutationen
- AML mit CEPBA-Mutationen
- AML mit FLT3-Mutationen
- AML mit KIT-Mutationen
- AML mit MLL-Mutationen
- AML mit RAS-Mutationen

**AML mit myelodysplasie-verwandten Veränderungen**

- > 20% Blasten und eines der folgenden Kriterien
- keine rekurrente genetische Alteration, keine vorangegangene Therapie einer nicht-verwandten Erkrankung
- morphologische Kennzeichen einer MLD oder früheren MDS, oder:
- MDS spezifische zytogenetische Veränderungen wie -7/del(7q), -5/del(5q), i(17q), -13/del(13q) uva.

**Therapiebedingte myeloide Neoplasien**

- therapiebedingte AML (t-AML)
- therapiebedingtes MDS (t-MDS)
- therapiebedingte myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (t-MDS/MPN)
- nach Chemotherapie oder Bestrahlung
- ausgeschlossen ist die Transformation einer MPN

**AML, die nicht anders kategorisiert ist**

- AML, minimal differenziert
- AML ohne Reifung
- AML mit Reifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute myeloblastische/ akute monozytäre Leukämie
- Akute erythrozytäre Leukämie (erythrozytäre/myeloische und reine Erythroleukämie)
- Akute megakaryoblastische Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose
- Myeloisches Sarkom

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML (Swedlow SH 2008)

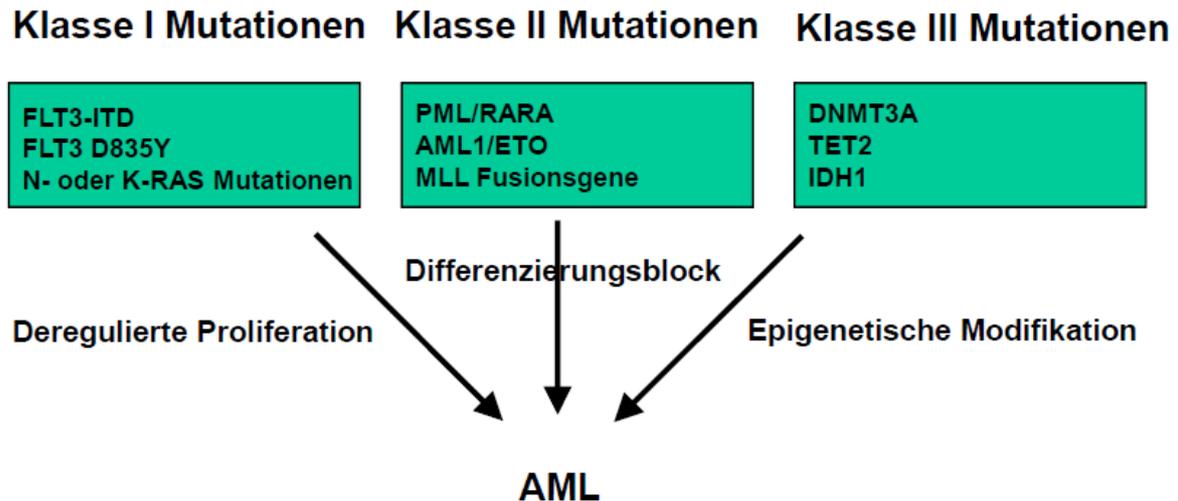
**1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der AML**

Eine AML entsteht durch Ansammlung erworbener genetischer und epigenetischer Alterationen in hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen, die sich dadurch in ihren Zellwachstums- und Differenzierungseigenschaften verändern (Mrozek, Marcucci et al. 2007). Die Ätiologie der AML ist bis heute nicht vollständig geklärt. Mehrere Risikofaktoren wurden in epidemiologischen Studien identifiziert. Dabei können Umweltfaktoren von genetischen Risikofaktoren unterschieden werden. Ein

zunehmendes Problem ist die Entstehung einer AML nach vorangegangener Chemotherapie, insbesondere mit Alkylanzien oder Topoisomerase-Hemmern.

Durch die Entdeckung von AML spezifischen Chromosomenaberrationen, welche folglich zur Bildung von Fusionsgenen führen und somit Mutationen in Transkriptionsfaktoren verursachen, wurden in den letzten Jahren große Fortschritte in der Aufklärung der Pathogenese gemacht. Das heute allgemein akzeptierte Modell für die Entstehung einer de novo AML ist die sogenannte „two-hit“ Hypothese, nach der mindestens zwei kritische genetische Veränderungen notwendig sind, die nur in ihrer Kombination in der Lage sind, die Proliferations- und Differenzierungssteuerung des hämatopoetischen Systems zu durchbrechen. Klasse I Mutationen entstehen in Tyrosinkinase und führen zur deregulierten Proliferation. Diese aktivierenden Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen (RTK) induzieren Veränderungen in Signaltransduktionskaskaden und rufen einen Proliferationsvorteil hämatopoetischer Zellen hervor. Klasse II Mutationen entstehen durch chromosomale Translokationen, die zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors führen. Diese Mutationen führen zu einem Differenzierungsblock (Gilliland and Griffin 2002). Daneben wurden in der letzten Zeit eine Reihe weiterer Mutationen, insbesondere epigenetische Modifikationen entdeckt, welche nicht nur an der Entstehung einer AML beteiligt sind, sondern auch prognosebestimmend sind. Hierzu zählen unter anderem die an der DNA-Methylierung beteiligten Enzyme DNMT3A sowie TET2.

Man geht heute von einer Wechselbeziehung zwischen den drei Klassen von Mutationen im Rahmen der Leukämogenese aus (Patel, Gonen et al.; Steffen, Muller-Tidow et al. 2005; Pedersen-Bjergaard, Andersen et al. 2007).



**Abbildung 1: Hypothese als Entstehungsmodell einer de novo AML.** Abbildung modifiziert aus (Gilliland and Griffin 2002).

### 1.1.3 Zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen bei AML

Die Identifikation von chromosomalen Veränderungen bei rund 50% der neu diagnostizierten AML-Patienten war ein entscheidender Schritt in der Aufklärung der AML. Diese zytogenetischen Veränderungen stellen einen wichtigen prognostischen Faktor dar und erlauben eine Einteilung in drei Risikogruppen. Patienten mit den Translokationen t(8;21), t(15;17) oder einer Inversion inv(16) haben eine gute klinische Prognose, wohingegen ein normaler Karyotyp mit einem intermediären Risiko vergesellschaftet ist. Veränderungen am Chromosom 5 (Deletion am langen Arm), Chromosom 7 (Deletion oder kompletter Verlust des Chromosoms) und komplex aberrante Karyotypen (> 3 chromosomale Aberrationen) sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Byrd, Mrozek et al. 2002). Da die Mehrzahl der Patienten in die Gruppe mit intermediärem Risiko fällt, sind weitere prognostische Marker von Bedeutung (Kottaridis, Gale et al. 2001).

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) spielen eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese. Bis heute wurden 58 humane RTK identifiziert und anhand ihrer Proteinliganden in mehr als 20 Klassen unterteilt. Erworbene Mutationen in RTK führen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und sind an der Entstehung maligner Neoplasien beteiligt. Bei Patienten mit AML wurden sowohl Mutationen als auch Überexpression von RTK der Klasse III identifiziert. Hierzu zählen FLT3, c-KIT, PDGFR $\alpha$  und PDGFR $\beta$  (Blume-Jensen and Hunter 2001). In der normalen Hämato-

poese sind FLT3 und c-Kit für Überleben, Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen von Bedeutung (Lyman and Jacobsen 1998).

Die RTK FLT3 ist in 80-100% aller AML-Patienten unabhängig des FAB-Subtyps überexprimiert (Carow, Levenstein et al. 1996; Drexler 1996). Mutationen im FLT3-Gen gehören mit einer Inzidenz von 30% zu den häufigsten Alterationen der AML. Man unterscheidet Punktmutationen (FLT3-JM-PM) in 2% der Fälle, Mutationen der Tyrosinkinase-domäne (FLT3-TKD), die bei 7-10% der AML-Patienten zu finden sind, und FLT3-internal-tandem-duplication-Mutationen (FLT3-ITD). Sie stellen mit einer Häufigkeit von 20-27% den größten Anteil der FLT3-Mutationen dar. Man findet FLT3-ITDs in allen FAB-Subtypen, die höchste Frequenz jedoch bei Patienten mit AML M3 und M5. FLT3-ITD-Mutationen sind mit dem verstärkten Auftreten einer Leukozytose und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Kiyoi, Naoe et al. 1999; Yamamoto, Kiyoi et al. 2001).

Neben FLT3 exprimiert die Mehrzahl der AML-Patienten auch das Protooncogen c-KIT. Physiologisch findet man c-KIT neben hämatopoetischen Progenitorzellen auch auf Mastzellen, Melanozyten und interstitiellen Cajalzellen (Ashman, Ferrao et al. 1999).

Aktivierende Mutationen der RTK c-KIT werden somit nicht nur bei AML-Patienten identifiziert, sondern auch bei Mastrozytose, Keimzelltumoren und gastrointestinalen Stromatumoren (Lyman and Jacobsen 1998; Longley, Reguera et al. 2001). Bei AML-Patienten mit einer Translokation t(8;21) oder einer Inversion inv(16) lassen sich gehäuft c-KIT-Mutationen nachweisen. Eine Mutation im Exon 8 von c-KIT, die bei 30% der Patienten mit Nachweis einer inv(16) auftritt, geht mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher (Care, Valk et al. 2003) und hat somit eine negative prognostische Bedeutung.

#### **1.1.4 Therapie der AML**

Unbehandelt führt die AML innerhalb kurzer Zeit zum Tod des Patienten. Die Therapie der AML ist eine aus mehreren Blöcken bestehende Chemotherapie. Das primäre Ziel in der Therapie der AML ist das Herbeiführen einer kompletten Remission (<5% Blasten im KM und eine Normalisierung des BB) durch die sogenannte Induktionstherapie. Durch den Einsatz der Zytostatika Cytarabin (AraC) und Daunorubicin wird bei 70-80% der Patienten unter 60 Jahren und bei 50% der

über 60-Jährigen eine komplette Remission erreicht. Im Anschluss erfolgt eine Postremissionstherapie, bestehend aus Chemotherapie und ggf. autologer oder allogener Stammzelltransplantation. Die Postremissionstherapie richtet sich nach dem zytogenetischen Risiko. Während Patienten mit einem günstigen Risiko mit Nachweis von t(8;21) und inv(16) durch eine intensive Chemotherapie geheilt werden können, haben Patienten mit einer Hochrisikokonstellation mit einer alleinigen Chemotherapie kaum Aussicht auf Heilung. Diese Patienten benötigen andere Therapiestrategien wie z.B. die allogene Stammzelltransplantation. Für Patienten in der intermediären Risikogruppe (im Wesentlichen normaler Karyotyp) ist die optimale Postremissionstherapie noch nicht definiert und Gegenstand laufender klinischer Studien.

Ziel der Postremissionstherapie ist die Elimination verbliebener Leukämiezellen (Lowenberg, Downing et al. 1999). Die AML M3 (Promyelozytenleukämie) mit einer Translokation t(15;17) nimmt innerhalb der Therapie der AML eine Sonderstellung ein, da nahezu 100% der Fälle durch eine Behandlung mit all-trans-Retinolsäure in Vollremission gebracht werden können.

Trotz großer Fortschritte in der Therapie der AML beträgt das Gesamtüberleben nur 20-30%. Die Prognose der AML bleibt insgesamt ungünstig und neue Therapiestrategien sind daher notwendig. Die Identifikation genetischer Mutationen bei rund der Hälfte aller AML-Patienten und weitere AML-spezifische Mutationen wie die FLT3-ITD eröffnen neue mögliche Therapieoptionen. In der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie wird der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec®), der selektiv die ATP-Bindungsstelle von Bcr-Abl blockiert, bereits mit Erfolg eingesetzt (Deininger, Buchdunger et al. 2005). Kleinmolekulare Inhibitoren kommen auch in der Behandlung der AML zum Einsatz. Insbesondere FLT3-Inhibitoren, wie z.B. SU5416, Sorafenib, PKC412 und CEP701 sind bereits in klinischen Studien eingesetzt worden (O'Farrell, Yuen et al. 2004). Die bisherigen Ergebnisse der FLT3-Inhibitoren als Monotherapie der AML sind aber eher enttäuschend, da überwiegend nur ein vorübergehendes Ansprechen verzeichnet werden konnte.

## 1.2 Die Aurorakinasen A, B und C

### 1.2.1 Aufbau und Struktur der Aurorakinasen

Die Aurorakinasen A, B und C zählen zu den Serin/Threoninproteinkinasen, die eine Schlüsselfunktion während der Zellteilung einnehmen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung des Spindelapparates, der Chromosomenverdichtung und Anordnung und der Anheftung von Kinetochormikrotubuli an die Zentrosomen. Aurorakinasen sind für einen einwandfreien Ablauf der Zytokinese verantwortlich (Carmena and Earnshaw 2003). Im Jahr 1995 wurde das Aurora-A Allel erstmals in *Drosophila melanogaster* Mutanten beschrieben, die ein fehlerhaftes Auftreten des Spindelpols aufwiesen. Der Name Aurora entstammt dem Phänomen des Polarlichtes, welches beim Auftreffen des Sonnenwindes auf die Erdatmosphäre an den Erdpolen entsteht (Glover, Leibowitz et al. 1995). Die humanen Aurorakinasen A und B wurden 1998 identifiziert und zunächst unter dem Namen Aurora 2 und 1 geführt. Das Gen für die Aurorakinase A ist auf Chromosom 20q13.2 lokalisiert, Aurora B befindet sich auf Chromosom 17p13.1 und Aurora C auf 19q13.43 (Bischoff, Anderson et al. 1998; Kimura, Matsuda et al. 1999).

Die drei Aurorakinasen haben eine gemeinsame Proteinkinasestruktur. Sie weisen eine hochkonservierte katalytische Domäne auf, eine sehr kurze C-terminale Domäne, die in rund 82% zwischen den Aurorakinasen A und B übereinstimmt, und eine N-terminale Domäne, die für die Spezifität jeder der drei Kinasen verantwortlich ist. Die ATP-Bildungsstelle stimmt innerhalb der Aurorakinasen beinahe vollständig überein.

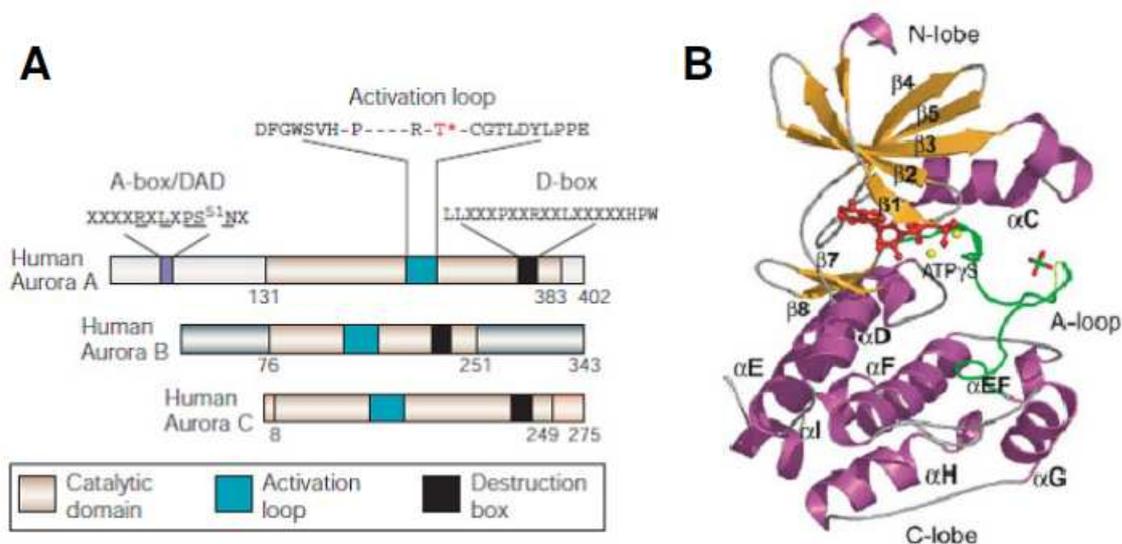
Die Kristallstruktur der Aurorakinase A wurde im Jahr 2002 veröffentlicht. Die katalytische Domäne von Aurora A weist eine typische bilobale Kinasefaltung auf, bestehend aus einer C- und einer N-terminalen Domäne. Über eine Polypeptid, bestehend aus den Aminosäuren 210-216, welches als Drehachse fungiert, sind die beiden Domänen miteinander verbunden. Diese Region spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung der katalytischen Aktivierungsschleife. Die C-terminale Region aller Aurorakinasen besteht aus hochkonservierten Aminosäuren, die in Schleifenform an der Oberfläche angeordnet sind und als ideales Erkennungsmerkmal für andere Proteine und Cofaktoren gilt. Sie ist in der Lage als unabhängige Untereinheit der katalytischen Domäne zu agieren, wohingegen die N-terminale Region nicht an der

Regulierung der katalytischen Einheit beteiligt ist. Vielmehr dient die N-terminale Domäne, Interaktionen zwischen anderen Proteinen zu vermitteln.

