

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar

## **Untersuchungen zur Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren in Myc-induzierten Lymphomen**

Daniela Michaela Mooser

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

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Ch. Peschel  
2. Prof. Dr. F. Ch. Bassermann

Die Dissertation wurde am 26.01.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2016 angenommen.



Gewidmet meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Zellzyklusregulation als zentrales Element der Tumorentstehung.....	1
1.1.1 Physiologischer Zellzyklus .....	1
1.1.2 Regulation des Zellzyklus .....	3
1.1.2.1 Restriktionspunkt in der späten G1-Phase .....	4
1.1.2.2 Restriktionspunkt am Ende der G2-Phase.....	4
1.1.2.3 Restriktionspunkt in der Metaphase.....	5
1.1.3 Irreguläre Zellteilung.....	5
1.2 <i>MYC</i> -Protoonkogen.....	6
1.2.1 Funktion .....	6
1.2.2 Überexpression in Tumoren .....	7
1.3 Aurora Kinasen .....	8
1.3.1 Aurora Kinase A.....	9
1.3.2 Aurora Kinase B.....	10
1.3.3 Aurora Kinase C.....	11
1.4 Aurora Kinase Inhibitoren.....	12
1.4.1 R763/AS703569 .....	12
1.4.2 MLN 8237 (Alisertib) .....	13
1.5 Aurora Kinasen werden in Myc-induzierten Lymphomen überexprimiert.....	13
2 Problemstellung und Zielsetzung .....	15

3	Material und Methoden .....	17
3.1	Materialien .....	17
3.1.1	Arbeitsgeräte und Zubehör .....	17
3.1.2	Verbrauchsmaterial .....	18
3.1.3	Chemikalien .....	19
3.1.4	Kits .....	21
3.1.5	Antikörper .....	21
3.1.6	Puffer .....	22
3.1.7	Primer .....	24
3.1.8	Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide .....	24
3.1.9	Medien.....	25
3.1.10	Zelllinien .....	26
3.1.11	Softwareprogramme .....	26
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Zellkultur.....	27
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl .....	27
3.2.3	MTT-Assay .....	28
3.2.4	Durchflusszytometrie .....	28
3.2.4.1	Zellzyklusanalyse .....	28
3.2.4.2	FACS-Analyse der GFP-Expression.....	28
3.2.5	Real-time PCR.....	29
3.2.5.1	Arbeitsabläufe bei der quantitativen real-time PCR .....	29
3.2.5.2	Titerkontrolle nach Infektion mit der siRNA library .....	30
3.2.6	Western Blot.....	31
3.2.6.1	Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung nach Bradford .....	31
3.2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	31

3.2.6.3	Nass-Transfer .....	31
3.2.6.4	Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper .....	32
3.2.6.5	Entwickeln.....	32
3.2.7	Transfektion .....	32
3.2.7.1	Lipofektion .....	33
3.2.7.2	Retrovirale Transduktion.....	33
3.2.8	Transduktion der siRNA- und der cDNA library .....	34
3.2.8.1	Lipofektion .....	34
3.2.8.2	Konzentration des Virusüberstands.....	34
3.2.8.3	Lentivirale Transduktion .....	34
3.2.8.4	Modifikationen im Protokoll.....	35
3.2.8.5	Transduktion der cDNA library .....	35
3.2.9	Statistische Analysen.....	35
4	Ergebnisse .....	36
4.1	Ermittlung einer geeigneten Konzentration des Aurora Kinase Inhibitors .....	36
4.1.1	25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/ AS703569 (Pan-Aurora Kinase Inhibitor) als wachstumshemmende Wirkstoffkonzentration .....	36
4.1.2	Geringeres Ansprechen auf den Aurora A-spezifischen Inhibitor MLN8237 .....	38
4.2	Untersuchung von Lymphomzellen mit Mutation von <i>AURKA</i> beziehungsweise <i>AURKB</i> .....	39
4.2.1	Infizierte Lymphomzellen zeigen deutliche Überexpression von Aurora A und B .....	39
4.2.2	Aurora B-Mutante besitzt wirkungsvolle Resistenz gegenüber R763/AS703569 .....	41
4.3	Evaluation von Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren.....	43
4.3.1	Infektion von Myc-Lymphomzellen mit siRNA library .....	43