Die ATP-Bindungsstelle ist hydrophob und bindet Adenosin über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Aminosäure Trp-277 der Aktivierungsschleife und Glu-211 und Ala-213, die sich in dem Verbindungspolypeptid zwischen dem C- und N-Terminus befinden.

Die Aktivierungsschleife beinhaltet einen Threoninrest (Thr-288), der während der Aktivierung der Kinase in phosphorylierter Form vorliegt. Dies führt zur Konformationsänderung der Kinase und verhindert eine weitere Anbindung von Proteinensubstraten.

Die Kristallstruktur der Aurorakinase A weist einige Besonderheiten auf. Sie besitzt eine hydrophobe Fluorphenyltasche, die durch eine stark glycerinhaltige Schleife und das Verbindungspolypeptid gebildet wird. Außerdem enthält die Polypeptidkette zwischen C- und N-terminaler Domäne eine einzelne Glycinansatzstelle, welche die Größe und Konformation der Adenosinbindungsstelle verändern kann. Diese Bildung einer kleineren ATP-Bindungsstelle führt zusammen mit einer kurzen Seitenkette an der Aminosäure Thr-217 dazu, dass Aurora A Adenosin ohne direkte Interaktionen mit den OH-Gruppen des Riboserings bildet (Giet and Prigent 1999; Cheetham, Knegtel et al. 2002).



**Abbildung 2: Struktur der Aurorakinasen**

A zeigt den Aufbau der Aurorakinasen. Die katalytische Region ist hoch-konserviert. Die Auto-phosphorylierung von Thr288 (rotes T mit Sternchen) dient der Aktivierung von Aurora A. Abbildung A modifiziert aus (Carmena and Earnshaw 2003).

B zeigt die Struktur der Aurorakinase A orientiert an den Positionen der C- und N-Schleife. Die  $\alpha$ -Helices sind in lila, die  $\beta$ -Faltblattstruktur orange, die Aktivierungsschleife grün dargestellt.  $Mg^{+}$ -Ionen erscheinen als gelbe Kugeln, gebundenes Phosphat grün und rot. Abbildung B aus (Nowakowski, Cronin et al. 2002)

### 1.2.2 Aufgaben der Aurorakinasen während der Mitose

Trotz Ähnlichkeiten in ihrem Aufbau unterscheiden sich die drei Aurorakinasen deutlich in ihrer Funktion und Lokalisation (Carmena and Earnshaw 2003).

Aurora A ist an der Regulation des Zellzyklus von der späten S-Phase bis zur M-Phase beteiligt, von dem Eintritt in die Mitose, über die Chromosomenteilung, Ausbildung des Spindelapparates, Anordnung der Chromosomen während der Metaphase und die Vervollständigung der Zytogenese. In menschlichen Zellen steigt die Aktivität der Aurorakinase A während der späten G2- bis zur M-Phase an mit einem Spitzenwert in der Prophase der Zellteilung (Marumoto, Zhang et al. 2005). Die Regulation der Aurorakinasen erfolgt durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und Abbau. Durch Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung der Kinasen (Carmena and Earnshaw 2003). Während der Mitose interagiert die aktivierte Aurorakinase A mit verschiedenen Proteinen wie TACC, CENP-A, Ajuba, p53, u.a (Giet, McLean et al. 2002; Hirota, Kunitoku et al. 2003; Kunitoku, Sasayama et al. 2003; Liu, Kaneko et al. 2004). Am Ende der Mitose wird Aurora A über ein Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut. Der Anaphasen-Promoting Komplex (APC), eine Enzymkomplex, der zu den Ubiquitin-Ligasen zählt und den zeitlichen Ablauf der Mitose reguliert, erkennt eine hochkonservierte Sequenz (D-BOX, siehe Abb.1-5) in der C-terminalen Domäne von Aurora A. Dies führt zur Aktivierung des Ubiquitin-Systems und somit zum Abbau der Kinase (Honda, Mihara et al. 2000).

Aurora B ist während der G2- bis zur M-Phase exprimiert (Bischoff, Anderson et al. 1998), mit einem Maximum in der Meta- und Telophase (Sessa, Mapelli et al. 2005). Aurora B wird als chromosomales „Passagierprotein“ bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Anlagerung der Chromosomen an die Mikrotubuli, Aktivierung von Checkpoints zur Ausbildung des Spindelapparates und Zytogenese. Schlüsselsubstrate der aktivierten Aurorakinase B sind Zentromerproteine wie z.B INCENP oder Survivin (Honda, Korner et al. 2003), zytoskeletale Proteine und Histon H3. Durch Phosphorylierung an Ser10 durch die Aurorakinase B wird Histon H3 aktiviert. Während der Chromosomen-Kondensation ist Histon H3 für Veränderungen der Chromatinstruktur verantwortlich ist (Van Hooser, Goodrich et al. 1998; Giet and Glover 2001). Aurora B wird auf dieselbe Weise wie Aurora A ubiquitiniert und abgebaut.

Die Aurorakinasen ändern ihre Lokalisation während der verschiedenen Phasen der Mitose. In der Prophase ist Aurora A um die Zentrosomen konzentriert, Aurora B hingegen findet sich im Zellkern. Während der Metaphase ist Aurora A an den Microtubuli in der Nähe der Spindelpole lokalisiert, in der Anaphase lässt sich Aurora A sowohl an den Spindelpolen, als auch in der Mitte des Spindelapparates detektieren. Aurora B ist in der Metaphase an den Zentrosomen zu finden, in der Anaphase erscheint die Aurora B-Kinase vor allem in der Mitte des Spindelapparates, aber auch an den Zellteilungsfurchen an der Innenseite der Zellmembran.

Aurora C ist im Rahmen der Spermatogenese von Bedeutung, sie wird spezifisch im Hoden exprimiert (Tang, Lin et al. 2006)

### **1.2.3 Die Rolle von Aurorakinasen in der Tumorgenese**

Die Chromosomenabschnitte 17q und 20q sind in bestimmten Tumoren wie Brust-, Ovarial- oder Kolonkarzinomen vervielfältigt. Die Aurorakinasen A und B sind ebenfalls dort lokalisiert und sind daher in der Krebsforschung von großem Interesse. Die erste Verbindung zwischen Aurorakinasen und der Entstehung maligner Neoplasien schuf Bischoff im Jahr 1998. In humanen kolorektalen Karzinomen detektierte er eine Überexpression von Aurora A und B und identifizierte Aurora A als Onkogen (Bischoff, Anderson et al. 1998). Im Verlauf wurde in weiteren Tumoren, u.a. in Brust-Ovarial- und Pankreaskarzinomen eine Überexpression von Aurora A nachgewiesen. Während Aurora A in normalen Zellen vor allem in der G2- und M-Phase exprimiert wird und sich an den Zentrosomen und dem Spindelapparat befindet, lässt sich die Kinase in Tumorzellen überall im Zytoplasma und unabhängig des Zellzyklus detektieren (Miyoshi, Iwao et al. 2001; Gritsko, Coppola et al. 2003; Li, Zhu et al. 2003). Überexpression von Aurora A führt zur Vervielfältigung der Zentrosomen, Chromosomeninstabilität, fehlerhafter Zellteilung, Polyploidie und Transformation von Zellen. Die Rolle von Aurora B in der Tumorgenese ist noch nicht vollständig geklärt. Überexpression und vermehrte Phosphorylierung von Histon H3 führen zu Defekten in der Zellteilung und Zytogenese (Bischoff, Anderson et al. 1998; Zhou, Kuang et al. 1998; Ota, Suto et al. 2002). Aurorakinasen stellen auch im Rahmen der AML-Therapie ein interessantes Therapietarget dar. Neben soliden Tumoren zeigt sich auch in leukämischen Zellen eine Überexpression der Aurorakinasen (Ikezoe, Yang et al. 2007). Daneben stellt sowohl die Schlüsselrolle der Aurorakinasen während der

Mitose, als auch deren Interaktionen mit Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise p53 eine weitere Indikation, dass diese Rezeptortyrosinkinasen geeignete Zielstrukturen für kleinmolekulare Inhibitoren zu sein scheinen (Andrews 2005).

#### **1.2.4 Aurorakinaseinhibitoren**

Seit der Entdeckung der Aurorakinasen und ihrer Assoziation zur Entstehung maligner Neoplasien, wurden eine Reihe von Aurorakinaseinhibitoren, wie ZM447439, PHA739358, AZD1152 entwickelt, die teilweise bereits in klinischen Studien Anwendung finden (Carvajal, Tse et al. 2006; Carpinelli, Ceruti et al. 2007). Im Jahr 2003 wurde ZM447439 als erster Aurorakinaseinhibitor von Ditchfield charakterisiert. Die  $IC_{50}$ -Werte für Aurora A und B lagen zwischen 110-130nM. ZM447439 führte in humanen Zelllinien zur Abnahme der Histon H3-Phosphorylierung an Ser10, zu einer p53-abhängigen Polyploidie und einer gesteigerten Apoptoserate (Ditchfield, Johnson et al. 2003). Ein weiterer Aurorakinaseinhibitor AZD1152, der selektiv Aurora B inhibiert ( $IC_{50}$  0.37nM), induziert Wachstumsstopp, eine Zunahme der Apoptose und führt ebenfalls zur Dephosphorylierung von Histon H3 in humanen akuten Leukämiezellen in vitro und in vivo (Yang, Ikezoe et al. 2007). Insbesondere Zellzyklus spezifische Kinasen, wie beispielsweise die Aurorakinasen, spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der sogenannten mitotischen Katastrophe, einer speziellen Form des Zelltodes während der Mitose. Diese resultiert aus dem Zusammenwirken fehlerhafter Kontrollpunkte des Zellzyklus, welche durch Inhibition der Aurorakinasen induziert werden, sowie zellulärer Schädigung und führt somit zur Polyploidie und schließlich zum Untergang der Zelle (Castedo, Perfettini et al. 2004).

### **1.2.5 Zielsetzung der Arbeit**

Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 ist ein von Merck Serono entwickelter Inhibitor der drei Aurorakinasen A, B und C. Die Wirkung wird durch ATP-kompetitive Bindung an die Kinase vermittelt. In der nachfolgenden Arbeit wurde das Wirkprofil des Aurorakinaseinhibitors auf murine und humane Zelllinien, sowie primäres Zellmaterial untersucht.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Materialien für die Zellkultur**

<i>Material</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Aqua dest.	Delta Select (Pfullingen, DE)
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG (Berlin, DE)
BIT 9500	StemCells Technologies (Köln, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg, DE)
FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)	R&D Systems (Wiesbaden, DE)
Fötales bovines Serum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, AUT)
L-Glutamine 200nM	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG (Berlin, DE)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan- sulfonsäure (Hepes)	SigmaAldrich(Steinheim, DE)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Hyperinterleukin 6 (hyper IL-6)	S.Rose-John (Kiel, DE)
Interleukin 3 (IL-3, human/murin)	R&D Systems (Wiesbaden, DE)
Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Low density lipoprotein (LDL)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
MyeloCult H5100	StemCells Technologies (Köln, DE)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, Dulbecco)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Stammzellfaktor (SCF)	R&D Systems (Wiesbaden, DE)
Thrombopoetin (TPO)	R&D Systems (Wiesbaden, DE)
Trypanblau 0.4%	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, DE)

**2.1.2 Chemikalien**

Acryl-BIS	Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Aurorakinaseinhibitor (AS703569)	Serono (Darmstadt, DE)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Bromphenolblau	Fluka (Buchs, SUI)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, DE)
CellTiter 96® Aqueous One Solution	
Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega (Mannheim, DE)
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche (Mannheim, DE)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Entwicklerlösung (Super Signal West)	PIERCE (Rockfort, USA)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol	
Glycerol	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
IgG-Agarose Konjugat	Santa Cruz (Heidelberg, DE)
MACS FcR Blocking	MiltenyiBiotec(Bergisch Gladbach,DE)
MACS CD 34+ MicroBeads	MiltenyiBiotec(Bergisch Gladbach,DE)
2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Methanol	Merck (Darmstadt, DE)
Methylcellulose Medium (MethoCult, H4435)	StemCells Technologies (Köln, DE)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, DE)
Natriumfluorid (NaF, #95)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Natriumorthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Protein A/G PLUS Agarose	Santa Cruz (Heidelberg, DE)

Protein Standard (Precision Plus Protein Standard Dual Color)	Bio-Rad (München, DE)
Ponceau S Solution	Fluka (Buchs, SUI)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, DE)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe, DE)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, DE)

### 2.1.3 Antikörper

#### *Primärantikörper*

Aurora-A Kinase (35C1) (#A 1231)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Aurora-B Kinase (#A 5102)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
β-Aktin (#A 5441)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
c-KIT (Ab81) (#3308)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
Phospho-c-KIT (Tyr719) (#3391)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
c-Myc (N-262) (#sc-764)	Santa Cruz (Heidelberg, DE)
ERK 1 (K-23) (#sc-94)	Santa Cruz (Heidelberg, DE)
p44/42 MAPK (ERK1/2) (#4695)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)(E10) (#9106)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
FLT3 (8F2) (#3462)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
Phospho-FLT3 (Tyr591) (54H1) (#3466)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
Phospho-Histon H3 (Ser10) (#6-570)	Upstate (Lake Placid, NY, USA)
STAT5 (#9363)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)
Phospho-STAT5 (Tyr694) (C11C5) (#9359)	Cell Signaling (Frankfurt a. M. , DE)

#### *Sekundärantikörper*

Anti-Maus IgG-HRP	PIERCE (Rockfort, USA)
Anti-Kaninchen IgG-HRP	PIERCE (Rockfort, USA)

*FACS Antikörper*

CD117-PE	BD Pharmingen (Heidelberg, DE)
IgG-FITC Kontrolle	JacksonImmunoResearch(Suffolk,UK)
7_AAD	BD Pharmingen (Heidelberg, DE)
AnnexinV-FITC	BD Pharmingen (Heidelberg, DE)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

*Kit*

BrdU Flow Kit	BD Pharmingen (Heidelberg, DE)
---------------	--------------------------------

**2.1.4 Zelllinien**

<i>Zelllinie</i>	<i>Charakteristika, FAB</i>
<b>HL60</b>	akute myeloische Leukämie, M2 (Collins, Gallo et al. 1977)
<b>Kasumi-1</b>	akute myeloische Leukämie, M2, t(8;21) AML1-ETO (Asou, Tashiro et al. 1991)
<b>K-562</b>	chronische myeloische Leukämie (Lozzio and Lozzio 1973)
<b>M-07e</b>	akute megakaryoblastische Leukämie, M7 (Avanzi, Lista et al. 1988)
<b>MV4-11</b>	akute monozytäre Leukämie, M5, t(4;11), FLT3-ITD (Lange, Valtieri et al. 1987)
<b>NB-4</b>	akute promyelozytäre Leukämie, M3, t(15;17) (Lanotte, Martin-Thouvenin et al. 1991)
<b>Parentale Ba/F3</b>	IL-3 abhängige murine pro-B-Zelllinie (Palacios, Henson et al. 1984)
<b>Ba/F3 FLT3-ITD</b>	transfizierte pro-B-Zelllinie, freundlicher Weise von Rebecca Grundler zur Verfügung gestellt (Grundler, Miething et al. 2005)
<b>EL-08-1D2</b>	murine Stroma-Zelllinie (Oostendorp, Harvey et al. 2005)

### 2.1.5 Primäre AML Zellen

Patient	ID	Alter	Geschlecht	Material	CD34+ (%)	FLT-3-ITD	FAB
1	M229/07	68	m	pB	-	neg	M4
2	M244/07	61	w	pB	-	neg	
3	M271/07	77	m	pB	-	neg	
4	M297/08	61	w	pB	-	neg	
5	M307/08	47	m	pB	-	neg	M5a
6	M250/07	37	w	pB	-	pos	M3
7	M275/07	49	w	pB	-	pos	
8	M282/07	65	w	pB	-	pos	
9	M283/07	47	w	pB	-	pos	
10	M284/07	72	w	pB	-	pos	
11	M281/07	69	w	KM	0,4	neg	M5
12	M285/07	68	w	KM	9,7	neg	M1
13	M259/07	46	m	KM	0,5	neg	
14	M249/07	37	w	KM	10,7	pos	M3
15	M291/08	65	w	KM	5,2	pos	
16	M302/08	72	w	KM	5,1	pos	
17	M311/08	71	w	KM	12,2	pos	
18	M331/09	36	m	KM	32,3	pos	

Abbildung 3: Charakteristika der in der Arbeit verwendeten Patientenproben

### 2.1.6 Aurorakinaseinhibitor AS703569

Der von der Firma Merck Serono zur Verfügung gestellte Aurorakinaseinhibitor AS703569 wurde in DMSO aufgelöst. Die Stocklösung von 1 mmol/l wurde bei -80 °C eingefroren.

### 2.1.7 Laborausstattung und Zubehör

Absorbance Mikroplate Reader (ELx800)	BIO-TEK (Bad Friedrichshall, DE)
Brutschrank (Hereaus Hera Cell 240)	Hereaus (Hanau, DE)
Combitips (1.25ml)	Eppendorf AG (Hamburg, DE)

Durchflusscytometer (Coulter, Epics XL)	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
Einfrierbehälter (Nalgene Freezing Container)	ThermoFisherScientific (Roskilde, DK)
Einfriertubes (2 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
FACS-Tubes	Nunc (Wiesbaden, DE)
Filme (CL-Xposure Film)	Thermo Fisher Scientific (Bonn, DE)
Filtereinheit (0.2 µm)	Whatman (Dassel, DE)
20°C Gefrierschrank (Liebherr Premium)	Liebherr (Ochsenhausen, DE)
80°C Gefrierschrank	SANYO (Oizumi-machi, JP)
Gel Blotting Paper	Whatman (Dassel, DE)
Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean)	Bio-Rad (München, DE)
Gelglasplatten	Bio-Rad (München, DE)
Inkubationsschüttler	Infors (Einsbach, DE)
4°C Kühlschrank (Liebherr Premium)	Liebherr (Ochsenhausen, DE)
MACS Separation Columns	MiltenyiBiotec(Bergisch Gladbach,DE)
MACS Separation Unit	MiltenyiBiotec(Bergisch Gladbach,DE)
Mediumfilter (Stericup & Steritop)	Millipore (Schwalbach/Ts., DE)
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss (Jena, DE)
Mikrozentrifuge (Minispin)	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Petrischale (mit Nocken, 35mm)	greiner bio-one (Solingen, DE)
Pipetboy	Integra Biosciences (Fernwald, DE)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
PVDF Sequencing Membrane (0.45µm)	Millipore (Schwalbach/Ts., DE)
Röntgenfilmentwickler (Hyperprocessor)	AmershamLife Science (Freiburg, DE)
Safe-Lock Reaktionsgefäß (0.5ml, 1.5ml, 2ml)	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Scanner	Epson (Meerbusch, DE)
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin (Burdalingen, DE)
Spectrophotometer (SmartSpec Plus)	Bio-Rad (München, DE)
Spritzen (5ml, 50ml)	B. Braun (Melsungen, DE)
Sterilpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	greiner bio-one (Solingen, DE)
Stickstofftank (Messer)	Cryotherm (Kirchen/Sieg, DE)
Stromquelle (Bio-Rad Power Pac 200)	Bio-Rad (München, DE)
Stromquelle (Standart Power Pack P25 T)	Biometra (Göttingen, DE)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, DE)

Tischzentrifuge (Megafuge 3.0 RS)	Hereaus (Hanau, DE)
Transferkammer (Transblot SD Semi-Dry Tranfer-cell)	Bio-Rad (München, DE)
Wasserbad (Grant)	VWR International (Darmstadt, DE)
Vortexer (MS1 Minishaker)	IKA Werke (Oberstaufen, DE)
Zellkultur Multiwell Platten (6, 12, 24, 96 Well)	greiner bio-one (Solingen, DE)
Zellkulturflaschen	TPP (Trasadingen, SUI)
Zellkulturröhrchen (15ml, 50ml)	greiner bio-one (Solingen, DE)
Zellkulturschalen	TPP (Trasadingen, SUI)

### **2.1.8 Software**

Endnote X2  
FlowJO Version 7  
Microsoft Office 2000

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Zellkulturbedingungen**

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Sämtliche Zelllinien (Ba/F3, HL-60, K-562, MO-7e, MV4-11, NB4) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Deutschland) bezogen und deren Empfehlungen entsprechend kultiviert.

Suspensionszelllinien wurden in Zellkulturflaschen in RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin versetzt und anschließend filtriert wurde. Vor der ersten Verwendung wurde das aufgetaute FCS für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert, wodurch hitzeempfindliche Komponenten des Komplement-Systems im Serum zerstört werden. Daraufhin wurde das hitzeinaktivierte FCS in 50 ml Zellkulturröhrchen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die AML-Zelllinien HL-60, Kasumi-1, K-562, MO-7e, MV4-11 und NB-4 wurden alle zwei Tage 1:3 gesplittet.

Die IL-3-abhängige murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 wurde in RPMI-Vollmedium unter Zusatz von 10 ng IL-3 / ml kultiviert und täglich 1:10 gesplittet

Das verwendete periphere Blut und das Knochenmark stammen von Patienten mit AML zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und vor Therapiebeginn, welche zwischen 2003 und 2008 in die deutschen AMLSG Studien aufgenommen wurden. Alle Patienten hatten in die Verwendung ihrer Proben für wissenschaftliche Zwecke eingewilligt. Sämtliche Patientenproben wurden zytogenetisch, molekulargenetisch, zytomorphologisch und immunphänotypisch untersucht. FLT3-Mutationen wurden mittels DNS-Sequenzierung bestätigt.

Nach dem Auftauen der Primärzellen erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll zur Isolation von mononukleären Zellen. Nach der CD34+-Separation dieser Zellen aus dem Knochenmark erfolgte die Kultivierung in serumfreiem Medium, welches mit den Wachstumsfaktoren SCF, TPO, FLT3, IL-3 und hyper-IL-6 versetzt wurde über Nacht. Bei hyper-IL-6 handelt es sich um ein bioaktives Fusionsprotein aus humanem IL-6 und dem IL-6-Rezeptor (Fischer, Goldschmitt et al. 1997).

Die aus peripherem Blut stammenden mononukleären Zellen wurden unbehandelt 24 Stunden kultiviert und anschließend mit dem Aurorakinaseinhibitor AS703569 behandelt.

Serumfreies Medium:        SCF (1µl/ml bei einer Stocklösung von 100µg/ml)  
                                  FLT3 (1µl/ml bei einer Stocklösung von 50 µg/ml)  
                                  TPO (0,8 µl/ml bei einer Stocklösung von 50 µg/ml)  
                                  IL-3 (0,2 µl/ml bei einer Stocklösung von 50 µg/ml)  
                                  hyper-IL-6 (0,2 µl/ml bei einer Stocklösung von 50 µg/ml)

### **2.2.1.2        Einfrieren und Auftauen von Zellen**

In regelmäßigen Abständen wurden  $1-2 \times 10^7$  Zellen pelletiert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, die Suspension in einem speziellen Isopropanol haltigen Einfrierbehälter bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Der Alkohol sorgt für eine langsame Abkühlgeschwindigkeit der Zellen. Nach einigen Tagen wurden die Zellen in

flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt und können dort mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und umgehend in 10 ml Medium aufgenommen, um einen Zellschaden durch das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu verhindern. Nach zweimaligem Abzentrifugieren wurden die Zellen resuspendiert und kultiviert.

Einfriermedium: 90% FCS und 10% DMSO

### **2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau**

Der Trypanblau-Exklusionstest dient der Bestimmung der Lebendzellzahl. Dafür wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Lebende Zellen erscheinen farblos, wohingegen Tote den Farbstoff durch ihre poröse Zellwand aufnehmen und unter dem Mikroskop blau erscheinen. Zur Berechnung der Lebendzellzahl wurde folgende Formel verwendet:

Lebendzellzahl / ml = Anzahl lebender Zellen  $\times 10^4$

### **2.2.1.4 MTT-Proliferationsassay**

Das MTT-Proliferationsassay ist ein farbmetrisches Verfahren zur Bestimmung der Viabilität einer Zellpopulation in Proliferationsexperimenten. Dieser Methode liegt die Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu dunkelrotem Formazan-Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu Grunde. Die Menge des kalorimetrisch gemessenen Formazan-Salzes ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die Experimente wurden in 96-Well-Platten mit flachem Boden angesetzt, wobei die Randreihen frei gelassen und jeder Wert dreifach angesetzt wurde. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  pro Well ausgesät, mit 100 µl Medium aufgefüllt und verschiedene Konzentrationen (1.5nM, 3.75nM, 7.5nM, 12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM) des Aurorakinaseinhibitors AS703569 zugefügt. Nach 24- bis 72- stündiger Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen entsprechend den Instruktionen des

Herstellers mit MTT-Lösung behandelt, für weitere 1,5 bis 4 Stunden inkubiert und anschließend im Absorbance Mikroplate Reader (ELx800) vermessen. Aus jeweils drei Messwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

#### **2.2.1.5 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-FITC und Propidium-Iodid (PI)**

Die Bestimmung apoptotischer Zellen in einer Kultur oder nach Stimulation mit AS703569 erfolgte durch eine Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und PI und anschließender Messung im Durchflusszytometer. Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Im Frühstadium der Apoptose beobachtet man einen Zusammenbruch der Membranasymmetrie, wobei es zur Exposition des Phosphatidylserins auf der Aussenseite der Membran kommt (Martin, Reutelingsperger et al. 1995). Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Protein, welches mit hoher Affinität Phosphatidylserin bindet und durch Kopplung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Die Differenzierung der apoptotischen Zellen von nekrotischen erfolgt mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Propidium-Iodid (PI), welcher nur in nekrotische Zellen, welche eine durchlässige Zellmembran aufweisen, eindringt. Vitale Zellen sind demnach Annexin-V-FITC und PI negativ, frühapoptotische Zellen Annexin-V-FITC positiv und PI negativ und tote Zelle Annexin-V-FITC und PI positiv. Hierzu wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 1ml Medium ausplattiert und 24 bzw. 48 Stunden mit AS703569 behandelt. Anschliessend wurden die Proben mit 1ml Facspuffer gewaschen und jeweils 500 $\mu\text{l}$  Annexinpuffer, 5 $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC sowie 0.5 $\mu\text{l}$  PI hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationzeit erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Facspuffer: PBS, 0.5% BSA

Annexinpuffer: 5 ml 1M HEPES (pH 7.4), 28 ml 2.5M NaCl, 0.18 g  $\text{CaCl}_2$ , 467 ml Aqua dest.

#### **2.2.1.6 Isolierung von CD34+ Zellen**

Aus dem Knochenmark der Patienten wurden CD34+ Zellen durch eine positive Separation mit Hilfe von MiniMACS-Separationssäulen und MACS MicroBeats isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers Miltenyi Biotec.

Nach dem Auftauen der Proben wurde eine Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficoll durchgeführt. Nach Resuspension in 10ml HF2+-Puffer wurden die Zellen gewaschen und in 19ml IMDM + 2% FCS + 300µl DNase überführt und im 37°C Wasserbad fünf Minuten inkubiert. Dieser Vorgang dient der Reduktion nicht lebensfähiger Zellen durch Zerkleinerung der DNA im Rahmen der Apoptose. Nach Abzentrifugation wurde das Zellpellet mit 300µl DNase, 100µl CD34 MicroBeads und 100µl FcR Blocking Reagenz pro  $1 \times 10^8$  Zellen versetzt. Nach 30-minütiger Inkubtion auf dem Kippschüttler (4°C) wurde das Pellet erneut gewaschen und in 5ml HF2+-Puffer aufgenommen. Es folgte die Separation mittels MiniMACS-Separationssäulen. Die Reinheit der CD34+-Population wurde nach der Separation immunphänotypisch bestimmt und betrug >90%.

HF2+-Puffer:            50 ml 10x HBSS, 5 ml P/S, 5 ml 1M Hapes, 10 ml FCS, 430 ml  
                                 Aqua dest.

### **2.2.1.7        CFC Assay mittels Methylcellulose**

Human Colony Forming Cell Assays (CFC) mittels Methylcellulose dienen dem Nachweis determinierter hämaopoetischer Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade und basieren auf der Fähigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen zur Proliferation und Differenzierung von Kolonien. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5000 bzw. 20000 CD34+ Knochenmarkszellen von AML-Patienten sowohl mit einer FLT3-ITD-Mutation als auch ohne (FLT3-WT) in 1.1 ml Methylcellulose aufgenommen, eine bestimmte Menge von AS703965 zugesetzt, ausplattiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zuvor über Nacht im Brutschrank in SFM, welchem die Wachstumsfaktoren SCF, TPO, FLT3, IL-3 und hyper-IL-6 zugefügt wurden, aufbewahrt. Nach 14 Tagen wurden die verschiedenen Kolonietypen nach standardisierten Kriterien ausgezählt und bewertet. Es wurden CFU-GM (Granulozyten-Makrophagen-Kolonien), GEMM (Granulozyten-Erythrozyten-Monozyten-Megakaryozyten-Kolonien), BFU-E (multizentrische Kolonien aus Vorläuferzellen der Erythropoese) unterschieden.

### 2.2.1.8 Langzeitkultur (LTC)

Mit Hilfe von Langzeitkulturversuchen (LTC) ist es möglich, hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen nachzuweisen, wie auch deren Differenzierung zu untersuchen (Cindy L. Miller 2001). LTC-IC (long-term culture-initiating cells) sind frühe Vorläuferzellen, welche nach 6 Wochen Kokultur mit einer Stromalen Zelllinie, wie unserem Versuch FBMD-1, noch in der Lage sind, kologene Zellen (CFUs) auszubilden. Die Anwendung von LTC-Assays dient somit dem Nachweis von Stammzellen in vitro (Sutherland, Eaves et al. 1991; Breems, Blokland et al. 1994).

In unserem Versuch wurde Knochenmark von AML-Patienten verwendet. Es wurde zwischen Patienten mit einer FLT3-ITD Mutation und Patientenproben ohne Vorliegen dieser Mutation (FLT3-WT) unterscheiden.

Nach dem Auftauen der primären Knochenmarksproben wurden CD34+ Zellen isoliert und in IMDM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit SFM + Wachstumsfaktoren versetzt. Je 2.5ml wurden in An- und Abwesenheit von DMSO bzw. AS703569 sowie in Suspension oder auf ausplattierten EL08-Zellen für 48 Stunden inkubiert. Die murine Stromazelllinie EL08 wurde identifiziert, die Stammzellnische in vitro zu imitieren. Unter Verwendung dieser Zelllinie in unserem Versuch soll der protektive Effekt der Stromalen Stammzellnische gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor untersucht werden (Oostendorp et al. (2005).

Nach zwei Tagen galt es die Zellen mittels Trypsinierung zu lösen und in 250ml IMDM zu resuspendieren. Jeweils 5 und 20% der Zellen wurden in Methylcellulose aufgenommen, ausplattiert und 14 Tage bei 37 °C kultiviert, 75% der Zellen wurden in 2.5ml Langzeitkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt, welche mit der murinen Stromazelllinie FBMD1 beschichtet waren, und sechs Wochen im Brutschrank (37 °C, 5%CO<sub>2</sub>) in Kultur gehalten. Einmal wöchentlich wurde die Hälfte des Langzeitkulturmediums abgesaugt und frisches hinzugefügt. Die Methylcellulose konnte nach 14 Tagen ausgezählt werden, die LTC wurden nach sechs Wochen trypsiniert, in 334µl IMDM überführt und in Methylcellulose überführt, welche nach weiteren 14 Tagen ausgewertet werden konnte. In Abbildung 4 wird der Versuchsaufbau veranschaulicht.

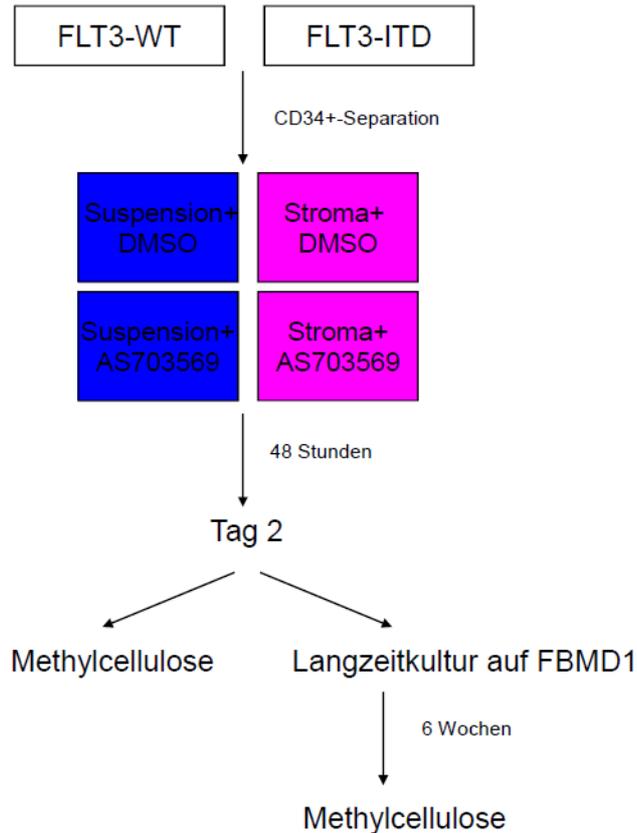


Abbildung 4: Versuchsaufbau LTC

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Präparation von Proteinlysaten

Nach Inkubation der Zellen mit AS703569 (12.5 nM bzw. 25 nM) über verschiedene Zeiträume (10 und 30 Minuten, sowie 1.5, 6, 16, 24 und 48 Stunden) wurden diese 2x mit PBS gewaschen, pelletiert und zur Zellyse in geeigneten Lysispuffer aufgenommen.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschliessend durch Ultraschallbehandlung (Sonication) lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 4 °C und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Lysis-Puffer: 5 ml 1M Hepes, 3.75 ml 4M NaCl, 0.5 ml 0.2 M EDTA, 25 ml 10 mM EGTA, 100 µl Tween-20  
pro ml Puffer: 10 µl 100 mM PMSF, 20 µl 1.9 mg/ml Aprotinin,  
10 µl 1 M  $\beta$ -Glycerolphosphat, 2.5 µl 0.4 M NaF, 1 µl 100 mM NaVO<sub>4</sub>

### **2.2.2.2 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zelllysates erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976), welche auf Absorbionsmessung im Spektralphotometer basiert. Als Referenzwert dient das Reagenz.

Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit Wasser verdünnt, 980 µl in eine Küvette überführt und 20µl des 1:10 verdünnten Lysates zugefügt. Anschliessend erfolgte die Messung der Absorption bei 595nm. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen einer BSA-Lösung erstellt und in gleicher Weise vermessen.

### **2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Nach der Zellyse erfolgte die Auftrennung der Proteine der Größe ihres Molekulargewichtes nach mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es wurden 7-12 %ige Trenngele verwendet, die nach Polymerisation mit 4-prozentigem Sammelgel beschichtet wurden. Zur Bildung von Taschen, welche zum Beladen des Geles mit Proteinlysaten nötig sind, wurden Gelkämme in das Sammelgel eingebracht. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Zelllysate im Verhältnis 1:2 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt (Laemmli 1970), für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und in einer Tischzentrifuge 1 Minute abzentrifugiert. Anschliessend wurden die Geltaschen mit jeweils 20 µl des Protein-Puffer-Gemisches beladen, als Größenreferenz für die Proteine diente ein Molekulargewichtsmarker, ein sogenannter Protein-Standard. In einer mit 1x Running-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer liefen die Proben bei 80 Volt aus den Taschen in das Sammelgel, danach wurde die Voltzahl auf 120 Volt erhöht. Nach 1.5 bis 2.5 Stunden waren die Proteine vollständig aufgetrennt.

2 x Laemmli-Puffer: 1.55 g DTT in 12.5 ml Aqua dest., 5 ml 1M Tris-Puffer, 20 ml 10% SDS 2.5 ml 1% Bromphenolblau, 10 ml Glycerol

10 x Running-Puffer:	288 g Glycin, 60 g Tris, 20 g SDS, 2000 ml Aqua dest.
4 x Sammelgelpuffer (pH 6.8):	6.05 g 0.5 M Tris-HCl, 0.4 g 0.4% SDS, 40 ml Aqua dest.
4 x Trenngelpuffer (pH 8.8):	91 g 0.5 M Tris-HCl, 2 g 0.4% SDS, 300 ml Aqua dest.
Trispuffer 1 M (pH 6.8):	12.1 g Tris-HCl, 100 ml Aqua dest.

#### 2.2.2.4 Westernblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese nach der „Semi-dry“-Methode auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0.45µm) transferiert. Das mit aufgetrennten Proteinen beladene Gel wurde auf ein in Methanol getränktes Stück PVDF-Membran gebracht und von zwei Gel-Blotting Papieren umgeben. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte in sogenanntem Transferpuffer für eine Stunde bei 20 Volt und 0.1 Amper pro Gel in einer Semi-dry-Transferkammer. Darauffolgend galt es, durch Inkubation für eine Stunde in 5%-iger Milch bzw. 5%-igem BSA in PBS für Phosphoantikörper, unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (meist 1:1000) auf dem Kippschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T für 15 Minuten wurde die Membran erneut für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung meist 1:2000) inkubiert. Anschliessend wurde die Membran 2x für 15 Minuten mit PBS-T und 1x für 20 Minuten mit PBS gewaschen. Die mit Antikörpern markierten Proteine wurden mit Hilfe einer Entwicklerlösung auf einem Röntgenfilm detektiert.

Transferpuffer:	1 l Methanol, 0.5 l 10x Running-Puffer, 3.5 l Aqua dest.
5%-ige Milch:	25 g Milchpulver, 500 ml PBS-T
PBS:	9.55 g PBS, 1000 ml Aqua dest.
PBS-T:	9.55 g PBS, 1 ml Tween-20, 1000 ml Aqua dest.

### 2.2.2.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Aufkonzentrierung eines Proteins. Hierzu wurden 1000µg Protein in 200µl Lysispuffer mit 10µl Antikörper versetzt und bei 4°C über Nacht auf einem Rollrad (9rpm) inkubiert. Anschliessend wurden 20µl des Protein A/G PLUS-Agarose Reagents dazugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Immunpräzipitate bei 4 °C 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand für eventuelle spätere Analysen eingefroren. Die im Pellet enthaltenen Proteine wurden 4x mit 500µl Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 30µl 1,5x Laemmlipuffer resuspendiert und 3 Minuten lang bei 95°C erhitzt, um das Antigen von den Beeds zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand nochmals für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proteinanalyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese.

Lysis-Puffer: 1.5 ml 1M NaCl, 0.1 ml Triton X-100, 0.25 ml Natriumdeoxycholat, 0.5 ml 1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 ml 100mM PMSF, 0.1 ml 100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.02 ml 0.5 M NaF, 1 Proteaseinhibitor-tablette (EDTA-frei), 7.43 ml Aqua dest.

### 2.2.2.6 Strippen der PVDF-Membran

Um weitere Proteine auf der bereits entwickelten Membran zu lokalisieren, löst man durch Strippen die Antigen-Antikörper-Bindung auf der Membran. Dazu wurde die Antikörperbindung durch Inkubation mit Stripping-Puffer für 20 Minuten gelöst und die Membran anschliessend mit PBS-T für 3x 15 Minuten gewaschen. Nach erneutem Blocken kann die Membran mit einem weiteren Primärantikörper versetzt werden.

Stripplösung: 10% Methanol, 10% Essigsäure, 80% Aqua dest.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Einfluss des Aurorakinaseinhibitors auf murine Ba/F3-Zellen**

#### **3.1.1 AS703569 wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose in murinen Ba/F3-Zellen**

Bei Ba/F3-Zellen handelt es sich um eine murine Pro-B-Zelllinie. Das Wachstum und Überleben erfolgt in Abhängigkeit von Interleukin 3. In Abwesenheit dieses Zytokins gehen die Zellen in den programmierten Zelltod über (Rodriguez-Tarduchy, Collins et al. 1990). Im Gegensatz dazu weisen die FLT3-ITD transformierten Ba/F3-Zellen ein IL-3 unabhängiges Wachstum auf. (Hayakawa, Towatari et al. 2000). Die Zelllinie ist daher besonders gut geeignet, die Wirkung der FLT3-Mutation in vitro genauer zu untersuchen (Grundler et al. 2005).

Das Protoonkogen c-KIT exprimierende Ba/F3 Zellen wurden ebenfalls untersucht. Aktivierende Mutationen der Rezeptortyrosinkinase c-KIT werden bei rund 17% der Patienten mit einer neu diagnostizierten AML detektiert, hauptsächlich bei AML mit CBF (inv16) und t(8;21) (Malaise, Steinbach et al. 2009). Neben Mutationen im Exon 17 an der Position D816 wurden auch Ba/F3-Zellen mit der weniger häufigeren Mutation im Exon 9 AY502-503 verwendet. Aktivierende c-KIT-Mutationen exprimierende Ba/F3-Zellen wachsen ebenfalls IL-3 unabhängig (Beghini, Larizza et al. 1998), (Boissan, Feger et al. 2000), (Debiec-Rychter, Dumez et al. 2004).

Um die wachstumshemmende Wirkung des Aurorakinaseinhibitors AS703569 auf die aktivierende FLT3 Mutation bzw. die c-KIT Mutation in vitro zu untersuchen, wurde für Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-c-KIT Zellen zunächst eine Dosiswirkungskurve erstellt, um die optimale Konzentration des Inhibitors zu bestimmen. Hierzu wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors über einen Zeitraum von 48h inkubiert. Die FLT3-ITD exprimierenden Ba/F3 Zellen wurden zusätzlich in An- und Abwesenheit von IL-3 kultiviert. Den Ausgangswert (Kontrolle, 100%) stellen unbehandelte Zellen dar.

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, wird die Proliferation der parentalen und transformierten Ba/F3-Zellen dosisabhängig inhibiert. Eine Reduktion des Wachstums auf 50% des Ausgangswertes ( $IC_{50}$ ) erfolgt für die parentalen Ba/F3-Zellen bei einer Inhibitor-konzentration von 10.8 nM, bei den Ba/F3 FLT3-ITD-Zellen liegt dieser Wert bei

6.9nM. Die Ba/F3 Zellen mit der c-KIT Mutation an Position D816 weisen einen IC<sub>50</sub>-Wert von 8.7 nM auf. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10,3 nM kommt es bei den Ba/F3-c-KIT 502/503 zu einer Wachstumshemmung auf 50%. Ferner ist ersichtlich, dass es ab einer Inhibitorkonzentration von rund 12.5nM bis 100 nM zu keiner weiteren Proliferationshemmung kommt. Vielmehr ist die Ausbildung eines Plateaus bei ca. 27 % proliferierender Zellen zu beobachten.

Der anti-proliferative Effekt des Aurorakinaseinhibitors auf die transformierten FLT3-ITD Ba/F3-Zellen lässt sich durch Zugabe von IL-3 aufheben. Die Anwesenheit von Interleukin 3 führt somit zur Ausbildung einer Resistenz der FLT3-ITD exprimierenden Zellen gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von AS703569, während dies bei parentalen Ba/F3 Zellen nicht der Fall ist.

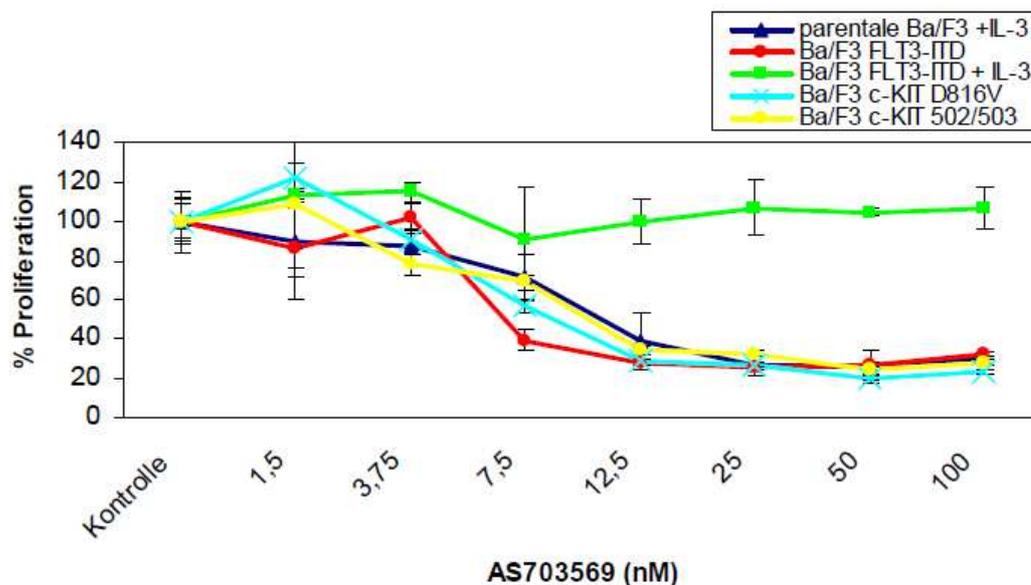
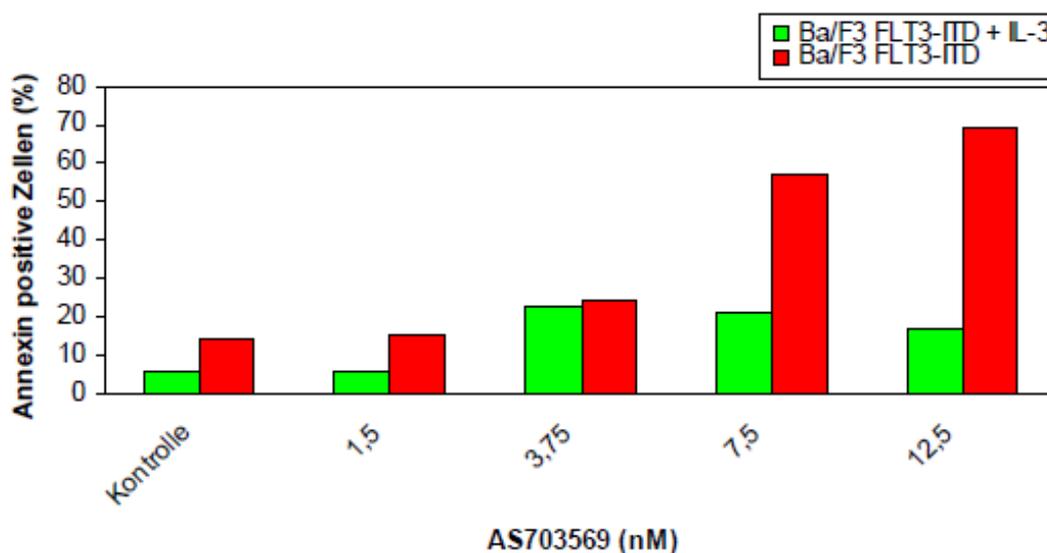


Abbildung 5: Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 hemmt die Proliferation von parentalen, FLT3-ITD und c-KIT exprimierenden Ba/F3-Zellen.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von AS703569 (1.5 bis 100 nM) behandelt, die FLT3-ITD transformierten Ba/F3 zusätzlich in An- und Abwesenheit von 10ng IL-3 pro ml. Parentalen Ba/F3 Zellen wurde ebenso IL-3 zugesetzt. Nach 48h erfolgte die Auswertung des MTT-Assays mittels Farbumschlag im Elisa-Reader. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt.

Neben dem anti-proliferativen Effekt des Aurorakinaseinhibitors auf FLT3-ITD exprimierende Ba/F3-Zellen, führt die Behandlung der Zellen mit AS703569 zu einer Steigerung der Apoptoserate. Die Zugabe des Inhibitors führt zur dosisabhängigen Zunahme der Apoptose mit einem Maximum von 70% apoptotischer Zellen bei einer Wirkkonzentration von 12.5 nM. Als Referenzpunkt (Kontrolle) dienen unbehandelte

Zellen, welche die natürliche Apoptoserate der Zellen repräsentieren. Abbildung 6 veranschaulicht, dass unter Zugabe von IL-3 ein großer Teil der Zellen vor dem programmierten Zelltod gerettet wird. Der Wert für die maximale Apoptoserate liegt hier bei 22%. Der protektive Effekt des Interleukin 3 gegenüber AS703569 wird erneut bestätigt.

Zusammenfassend besteht eine deutlich erhöhte Sensitivität der FLT3-ITD bzw. c-KIT mutierten Ba/F3 gegenüber AS703569 im Vergleich zu den parentalen Ba/F3 Zellen. Als optimale Dosis wurde 12,5 nM ermittelt, die dann in den folgenden Versuchen eingesetzt wurde.



**Abbildung 6:** AS703569 führt zu Apoptoseinduktion in FLT3-ITD transformierten Ba/F3-Zellen.  $5 \times 10^5$  Ba/F3 FLT3-ITD-Zellen wurden in 1 ml Medium in einer 12-Well-Platte mit dem Aurorakinaseinhibitor inkubiert. Ferner wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit 10 ng IL-3 pro ml versetzt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Messung im Durchflusszytometer nach Färbung der Zellen mit PE-konjugiertem AnnexinV und 7-AAD.

### 3.1.2 Einfluss des Inhibitors auf Histon H3, FLT3 und STAT5

Die Aurorinasen regulieren den Zellzyklus durch Phosphorylierung ihrer Substrate. Die Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 durch Aurora B ist für die Kondensation der Chromosomen während der Mitose verantwortlich (Giet and Glover 2001). Eine Dephosphorylierung von Histon H3 während der Mitose führt zur einem Defekt der Chromosomenteilung und einem Progressionsstopp des Zellzyklus (Van Hooser, Goodrich et al. 1998). Somit stellt der Phosphorylierungsstatus des Histon H3 einen relevanten Marker in der Signalkaskade der Aurora-B-Kinase dar. Die Aktivierung der RTK FLT3 erfolgt durch Bindung des FLT3-Liganden, was zur

Phosphorylierung von Tyrosinresten und zur Dimerisierung des Rezeptors führt. Eine Verlängerung der JM-Domäne, wie sie bei der FLT3-ITD-Mutation auftritt, resultiert in einer konstitutiven Autoaktivierung des Rezeptors durch Liganden unabhängige Dimerisierung und Phosphorylierung von FLT3 (Kiyoi, Towatari et al. 1998). Bei STAT5 handelt sich um ein Zielprotein in der Signalkaskade der konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinase FLT3 (Hayakawa, Towatari et al. 2000).

Nachdem die ersten Versuche gezeigt haben, dass Ba/F3 Zellen mit konstitutiv aktiviertem FLT3 (FLT3-ITD) besonders empfindlich gegenüber einer Inhibition mit AS703569 sind, geht es im Nachfolgenden darum, die Rezeptortyrosinkinase FLT3 und der downstream folgenden Signalmoleküle als weitere Targetproteine des Aurorakinaseinhibitors zu identifizieren.

Um die Wirkung von AS703569 auf die Autophosphorylierung von FLT3 und dessen nachgeordnete Signalwege darzustellen, wurden FLT3-ITD exprimierende Ba/F3-Zellen jeweils 10 Minuten bzw. 1 Stunde mit 12.5 nM Aurorakinaseinhibitor behandelt, lysiert und mittels Westernblottechnik unter Verwendung der phosphospezifischen Antikörper analysiert. Darauffolgend wurden die Blots gestrippt und mit den dazugehörigen Antikörpern gegen FLT3, STAT5 und Histon H3 inkubiert und entwickelt, um gleiche Proteinmengen zu gewährleisten. Die Kontrolle stellen unbehandelte FLT3-ITD positive Ba/F3-Zellen dar.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich kommt es durch die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor zur Hemmung der Autophosphorylierung von Histon H3, was auf eine Hemmung der Aurora-B-Kinase hinweist. Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die FLT3-ITD lässt sich durch eine verminderte Phosphorylierung dieser an der Aminosäure Tyr591, sowie eine Inhibition der Phosphorylierung von STAT5 nachweisen. Nach einer Stunde ist keine STAT5 Aktivität mehr nachweisbar. Dies spricht für das Vorhandensein weiterer Zielproteine des Aurorakinaseinhibitor neben den drei eigentlichen Aurorakinasen A, B und C. Das Signal der Aurorakinasen stellt sich konstant dar, was bei dem Wirkmechanismus des Inhibitors zu erwarten ist.  $\beta$ -Aktin dient dem Nachweis einer gleichmäßig verwendeten Proteinmenge.

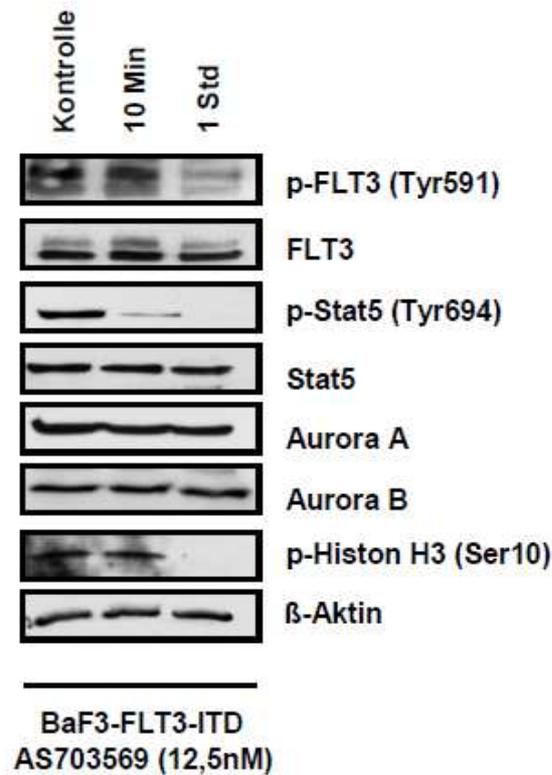


Abbildung 7: AS703569 führt zur Hemmung der Autophosphorylierung von Histon H3 an Ser 10, FLT3 an Tyr591 und STAT5 an Tyr694. FLT3-ITD exprimierende Ba/F3-Zellen wurden nach Inkubation mit 12.5 nM AS703569 lysiert und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgte unter Zunahme spezifischer Antikörper in Westernblottechnik.

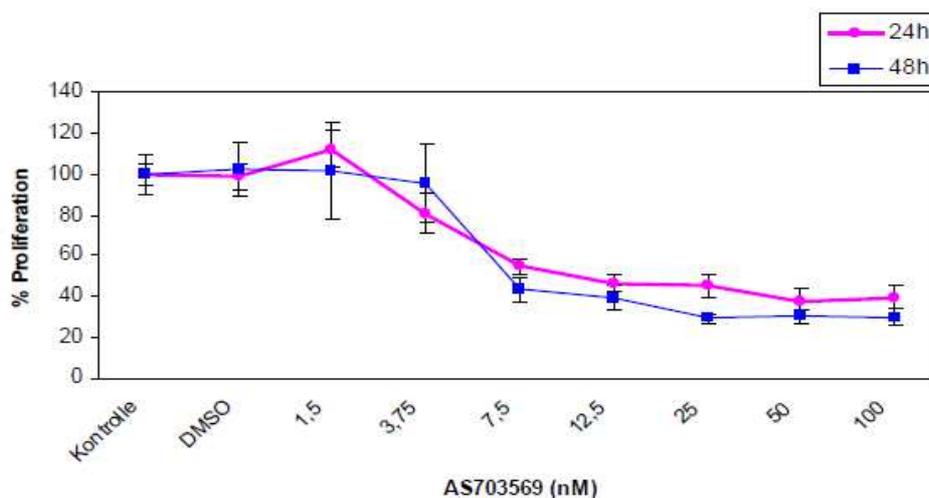
## 3.2 Charakterisierung des zytotoxischen Potentials des Aurorakinaseinhibitors AS703569 auf AML-Zelllinien

### 3.2.1 AS703569 führt zur Proliferationshemmung in AML-Zelllinien

Die vorangegangenen Versuche belegen die inhibitorische Wirkung von AS703569 sowohl auf die Aurorakinasen A und B wie auch auf FLT3-ITD und seine downstream Signalmoleküle wie STAT5. Damit stellt AS703569 eine potentiell interessante Sub-stanz dar, um über eine duale Hemmung speziell akute myeloische Leukämien mit FLT3-ITD zu behandeln. Um dies in vitro eingehender zu testen, wurden humane AML-Zelllinien verwendet.

MV4-11-Zellen stellen eine humane akute monozytäre leukämische Zelllinie dar, welche eine FLT3-ITD Mutation aufweist. Da Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3, insbesondere die FLT3-ITD zu den häufigsten genetischen Alterationen bei AML-Patienten zählt, erweisen sich MV4-11-Zellen als optimale Modellzelllinie zur Evaluation des Wirkspektrums des Aurorakinaseinhibitors auf humane Zellen.

MV4-11-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors (1.5 bis 100 nM) inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die proliferative Aktivität der Zellen mittels MTT-Assay im Elisa-Reader bestimmt. Unbehandelte Zellen (Kontrolle) dienen als Bezugswert (100%). Es zeigt sich eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums nach 24 Stunden mit einer geringen Steigerung nach 48 Stunden. Das Wachstum der Zellen wird in ansteigenden Konzentrationen von AS703569 von 100% auf einen Minimalwert von rund 30% reduziert. Der  $IC_{50}$ -Wert für MV4-11 nach 48 Stunden beträgt 7.0 nM. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Einfluss des Inhibitors auf die bereits untersuchten murinen Ba/F3-Zelllinien.



**Abbildung 8:** Proliferationsassay zur Bestimmung der Empfindlichkeit von MV4-11 auf AS703569. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in einer 96-Wellplatte mit flachem Boden 24 bzw. 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Aurorakinaseinhibitors behandelt. Die Proliferationsmessung erfolgte 1.5 Stunden nach Zugabe des Formazansalzes im Elisa-Reader. Pro Konzentration wurden Triplikate angesetzt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei separaten Versuchen dar.

Neben MV4-11 wurden auch zwei andere AML-Zelllinien auf eine Proliferationsinhibition nach Behandlung mit AS703569 untersucht.

Kasumi-1 ist eine humane AML-Zelllinie mit einer Translokation t(8;21) sowie einer aktivierenden c-KIT Mutation. K562 ist eine humane CML-Linie mit Nachweis von bcr-abl. Wie in Abbildung 9 gezeigt, tritt eine Wachstumshemmung der Kasumi-1-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 11.4 nM ein. Interessanterweise zeigt auch die Kasumi-1 Zelllinie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber AS703569, während dies bei K562 Zellen nicht der Fall ist. Diese Ergebnisse bestätigen damit die erhöhte Empfindlichkeit von AML-Zellen mit konstitutiv aktivierten FLT3 oder c-KIT auf eine Inhibition mit AS703569, wie es die Versuche mit den transformierten BaF3 Zellen erwarten ließen.

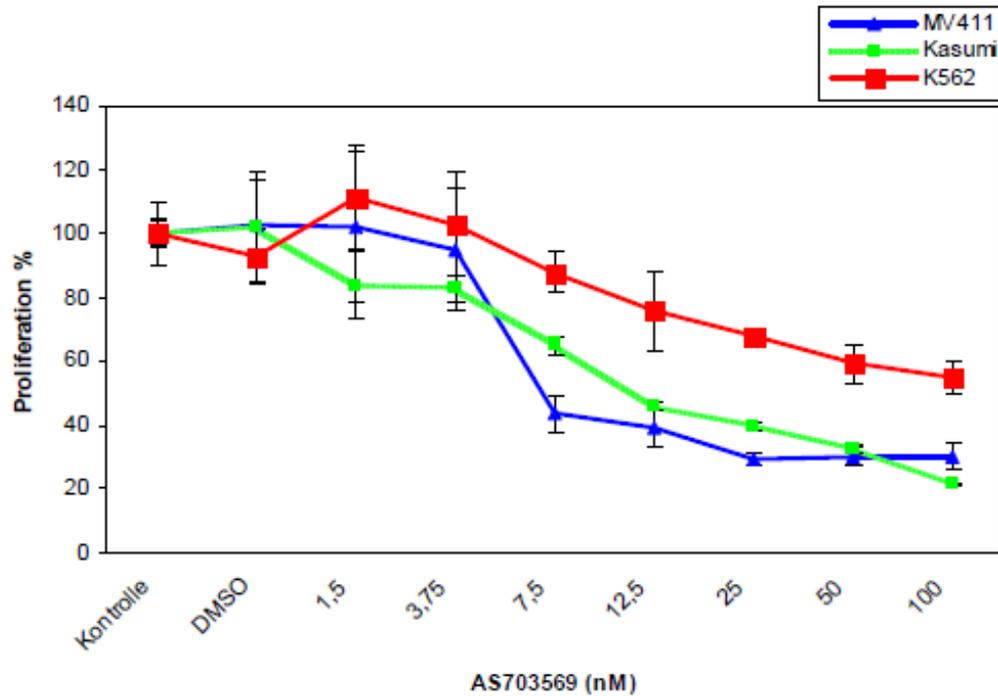


Abbildung 9: Der Aurorakinaseinhibitor hemmt die Proliferation der AML-Zelllinien MV4-11 und Kasumi-1. Die CML-Zelllinie K-562 zeigt verminderte Empfindlichkeit gegenüber AS703569. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 8 beschrieben.

### 3.2.2 AS703569 induziert Apoptose in AML-Zelllinien

Ferner wurden HL60 (akute myeloische Leukämie, M2), K-562 (chronische myeloische Leukämie) und NB-4 (akute promyelozytäre Leukämie, M3, mit dem Nachweis der Translokation t(15;17) verwendet, um eine Varianz der Zytotoxizität des Inhibitors auf verschiedene leukämische Zelllinien zu untersuchen. In einer unbehandelten Zellpopulation liegt der Anteil apoptotischer Zellen bei ca. 5%. Im nachfolgenden Experiment gilt es, die Auswirkungen des Aurorakinaseinhibitors auf die Apoptoserate humaner AML- bzw. CML-Zelllinien zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen über 48 Stunden mit AS703569 (3.75 nM und 12.5 nM) kultiviert und anschließend nach Färbung mittels Annexin V-FITC und PI durchflusszytometrisch gemessen. Durch den zytotoxischen Effekt des Inhibitors kam es bei allen Zelllinien mit Ausnahme von HL60-Zellen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Apoptose. Auch hier zeigt sich aber, dass humane Zellen, die entweder eine FLT3-ITD oder c-KIT Mutation tragen (MV4-11 oder Kasumi-1), besonders sensitiv sind. Die Kontrolle repräsentiert die sich im programmierten Zelltod befindlichen Zellen ohne Behandlung mit dem Inhibitor.

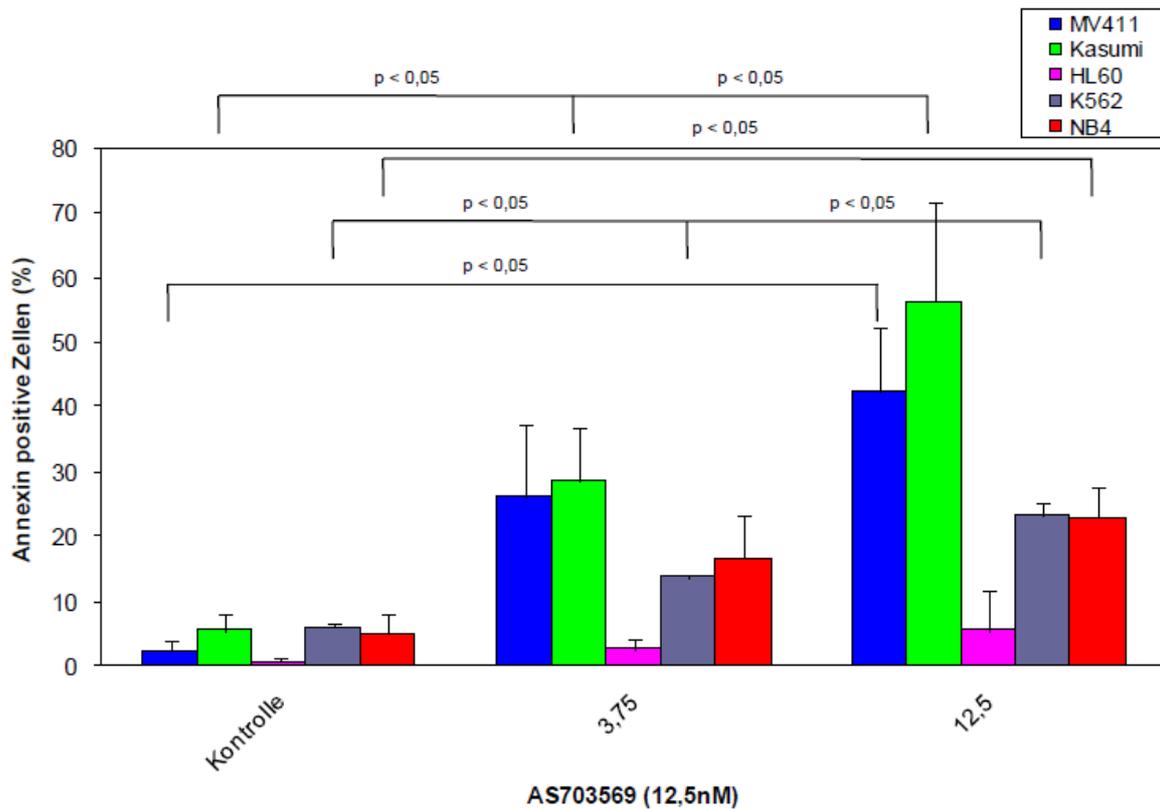


Abbildung 10: Apoptoseinduktion durch AS703569 in AML-Zelllinien.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 1ml Medium in einer 12-Wellplatte unter Zugabe von 3.75 bzw 12.5 nM AS703569 inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.3 AS703569 dephosphoryliert Histon H3 an Ser10

Eine Reduktion der Autophosphorylierung von Histon H3 an Ser10 durch den Aurorakinaseinhibitor an murinen FLT3-ITD exprimierenden Ba/F3-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden. Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Proliferation und Apoptoseinduktion humaner Zelllinien wurde ebenso veranschaulicht. Um die Wirkung des Inhibitors auf die Aurorakinase B humaner Zelllinien aufzuzeigen, wurden MV4-11-Zellen über verschiedene Zeiträume mit 12.5 nM AS703569 behandelt. Es galt einen optimalen Inkubationszeitraum für die einheitliche Durchführung nachfolgender Versuche zu finden. Mittels Western-Blot-Technik und der Verwendung spezifischer Antikörper konnte gezeigt werden, dass es bereits nach rund 30-minütiger Inkubation zu einer Reduktion der phosphorylierten Form von Histon H3 kommt. Eine Abnahme des Signals der Aurorakinasen nach 24 Stunden deutet auf einen vermehrten Zelluntergang nach Behandlung der Zellen mit AS703569 hin.

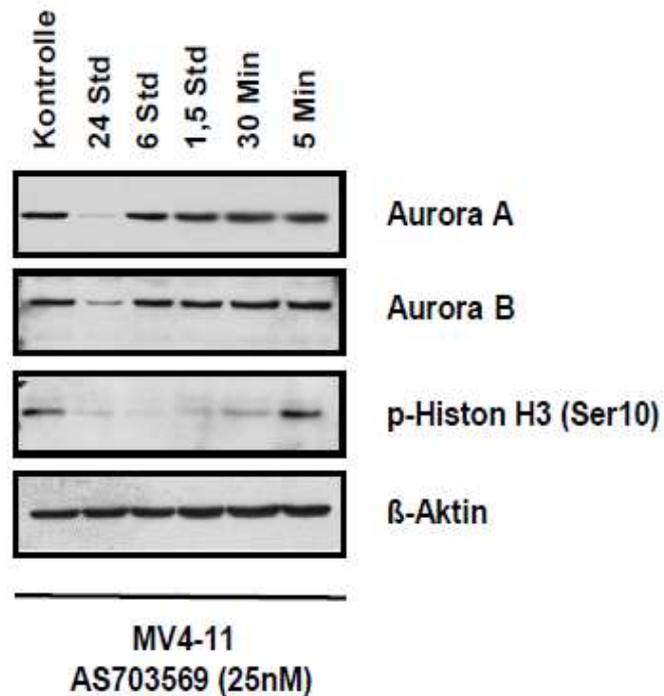


Abbildung 11: Die Behandlung von MV4-11 mit AS703569 führt zur Dephosphorylierung von Histon H3 an Ser10. Je  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 5 ml Medium unter Zugabe von 25 nM AS703569 über bestimmte Zeiträume bei 37°C inkubiert. Nach der Zellyse erfolgte die Analyse mittels Western-Blot-Technik.

Neben MV4-11 Zellen wurden weitere AML-Zelllinien mit AS703569 behandelt und die Phosphorylierung von Histon H3 untersucht. Abbildung 12 zeigt, dass es zu einer Reduktion der Phosphorylierung von Ser10 kommt, die Expression von Aurora A und B nach einer Stunde Inkubation mit dem Aurorakinaseinhibitor unverändert bleibt.

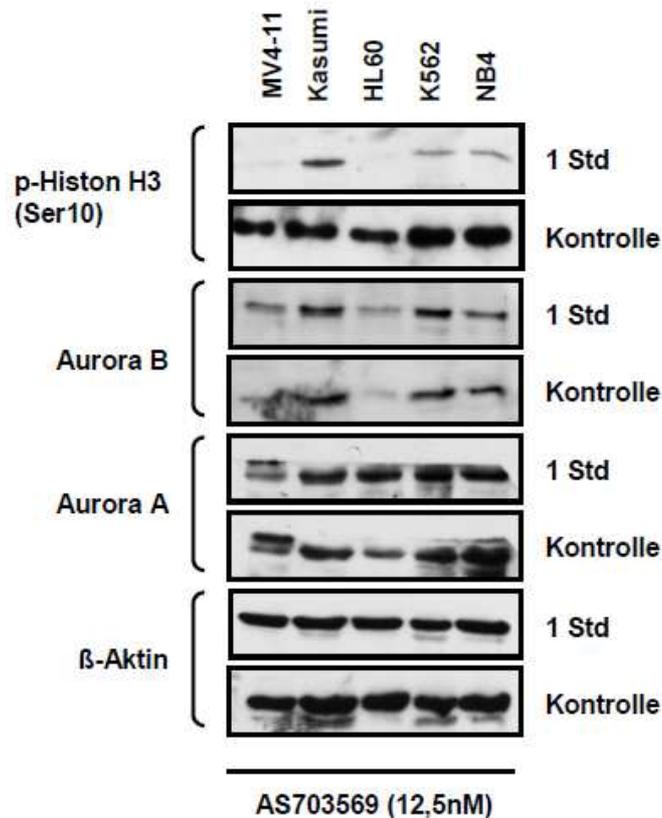


Abbildung 12: AS703569 dephosphoryliert Histon H3 an Ser10 in AML-Zelllinien. Es zeigt sich eine konstante Expression der Aurorakinasen nach einstündiger Behandlung der Zellen mit AS703569. Die Analyse erfolgte mittel Western-Blot-Technik.

### 3.2.4 Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 inhibiert die Autophosphorylierung von FLT3 und STAT5 in humanen AML-Zellen

Der wachstumsinhibitorische Einfluss von AS703569 auf murine FLT3-ITD transformierte Ba/F3-Zellen konnte bereits veranschaulicht werden. Im nachfolgenden gilt es, den Einfluss des Inhibitors auf FLT3 und dessen Signalkaskade, sowie Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von c-KIT in humanen AML-Zelllinien zu untersuchen. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, führt die Behandlung der Zellen mit dem Aurorakinaseinhibitor zu einer Inhibition der Phosphorylierung von sowohl FLT3 als auch STAT5 in MV4-11 Zellen. Während FLT3 bereits nach 10 Minuten inhibiert wird, zeigt sich eine Hemmung von STAT 5 erst nach einer Stunde. Das downstream target ERK1/2 bleibt unbeeinflusst. β-Aktin dient dem Nachweis gleichmäßig eingesetzter Proteinmengen.

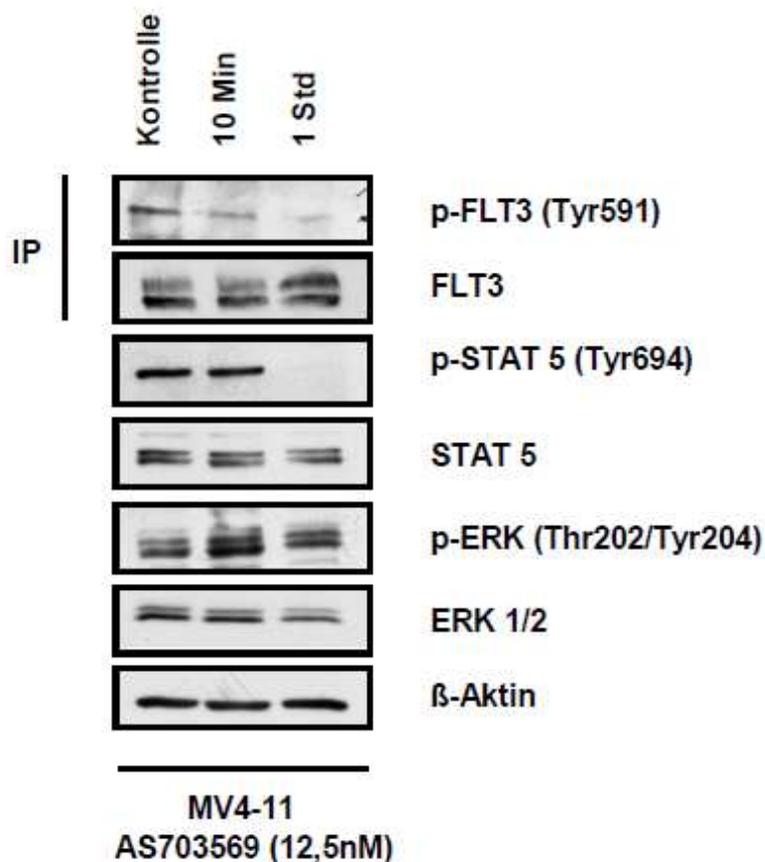


Abbildung 13: AS703569 inhibiert die Autophosphorylierung von FLT3 und STAT5, zeigte jedoch keinen Einfluss auf den nachfolgenden Signalweg ERK1/2. Je  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 5ml Medium unter Zugabe von 12.5 nM AS703569 über bestimmte Zeiträume bei 37 °C inkubiert, lysiert und mittels Western-Blot-Technik analysiert. Die Detektion von FLT3 erfolgte mittels IP mit  $\alpha$ FLT3 und anschließendem Westernblot für FLT3 und p-FLT3. Hierfür wurde 1mg Protein verwendet.

### 3.2.5 Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 hemmt die Autophosphorylierung von c-KIT

Die vorangegangenen Experimente deuten darauf hin, dass der zytotoxische Effekt des Aurorakinaseinhibitors AS703569 neben der Inhibition der Aurorakinasen A, B und C, auch auf der Hemmung anderer Rezeptortyrosinkinasen beruht. Daher untersuchten wir neben FLT3 die Autophosphorylierung von c-KIT in humanen AML Zelllinien unter der Behandlung mit dem Aurorakinaseinhibitor. Zu diesem Zweck wurden Kasumi-1-Zellen mit dem Inhibitor kultiviert, die Zellen lysiert und mittels Westernblottechnik analysiert. Es zeigte sich keine Veränderung der Gesamtproteinmenge der Aurorakinasen. Im Gegensatz hierzu ist bereits nach 10-minütiger Inkubationszeit mit AS703569 eine Reduktion der phosphorylierten Form von c-KIT an Tyr719 festzustellen.

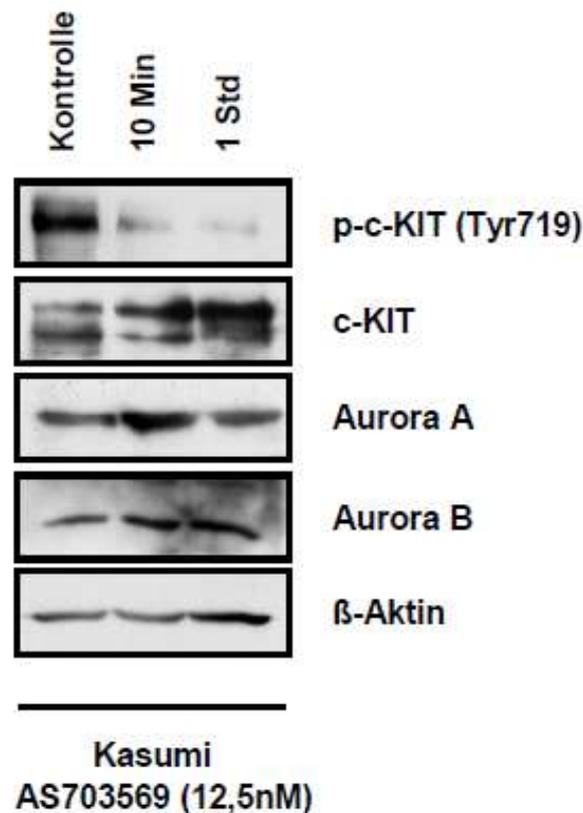


Abbildung 14: AS703569 führt zur Reduktion der Autophosphorylierung von c-KIT an Tyr719. Je  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 5 ml Medium unter Zugabe von 12.5nM AS703569 über bestimmte Zeiträume bei 37 °C inkubiert, lysiert und mittels Western-Blot-Technik. Die Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper.

### 3.3 Analyse des Wirkungsspektrums von AS703569 auf Primärzellen - weisen Patienten mit einer FLT3-ITD eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor auf?

#### 3.3.1 AS703569 induziert Apoptose in peripheren AML-Blasten

Der zytotoxische Effekt des Aurorakinaseinhibitors auf FLT3-ITD exprimierende MV4-11-Zellen konnte bereits dargestellt werden. Daher stellte sich die Frage, ob Patienten mit AML und einer nachgewiesenen FLT3-ITD Mutation eine erhöhte Sensitivität gegenüber AS703569 aufweisen. Als Vergleichsgruppe dienten Patienten mit AML ohne Nachweis einer FLT-ITD (Wildtyp). AML-Blasten aus dem peripheren Blut der Patienten bei Erstdiagnose wurden über einen Zeitraum von einer Stunde mit 12.5 nM des Inhibitors in serum-freiem Medium mit den Wachstumsfaktoren SCF, TPO, FLT3, IL-3 und hyper-IL-6 kultiviert. Es wurden insgesamt 5 Patientenproben gemessen. Unbehandelte Zellen stellen den Ausgangswert dar (Kontrolle). Die

Messung des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mittels Annexin V-FITC und PI im Durchflusszytometer.

Durch den Inhibitor kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Apoptose in beiden Gruppen. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Sensitivität gegenüber dem Inhibitor von FLT3-ITD+ AML Zellen im Vergleich zu FLT3-WT AML Zellen beobachtet werden.

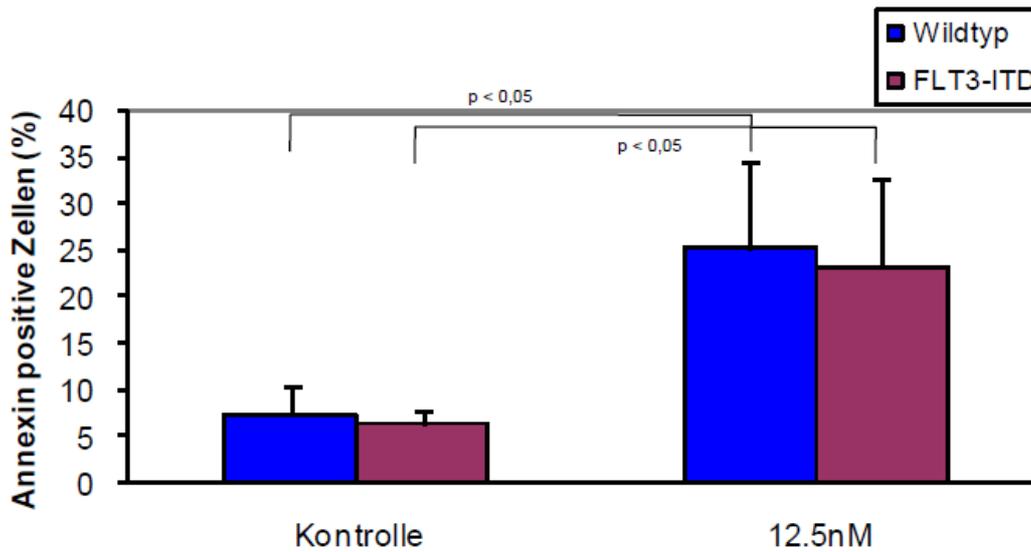


Abbildung 15: AS703569 induziert Apoptose in Primärzellen. Es zeigt sich keine erhöhte Sensitivität der FLT3-ITD exprimierenden Patientenproben gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor im Vergleich zu FLT-ITD negativen Zellen. Periphere Blutzellen wurden nach dem Auftauen ficolliert und anschließend über 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert. Später wurden diese für 1 Stunde mit 12.5 nM AS703569 behandelt. Die Messung des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Jeweils 5 Patienten pro Gruppe wurden zusammengefasst.

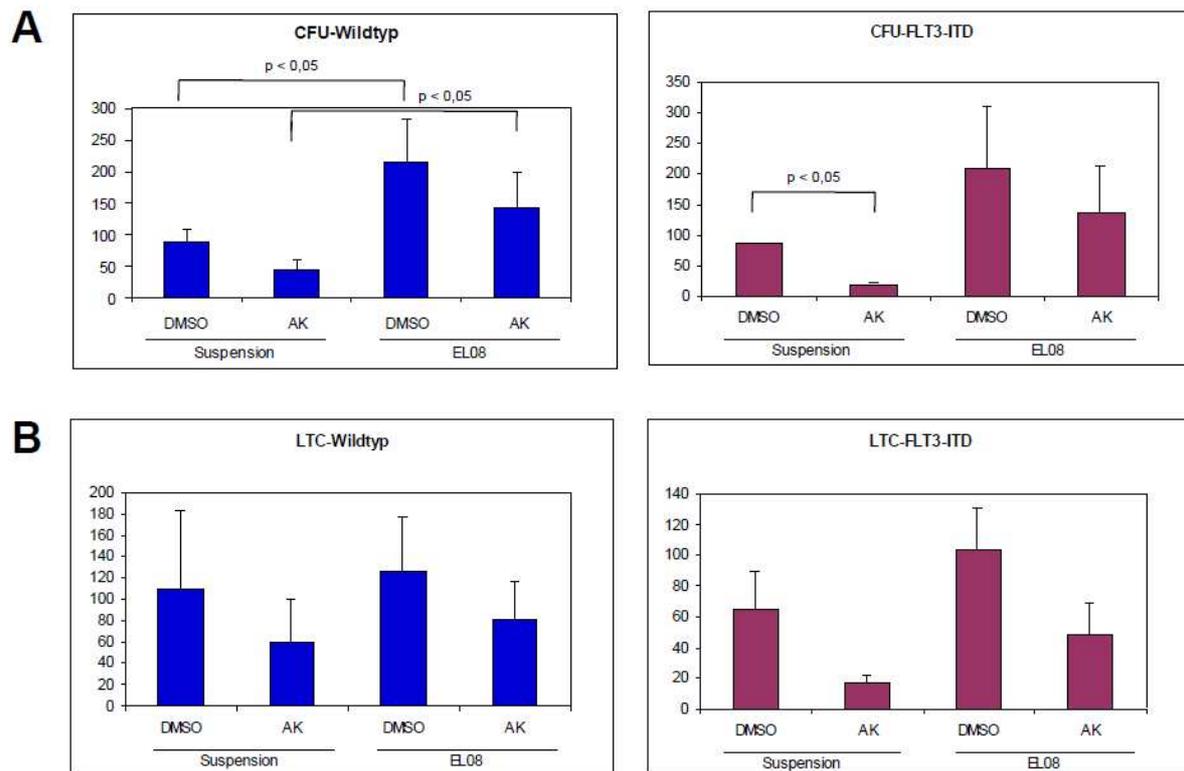
### 3.3.2 Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit humaner Knochenmarkszellen

Hämatopoetische Stammzellen sind durch Selbsterneuerungsfähigkeit und Pluripotenz charakterisiert. Ihre Fähigkeit, selbst nach mehreren Wochen in Kultur differenzierungsfähige Kolonien zu bilden, zeichnet sie aus. Im Gegensatz hierzu sind frühe hämatopoetische Vorläuferzellen befähigt, nur in Methylcellulose Kolonien, CFUs (colony forming units), auszubilden. Der in-vitro-Nachweis hämatopoetischer Stammzellen erfolgt durch Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von sechs Wochen und nachfolgender Überführung auf Methylcellulose. Stromazellen und ein spezielles Langzeitkulturnährmedium schaffen optimale Kulturbedingungen für das Überleben der Stammzellen (Eaves, Sutherland et al. 1991).

Im nachfolgenden Versuch sollte die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit von CD34+-Knochenmarkszellen veranschaulicht werden. Des Weiteren galt es, den Einfluss des Aurorakinaseinhibitors auf FLT3-ITD-Mutation exprimierende AML-Zellen und sogenannte Wildtyp-Zellen, AML-Zellen ohne FLT3-ITD-Mutation, zu differenzieren.

Nach der Separation der Knochenmarkszellen wurden diese über 48 Stunden mit AS703569 bzw. DMSO behandelt. Ferner wurde ein Teil der Zellen in Suspension, ein anderer Teil auf Stroma kultiviert. Anschließend wurden zu einem Methylzellulosekulturen, zum anderen Langzeitkulturen angelegt.

Abbildung 16 veranschaulicht, dass die Anzahl der CFUs in beiden Patientenkollektiven durch die Behandlung der Zellen mit dem Aurorakinaseinhibitor reduziert wird. Die Kultivierung der Knochenmarkszellen auf Stroma führt zu einer deutlichen Zunahme an CFUs. Es kann allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen FLT3-ITD exprimierenden Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen ausgemacht werden. In der Langzeitkultur wird dies ebenfalls bestätigt. Wiederum hemmt der Inhibitor die Ausbildung von CFUs, eine erhöhte Sensitivität FLT3-ITD Mutation tragender AML-Patienten gegenüber AS703569 kann aber nicht nachgewiesen werden. AML Zellen werden durch Kokultur auf EL08-1D2 Stromazellen vor dem Effekt von AS703569 partiell geschützt.



**Abbildung 16: Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit humaner Knochenmarkszellen.**

**A** veranschaulicht die Ausbildung von CFUs nach 48-stündiger Inkubation in Suspension bzw. auf der stromalen Zelllinie EL08 unter Zugabe von 12.5 nM AS703569 bzw. DMSO. Das Verhalten der Knochenmarkszellen bezüglich der Bildung von CFUs nach 6-wöchiger Kultivierung in Langzeitkulturmedium wird in **B** demonstriert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus jeweils 3 Patienten.

## **4 Diskussion**

Patienten mit AML haben ohne intensive Chemotherapie nur eine geringe Überlebenschance. Durch den Einsatz von Zytostatika kann in vielen Fällen eine komplette Remission erreicht werden. Trotz Erreichen einer kompletten Remission in einer hohen Prozentzahl der Fälle, erleidet die Mehrzahl der Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung ein Rezidiv. Die geringe Gesamtüberlebensrate von 20-30% der AML-Patienten gibt Anlass zur Entwicklung neuer Therapieoptionen. Der Nachweis einer ITD-Mutation in der juxtamembranösen Domäne von FLT3 korreliert negativ mit dem Gesamtüberleben und der Rezidivrate der Patienten (Kottaridis, Gale et al. 2001).

In der Vergangenheit wurden eine Reihe von RTK-Inhibitoren zur Therapie der AML entwickelt. Unter anderem gelten FLT3-Inhibitoren als erfolgsversprechend. Allerdings hat sich in laufenden Studien gezeigt, dass FLT3-Inhibitoren bisher nur transiente Remissionen erreichen können und daher nicht ausreichend effektiv sind (Levis, Ravandi et al.; Serve, Krug et al.)

Für Patienten mit FLT3-ITD müssen daher unbedingt effektivere Therapien entwickelt werden. Die nachgewiesene Überexpression von Aurorakinasen bei der AML sowie deren essentielle Bedeutung bei der Mitose macht die Aurorakinasen zu einer vielversprechenden Zielstruktur in der Therapie der AML (Andrews, Knatko et al. 2003). Einige Aurorakinaseinhibitoren wie u.a. AZD1152, ein selektiver Aurora B-Kinaseinhibitor liefern erfolgsversprechende Resultate in präklinischen und klinischen Studien (Azzariti, Bocci et al.). Merck-Serono produzierte im Jahr 2005 mit AS703569 einen weiteren Aurorakinaseinhibitor. Der Vorteil dieses Inhibitors besteht in der Aussicht, gleichzeitig Aurorakinasen sowie FLT3-ITD oder c-KIT hemmen zu können und somit möglicherweise eine gesteigerte Wirkung auf FLT3-ITD exprimierende Zellen zu haben. Diese Hypothese zu prüfen ist Ziel dieser Arbeit.

### **4.1 Das zytotoxische Potential von AS703569 gegenüber Zelllinien**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das zytotoxische Potential des Aurorakinaseinhibitors AS703569 gegenüber murinen und humanen Leukämie Zelllinien sowie primären AML Zellen zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung parentaler und FLT3-ITD transformierter Ba/F3-Zellen zu einer dosisabhängigen Proliferationshemmung sowie Apoptoseinduktion führt. Der IC<sub>50</sub>-Wert war bei den FLT3-ITD positiven Ba/F3 mit 6.9 nM niedriger als das ermittelte Ergebnis der parentalen Ba/F3-Zellen (10.8 nM), was darauf hindeutet, dass FLT3-ITD+ Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Inhibitor aufweisen. Der proliferationshemmende Effekt ist durch die Zugabe von Interleukin-3 antagonisierbar. Die Expression einer FLT3-ITD-Mutation führt in Ba/F3-Zellen zur IL-3-Unabhängigkeit. Durch Zugabe des Aurorakinaseinhibitors scheint dieses IL-3-unabhängige Wachstum inhibiert zu werden.

Das zytotoxische Potential des Inhibitors war auch auf humane Zelllinien übertragbar. Insbesondere die FLT3-ITD exprimierende Zelllinie MV-4-11 sowie die das Protoonkogen c-KIT tragende Kasumi-1-Zelllinie erwiesen sich als sehr sensitiv. Die IC<sub>50</sub>-Werte waren vergleichbar mit den Ergebnissen der murinen Zellen. Die wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung des Aurorakinaseinhibitors konnte jedoch nicht auf alle untersuchten humanen Zelllinien übertragen werden. Im Jahre 2009 wurde von McLaughlin das Wirkspektrum von AS703569 charakterisiert. Zum Erreichen einer Viabilität von 50% des Ausgangswertes waren Inhibitor-konzentrationen im unteren nM-Bereich nötig. In unseren Versuchen lag diese zwischen 6.9 bis 11.4 nM. Der IC<sub>50</sub>-Wert für MV4-11 wurde in unseren Versuchen bei 7.0 nM detektiert. In der Veröffentlichung von McLaughlin wird dieser mit 3 nM angegeben. Die Abweichung lässt sich am ehesten durch Verwendung unterschiedlicher Messmethoden erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden MTT-Assays zur Bestimmung der Proliferationsinhibition verwendet, welchen die Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes zu dunkelrotem Formazan-Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu Grund liegt. Die Proliferationsmessungen in der Publikation von McLaughlin erfolgten jedoch mittels BrdU-Assays (McLaughlin, Markovtsov et al. 2009).

PHA-739358 stellt einen weiteren vielversprechenden Panaurorakinaseinhibitor dar, welcher aktuell bereits in Phase II-Studien getestet wird. Die IC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Tumorzelllinien liegen im Vergleich zu AS703569 um ein Vielfaches höher. Für Hela-Zellen beispielsweise wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert für AS703569 von 8 nM, für PAH-739358 von 410 nM beschrieben (Carpinelli, Ceruti et al. 2007). Somit erscheint der Aurorakinaseinhibitor AS703569 sehr potent zu sein.

Auffällig ist das selektive Ansprechen einzelner humaner Zelllinien auf die Behandlung mit AS703569. Der antiproliferative Effekt des von Merck Serono entwickelten Pan-Aurorakinaseinhibitors gegenüber einer Vielzahl von Tumorentitäten wurde bereits im Jahr 2009 publiziert. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen, galten auch hier die FLT3-ITD exprimierenden MV-4-11 als sehr empfindlich gegenüber AS703569 (McLaughlin, Markovtsov et al. 2009). Ein Grund hierfür könnte sein, dass der inhibitorische Effekt von AS703569 nicht ausschließlich über die Hemmung der Aurorakinasen vermittelt wird, sondern durch Inhibition weiterer RKT, wie beispielsweise FLT-3. Fraglich ist, ob die erhöhte Sensitivität der MV4-11-Zellen ausschließlich auf dualer Inhibition der Aurorakinasen und der RTK FLT-3 beruht. AML-Patienten mit einer nachgewiesenen FLT-3-Mutation weisen einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf auf. Von großer Bedeutung wäre somit ein erhöhtes Ansprechen FLT-3-Mutation tragender Leukämiezelllinien gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor.

#### **4.2 AS703569 inhibiert die Wirkung der Aurorakinasen**

Zunächst wurde jedoch die Wirkung des Inhibitors auf die Aurorakinasen selbst bestätigt. Als optimaler Marker gilt Histon H3. Als Downstream-Target der Aurora-B-Kinase hat sich dessen Phosphorylierungsstatus an der Aminosäure Serin 10 als Aktivitätsparameter von Aurora B etabliert. Eine Reduktion der Aurora B-Kinaseaktivität resultiert in einer Abnahme der Autophosphorylierung von Histon H3 an Serin 10. Bei den MV-4-11-Zellen kam es nach einer Inkubationszeit von rund 30 Minuten mit 12.5 nM AS703569 zu einer Reduktion der phosphorylierten Form von Histon H3. Dieser Effekt war bei allen untersuchten humanen Zelllinien und den FLT3-ITD exprimierenden Ba/F3-Zellen zu beobachten. Dadurch wird bestätigt, dass AS703569 sein zytotoxisches Potential über Inhibition der Aurorakinasen, insbesondere der Aurora B-Kinase vermittelt. McLaughlin verwendete ebenfalls den intrazellulären Phosphorylierungsstatus von Histon H3. Eine 50%-ige Inhibition der Aurora-B-Kinase war bei einer Inhibitorkonzentration von 14 nM zu verzeichnen (McLaughlin, Markovtsov et al. 2009). Der IC<sub>50</sub> für Aurora B des Panaurorakinaseinhibitors PHA-739358 beispielsweise liegt erneut um ein vielfaches höher (79 nM) im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aurorakinaseinhibitor (Boss, Beijnen et al. 2009).

### 4.3 FLT3 als Targetprotein des Aurorakinaseinhibitors

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl die FLT3-ITD exprimierenden murinen BaF3-Zellen, als auch die MV4-11, welche ebenfalls diese Mutation tragen besonders sensitiv gegenüber AS703569 sind, was die Vermutung nahelegt, dass die RTK FLT3 ein weiteres Zielprotein der Panaurorakinaseinhibitor sein könnte. Bestätigt wurde dies durch Nachweis einer Inhibition von konstitutiv aktiviertem FLT3 sowie seines down-stream-targets STAT5 nach Inkubation der Zelllinien mit dem Inhibitor. Durch Behandlung der Zellen kam es zu einer Reduktion der phosphorylierten, aktivierten Form von FLT3. STAT5 ist ein wichtiges Targetmolekül downstream von FLT3-ITD, was durch den Wildtyp FLT3 Rezeptor nicht aktiviert wird (Hayakawa, Towatari et al. 2000). Eine Inhibierung der Phosphorylierung bestätigt die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf FLT3-ITD. Auch andere Aurorakinaseinhibitoren wie AZD1152 vermitteln ihr zytotoxisches Potential nicht ausschließlich über Inhibition der Aurorakinasen selbst. FLT3 wurde bereits als zusätzliche Zielstruktur des Aurora B-Kinaseinhibitors AZD1152 identifiziert (Grundy, Seedhouse et al.). AS703569 betreffend, konnte neben den Aurorakinasen FLT3 als Targetprotein von anderen bestätigt werden (McLaughlin, Markovtsov et al. 2009). Dies lässt die Existenz weiterer Zielproteine vermuten. Unklar ist jedoch, ob die zytotoxische Wirkung des Aurorakinaseinhibitor ausschließlich durch Inhibition der Aurorakinasen, insbesondere der Aurorakinase B selbst oder durch Hemmung weiterer Zielstrukturen vermittelt wird

### 4.4 c-KIT als weitere Zielstruktur von AS703569

Das Protoonkogen c-KIT zählt neben FLT3 zu den RTK der Klasse III. Dieser Rezeptor ist die Bindungsstelle für den Stammzellofaktor (SCF), welcher eine entscheidene Rolle in der Hämatopoese spielt. Physiologisch findet sich c-KIT auf 70% der hämatopoetischen Zellen. Aktivierende Mutationen dieser RTK konnten bei einem Teil der AML-Patienten identifiziert werden, besondere Bedeutung wird der AML M2 mit einer Translokation t(8;21) beigemessen (Beghini, Larizza et al. 1998, Ashman, Ferrao et al. 1999). Die 1991 entwickelte Kasumi-1-Zelllinie gilt als Modell für die AML mit der Translokation t(8;21). Neben dieser chromosomalen Alteration

konnte eine aktivierende Mutation in der Tyrosinkinasedomäne des KIT-Gens identifiziert werden (Larizza, Magnani et al. 2005).

Wir konnten mittels MTT-Proliferationsassays und Apoptoseuntersuchungen im Durchflusszytometer nachweisen, dass sowohl murine als auch humane Zelllinien, welche aktivierende Mutationen im c-KIT-Rezeptor exprimieren, sehr sensitiv gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor sind. Daraus folgend stellte sich die Frage, ob dieser Effekt durch die zusätzliche Inhibition der RTK c-KIT hervorgerufen wird. In der Westernblottechnik konnten wir eine Reduktion der phosphorylierten Form des Protoonkogens c-KIT nach Behandlung der Kasumi-1 mit 12.5 nM AS703569 über einen Zeitraum von einer Stunde detektieren. C-KIT stellt somit neben der bereits identifizierten RTK FLT3 ein weiteres Targetprotein des Inhibitors dar. Auch in anderen Untersuchungen konnte eine gesteigerte Empfindlichkeit c-KIT-Mutation tragender Zellen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren gezeigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp erwiesen sich beispielsweise c-KIT- und FLT3-Mutation tragende pädiatrische AML-Proben als signifikant sensitiver gegenüber SU11657 (Goemans, Zwaan et al.).

#### **4.5 FLT3-ITD exprimierende primäre AML-Zellen zeigen keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor**

Das zytotoxische Potential des Aurorakinaseinhibitors AS703569 auf eine Reihe von Tumorzelllinien konnte bereits aufgezeigt werden. Insbesondere FLT3- und c-KIT exprimierende Zellen gelten als besonders empfindlich. In einem weiteren Schritt wurde die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf primäres Zellmaterial untersucht. In einem ersten Schritt wurden periphere Blutzellen von AML-Patienten mit AS703569 über 48 Stunden behandelt, anschließend die Apoptosrate durchflusszytometrisch gemessen. Eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellpopulation im Vergleich zu unbehandelten Primärzellen konnte verzeichnet werden. Die durchschnittlich in Apoptose befindliche Population betrug bei den peripheren Blutzellen rund 24% nach Inkubation mit AS703569 über 48 Stunden. Bei den MV4-11-Zellen liegt dieser Anteil bei rund 42%, bei den Kasumi-1-Zellen bei 56%. Grund für das bessere Ansprechen humaner Zelllinien im Vergleich zu Primärmaterial erscheint die im Vergleich zu Zelllinien deutlich langsamere Zellteilungsgeschwindigkeit primärer Zellen zu sein. Die erhöhte Empfindlichkeit der FLT3-ITD exprimierenden

MV-4-11-Zellen gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor sollte auf primäre AML-Zellen übertragen werden. Es wurde zunächst die Apoptoseinduktion durch AS703569 in peripheren Blutzellen untersucht. Differenziert wurde zwischen FLT3-ITD tragenden Patientenproben und FLT3-Wildtyp-Zellen. Entgegen den Erwartungen konnten wir in unseren Versuchen keine höhere Apoptoseinduktion der FLT3-ITD-positiven Zellen nachweisen.

Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit humaner Knochenmarkszellen wurde im Weiteren untersucht. Hierzu wurden Langzeitkulturen mit humanen Knochenmarkszellen angelegt.

In der Langzeitkultur konnte ebenso kein Unterschied im Ansprechen auf AS703569 zwischen beiden Patientengruppen ausgemacht werden.

Dennoch konnten wir den zytotoxischen Effekt des Aurorakinaseinhibitors auch in primärem Zellmaterial nachweisen, wenn auch ohne ein eindeutige gesteigerte Sensitivität der FLT3-ITD exprimierenden AML-Patienten zu verifizieren.

Interessanterweise konnten wir in den Langzeitkulturversuchen unter Verwendung der Stromazellen darstellen, dass primäre AML Zellen in vitro durch Stromakontakt vor der Wirkung des Inhibitors geschützt werden.

Insgesamt zeigen unsere Versuche, dass sich Ergebnisse von Zelllinien (sowohl murin als auch human), nicht ohne weiteres auf primäre Zellen übertragen lassen. Primäre Zellen zeigen eine andere Wachstumskinetik, befinden sich häufiger in G0 des Zellzyklus (dies gilt besonders für leukämische Stammzellen) und sind durch die Interaktion mit der Mikroumgebung des Knochenmarks besonders geschützt. Dies unterstreicht die große Bedeutung der Testung von neuen Substanzen auch an Primärmaterial in vitro oder sogar in vivo sowie die klinische Prüfung in Phase I Studien.

#### **4.6 Aurorakinaseinhibitoren - Anwendung in klinischen Studien**

Aurorakinaseinhibitoren erscheinen ein vielversprechender Bestandteil in der Therapie der AML zu werden. Eine Reihe von Panaurorakinaseinhibitoren, als auch spezifische Aurora A und B-Inhibitoren werden bereits in Phase I und II Studien getestet. Das zytotoxische Potential von AS703569 konnte bereits in leukämischen Tumorzelllinien und leukämischen Primärzellen bestätigt werden. Im Jahr 2007 wurde von Renshaw eine Phase I Studie unter Verwendung des Aurorakinaseinhibitors AS703569 veröffentlicht. Insgesamt wurden 15 Patienten in einem fortge-

schriftlichen Stadium verschiedenster Tumorentitäten eingeschlossen. Der Aurora-Kinaseinhibitor wurde oral verabreicht. Patienten wurde in zwei Gruppen geteilt, der Inhibitor nach unterschiedlichem Schema eingenommen. Initial konnte eine gute Verträglichkeit des Aurorakinaseinhibitors AS7063569 nachgewiesen werden (J. S. Renshaw 2007). Nach Beendigung der experimentellen Versuche dieser Arbeit wurden eine Reihe weiterer Phase-I Studien veröffentlicht, welche eine starke Toxizität der Substanz auf die normale Hämatopoese zeigen, ohne dass sie eine dauerhafte Unterdrückung der AML bewirken konnte. Die klinische Entwicklung des Aurorakinaseinhibitors AS703569 wurde schließlich trotz viel versprechender in vitro Ergebnisse daher für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie nicht weiter verfolgt worden.

Andere Aurorakinaseinhibitoren wie der selektive Aurora B-Kinaseinhibitor AZD1152 (Astra-Zeneca) werden noch weiter in klinischen Phase I/II Studien getestet (Lowenberg, Muus et al. 2011). Die Ergebnisse dieser laufenden Studien bleiben abzuwarten. Mittlerweile sind Tyrosinkinaseinhibitoren der 3. Generation für FLT3-ITD verfügbar, die derzeit ebenfalls in klinischen Studien geprüft werden. Die Zeit wird zeigen, ob sich diese Inhibitoren als effektiver in der Behandlung der FLT3-ITD+ -AML erweisen und die desolante Prognose dieser Erkrankung verbessern können. Bisher haben diese Patienten selbst nach einer erfolgreichen allogenen Stammzelltransplantation eine sehr schlechte Prognose.

## **5 Zusammenfassung**

Der Entwicklung von Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren als weitere Therapiesäule in der Behandlung maligner hämatopoetischer Erkrankungen sowie maligner solider Tumoren kommt große Bedeutung zu. Seit der Entdeckung der Aurorakinasen und ihrer Assoziation zur Entstehung maligner Neoplasien wurden eine Reihe von Aurorakinaseinhibitoren entwickelt.

AS703569 ist ein im Jahr 2005 von Merck-Serono hergestellter Pan-Aurorakinaseinhibitor.

Die Identifikation des vermehrten Auftretens von Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3, insbesondere der FLT-ITD-Mutation bei AML-Patienten in Assoziation mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf gibt Anlass, spezifische Therapien insbesondere für Patienten mit einer nachgewiesenen FLT3-ITD-Mutation zu entwickeln.

In dieser Arbeit konnte die wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung von AS703569 sowohl gegen murine als auch humane Zelllinien aufgezeigt werden. Dabei wiesen sowohl FLT3-ITD sowie c-KIT exprimierende Zelllinien eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Aurorakinaseinhibitor auf. Das zytotoxische Potential von AS703569 konnte teilweise auch auf primäres Zellmaterial übertragen werden. Periphere Blutzellen von AML-Patienten zeigen nach Inkubation mit dem Inhibitor eine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Die Ausbildung von CFUs primärer Knochenmarkzellen konnte ebenso durch Behandlung der Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor reduziert werden.

Eine erhöhte Sensitivität FLT-ITD exprimierender Patientenproben gegenüber dem Inhibitor konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

---

**Literaturverzeichnis**

- Andrews PD (2005). "Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon?" Oncogene **24**(32): 5005-15.
- Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR (2003). "Mitotic mechanics: the auroras come into view." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 672-83.
- Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE (2001). "Acute myeloid leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 62-86.
- Ashman, LK, Ferrao P, Cole SR, Cambareri AC (1999). "Effects of mutant c-Kit in early myeloid cells." Leuk Lymphoma **34**(5-6): 451-61.
- Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991). "Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation." Blood **77**(9): 2031-6.
- Avanzi GC, Lista P, Giovinazzo B, Miniero R, Saglio G, Benetton G, Coda R, Cattoretto G, Pegoraro L (1988). "Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features." Br J Haematol **69**(3): 359-66.
- Azzariti A, Bocci G, Porcelli L, Fioravanti A, Sini P, Simone GM, Quatralo AE, Chiarrappa P, Mangia A, Sebastian S, Del Bufalo D, Del Tacca M, Paradiso A (2011) "Aurora B kinase inhibitor AZD1152: determinants of action and ability to enhance chemotherapeutics effectiveness in pancreatic and colon cancer." Br J Cancer.
- Beghini A, Larizza L, Cairoli R, Morra E (1998). "c-kit activating mutations and mast cell proliferation in human leukemia." Blood **92**(2): 701-2.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol **33**(4): 451-8.
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan B, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny N, Slamon DJ, Plowman GD (1998). "A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." EMBO J **17**(11): 3052-65.
- Blume-Jensen P and Hunter T (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.
- Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M (2000). "c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases." J Leukoc Biol **67**(2): 135-48.
- Boss DS, Beijnen JH, Schellens JH (2009). "Clinical experience with aurora kinase inhibitors: a review." Oncologist **14**(8): 780-93.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD, Cancer and Leukemia Group B ( CALGB 8461) (2002). "Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)." Blood **100**(13): 4325-36.
- Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Löwenberg B, Reilly JT (2003). "Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 in core binding factor (CBF) acute myeloid leukemias." Br J Haematol **121**(5): 775-7.
- Carmena M and Earnshaw WC (2003). "The cellular geography of aurora kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 842-54.
- Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D (1996). "Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias." Blood **87**(3): 1089-96.
- Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML, Cappella P, Gianellini L, Croci V, Degrassi A, Texido G, Rocchetti M, Vianello P, Rusconi L, Storici P, Zugnoni P, Arrigoni C, Soncini C, Alli C, Patton V, Marsiglio A, Ballinari D, Pesenti E, Fancelli D, Moll J (2007). "PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer." Mol Cancer Ther **6**(12 Pt 1): 3158-68.
- Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK (2006). "Aurora kinases: new targets for cancer therapy." Clin Cancer Res **12**(23): 6869-75.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." Oncogene **23**(16): 2825-37.
- Cheetham GM, Knegt RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA, Austen DA (2002). "Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase." J Biol Chem **277**(45): 42419-22.
- Cindy L. Miller, C. J. E., Ed. (2001). Hematopoietic Stem Cell Protocols  
Long-Term Culture-Initiating Cell Assays for Human and Murine Cells.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature **270**(5635): 347-9.

- Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson IR, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H (2004). "Use of c-KIT/PDGFRα mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group." Eur J Cancer **40**(5): 689-95.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ (2005). "The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia." Blood **105**(7): 2640-53.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe H, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003). "Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores." J Cell Biol **161**(2): 267-80.
- Drexler HG (1996). "Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells." Leukemia **10**(4): 588-99.
- Eaves CJ, Sutherland HJ, Cashman JD, Otsuka T, Lansdorp PM, Humphries RK, Eaves AC, Hogge DE (1991). "Regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term marrow culture." Semin Hematol **28**(2): 126-31.
- Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JC, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzing J, Rose-John S (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-5.
- Giet R and Glover DM (2001). "Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis." J Cell Biol **152**(4): 669-82.
- Giet R, McLean D, Descamps S, Lee MJ, Raff JW, Prigent C, Glover DM (2002). "Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules." J Cell Biol **156**(3): 437-51.
- Giet R and Prigent C (1999). "Aurora/lpl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases." J Cell Sci **112 ( Pt 21)**: 3591-601.
- Gilliland DG and Griffin JD (2002). "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." Blood **100**(5): 1532-42.
- Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." Cell **81**(1): 95-105.
- Goemans BF, Zwaan CM, Cloos J, de Lange D, Loonen AH, Reinhardt D, Hählen K, Gibson BE, Creutzig U, Kaspers GJ (2010) "FLT3 and KIT mutated pediatric acute myeloid leukemia (AML) samples are sensitive in vitro to the tyrosine kinase inhibitor SU11657." Leuk Res **34**(10): 1302-7.

- Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ (2003). "Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer." Clin Cancer Res **9**(4): 1420-6.
- Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J (2005). "FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model." Blood **105**(12): 4792-9.
- Grundy M, Seedhouse C, Shang S, Richardson J, Russell N, Pallis M (2010) "The FLT3 internal tandem duplication mutation is a secondary target of the aurora B kinase inhibitor AZD1152-HQPA in acute myelogenous leukemia cells." Mol Cancer Ther **9**(3): 661-72.
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T (2000). "Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines." Oncogene **19**(5): 624-31.
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells." Cell **114**(5): 585-98.
- Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K, Urano T (2000). "Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway." Oncogene **19**(24): 2812-9.
- Honda R, Korner R, Nigg EA (2003). "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis." Mol Biol Cell **14**(8): 3325-41.
- Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H (2007). "A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia." Mol Cancer Ther **6**(6): 1851-7.
- Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y (1999). "Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lpl1-related protein kinase, AIK3." J Biol Chem **274**(11): 7334-40.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R (1999). "Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia." Blood **93**(9): 3074-80.
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi S, Ohno R, Saito H, Naoe T (1998). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product." Leukemia **12**(9): 1333-7.

- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC (2001). "The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials." Blood **98**(6): 1752-9.
- Kunitok N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T (2003). "CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function." Dev Cell **5**(6): 853-64.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P (1987). "Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines." Blood **70**(1): 192-9.
- Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R (1991). "NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3)." Blood **77**(5): 1080-6.
- Larizza L, Magnani I, Beghini A (2005). "The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia." Leuk Lymphoma **46**(2): 247-55.
- Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, Friess H, Sen S (2003). "Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer." Clin Cancer Res **9**(3): 991-7.
- Liu Q, Kaneko S, Yang L, Feldman RI, Nicosia SV, Chen J, Cheng JQ (2004). "Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215." J Biol Chem **279**(50): 52175-82.
- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y (2001). "Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy." Leuk Res **25**(7): 571-6.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). "Acute myeloid leukemia." N Engl J Med **341**(14): 1051-62.
- Lozzio CB and Lozzio BB (1973). "Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen." J Natl Cancer Inst **50**(2): 535-8.
- Lyman SD and Jacobsen SE (1998). "c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities." Blood **91**(4): 1101-34.
- Malaise M, Steinbach D, Corbacioglu S (2009). "Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia." Curr Hematol Malig Rep **4**(2): 77-82.

- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidyserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-56.
- Marumoto T, Zhang D, Saya H (2005). "Aurora-A - a guardian of poles." Nat Rev Cancer **5**(1): 42-50.
- 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 T, Parmer M, Romane A, Clemens G, Grossbard G, Qu K, Jenkins Y, Kinoshita T, Taylor V, Holland SJ, Argade SJ, Singh R, Pine P, Payan DG, Hitoshi Y (2009). "Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569 identified through an image-based phenotypic screen." J Cancer Res Clin Oncol.
- Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S (2001). "Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers." Int J Cancer **92**(3): 370-3.
- Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD (2007). "Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?" Blood **109**(2): 431-48.
- Nowakowski J, Cronin CN, McRee DE, Knuth MW, Nelson CG, Pavletich NP, Rogers J, Sang BC, Scheibe DN, Swanson RV, Thompson DA (2002). "Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography." Structure **10**(12): 1659-67.
- O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, Hannah AL, Louie SG, Hong W, Stopeck AT, Silvermann LR, Lancet JE, Karp JE, Albitar M, Cherrington JM, Giles FJ (2004). "Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia." Leuk Res **28**(7): 679-89.
- Oostendorp RA, Harvey K, Dzierzak EA (2005) "Generation of murine stromal cell lines: models for the microenvironment of the embryonic mouse aorta-gonadomesonephros region." Methods Mol Biol **290**: 163-72.
- Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M (2002). "Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability." Cancer Res **62**(18): 5168-77.
- Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn JP (1984). "Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro." Nature **309**(5964): 126-31.

- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK (2007). "Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 392-7.
- Renshaw JS, Patnaik A, Gordon M, Beeram M, Fischer D, Gianella-Borradori A, Lin C, Mendelson D (2007). "A phase I two arm trial of AS703569 (R763), an orally available aurora kinase inhibitor, in subjects with solid tumors: preliminary results " Journal of Clinical Oncology **Vol 25**.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (2008). "SEER Cancer Statistics Review." [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/).
- Rodriguez-Tarduchy G, Collins M, Lopez-Rivas A (1990). "Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores." EMBO J **9**(9): 2997-3002.
- Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, Tarricone C, Areces LB, Schneider TR, Stukenberg PT, Musacchio A (2005). "Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin." Mol Cell **18**(3): 379-91.
- Sonet A (2008). "Phase I, Dose-Escalation Study of 2 Dosing Regimens of AS703569, An Inhibitor of Aurora and Other Kinases, Administered Orally in Patients with Advanced Hematological Malignancies", 50th ASH Annual Meeting and Exposition, Abstract # 2963.
- Steffen B, Muller-Tidow C, Schwäble J, Berdel WE, Serve H (2005). "The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia." Crit Rev Oncol Hematol **56**(2): 195-221.
- Swedlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008). "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues." Lyon, FRANCE: IARC Press: 109-138.
- Tang C, Lin CY, Tang TK (2006). "Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis." Dev Biol **290**(2): 398-410.
- Tefferi A (2008). "The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek." Leukemia **22**(1): 3-13.
- Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA (1998). "Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation." J Cell Sci **111 ( Pt 23)**: 3497-506.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-302.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T (2001). "Activat-

ing mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." Blood **97**(8): 2434-9.

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H, Yokoyama A (2007). "AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo." Blood **110**(6): 2034-40.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S (1998). "Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." Nat Genet **20**(2): 189-93.

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	FAB-Klassifikation der AML	2
Tabelle 2	WHO-Klassifikation der AML	3

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	„Two-hit“ Hypothese als Entstehungsmodell einer de novo AML	5
Abb. 2	Struktur der Aurorakinasen	9
Abb. 3	Charakteristika der in der Arbeit verwendeten Patientenproben	18
Abb. 4	Versuchsaufbau LTC	26
Abb. 5	Der Aurorakinaseinhibitor AS703569 hemmt die Proliferation von parentalen, FLT3-ITD und c-KIT exprimierenden Ba/F3-Zellen	31
Abb. 6	AS703569 führt zu Apoptoseinduktion in FLT3-ITD transformierten Ba/F3-Zellen	32
Abb. 7	AS703569 führt zur Hemmung der Autophosphorylierung von Histon H3 an Ser 10, FLT3 an Tyr591 und STAT5 an Tyr694	34
Abb. 8	Proliferationsassay zur Bestimmung der Empfindlichkeit von MV4-11 auf AS703569	35
Abb. 9	Der Aurorakinaseinhibitor hemmt die Proliferation der AML-Zelllinien MV4-11 und Kasumi-1	36
Abb. 10	Apoptoseinduktion durch AS703569 in AML-Zelllinien	37
Abb. 11	Die Behandlung von MV4-11 mit AS703569 führt zur Dephosphorylierung von Histon H3 an Ser10	38
Abb. 12	AS703569 dephosphoryliert Histon H3 an Ser10 in AML-Zelllinien	39

Abb. 13	AS703569 inhibiert die Autophosphorylierung von FLT3 und STAT5 zeigte jedoch keinen Einfluss auf den nachfolgenden Signalweg ERK1/2	40
Abb. 14	AS703569 führt zur Reduktion der Autophosphorylierung von c-KIT an Tyr719	41
Abb. 15	AS703569 induziert Apoptose in Primärzellen	42
Abb.16	Die inhibitorische Wirkung von AS703569 auf die Differenzierungs- und Teilungsfähigkeit humaner Knochenmarkszellen	44

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv-Doz. Dr. Katharina Götze für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themas. Herzlichen Dank für die herausragende Betreuung im Rahmen dieser Arbeit. Ganz besonders schätze ich, dass sie mir während meiner Arbeit nicht nur fachlich, sondern auch menschlich stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Möglichkeit, meine Dissertation im hämatologischen Forschungslabor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar anfertigen zu dürfen, danke ich Herrn. Prof. Dr. Christian Peschel.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Stefanie Marz für die Einarbeitung im Erlernen von Arbeitstechniken und für ihre Unterstützung im Laboralltag. Herrn Priv-Doz. Dr. Robert A.J. Oostendrop danke ich für die allseits fachliche Unterstützung während der Durchführung der Experimente. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die fachkundige Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Erstellung dieser Arbeit stets unterstützt haben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass übernommene Ausführungen anderer Autoren sowie eng an den Gedankengängen Anderer anlehrende eigene Ausführungen entsprechend gekennzeichnet sind und alle verwendeten Quellen zitiert wurden. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