4.3.1.1	Etablierung einer Methode zur Infektion mit der siRNA library .....	43
4.3.1.2	Titerkontrolle nach Infektion mit der siRNA library mittels real time PCR .....	44
4.3.1.3	Keine erfolgreiche Infektion der Lymphomzelllinien möglich.....	45
4.3.2	Infektion von NIH 3T3 Myc- Zellen mit der siRNA library.....	46
4.3.2.1	NIH Myc Zellen zeigen höhere Sensitivität gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren im Vergleich zu Kontrollzellen .....	47
4.3.2.2	Erfolgreiche Infektion der NIH Myc Zellen mit siRNA library .....	48
4.3.3	Erfolgreiche Infektion der NIH Myc-Zellen mit einer cDNA library.....	49
4.3.4	Keine Entwicklung von Resistenzen gegenüber AKI bei den infizierten NIH Myc Zellen .....	50
4.4	Überexpression von Bcl-2 vermittelt Resistenz gegenüber AKI .....	52
5	Diskussion .....	57
5.1	Aurora Kinase Inhibition führt zu Polyploidie und Zelluntergang bei Myc- Lymphomzellen.....	59
5.2	Methodische Aspekte bezüglich des Screenings auf Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren.....	61
5.3	Überexpression von Bcl-2 geht mit verminderter Sensitivität gegenüber AKI einher .....	64
5.4	Beurteilung von Genen, welche Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln können .....	65
5.5	Biomarker für Ansprechen auf Aurora Kinase Inhibitoren als wichtige Elemente in der Therapie von Krebserkrankungen.....	67
6	Zusammenfassung.....	68
7	Anhang .....	i
7.1	Literaturverzeichnis.....	i
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	xviii

7.3	Tabellenverzeichnis.....	xx
7.4	Danksagung.....	xxi

## Abkürzungsverzeichnis

°C: Grad Celsius

ABCB1: *ATP-binding cassette sub-family B member 1*

ABCG2: *ATP-binding cassette sub-family G member 2*

ABC-Transporter: *ATP binding cassette- Transporter*

ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*

AKI: Aurora Kinase Inhibitor

AML: akute myeloische Leukämie

APC: *anaphase promoting complex*

APS: Ammoniumpersulfat

ATP: Adenosintriphosphat

AURKA: Aurora Kinase A (Gen)

Aurka: Aurora Kinase A (Protein)

AURKB: Aurora Kinase B (Gen)

Aurkb: Aurora Kinase B (Protein)

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BCR: *Breakpoint cluster region*

BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*

bHLHZip: *basic Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper*

BSA: Bovines Serumalbumin

Cdc20/ 25: *cell-division cycle protein 20/ 25*

CDK: *cyclin-dependent kinase*

cDNA: *complementary DNA*

CENP-A: *centromere protein A*

Cip: *CDK interacting protein*

CKI: CDK-Inhibitor-Protein

CML: chronisch myeloische Leukämie

*c-MYC: cellular myelocytomatosis oncogene*

CPC: *chromosomal passenger complex*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

dNTP: desoxy-Nukleosidtriphosphate

DPBS: *Dulbecco's phosphate buffered saline*

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

FACS: *fluorescence-activated cell sorting*

FCS: Fetales Kälber Serum

FLT 1: *Fms-related tyrosine kinase 1*

FLT 3: *Fms-related tyrosine kinase 3*

g: Gramm

G0: *gap 0*

G1: *gap 1*

G2: *gap 2*

GFP: *green fluorescent protein*

HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*

IC 50: mittlere inhibitorische Konzentration

INCENP: *inner centromere protein*

Kip: *Kinase inhibitory protein*

l: Liter

mA: Milliampere

MAX: *myc-associated factor X*

MDM2: *murine double minute oncogene*

MDR1: *Multidrug-Resistance-Protein 1*

MIG: MSCV IRES GFP

ml: Milliliter

mm: Millimeter

mM: millimolar

MOI: *Multiplicity of infection*

MPF: *Maturation promoting factor*

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Myc: Myelocytomatosis

NaF: Natriumfluorid

NEAA: Nichtessentielle Aminosäuren

nM: nanomolar

NSCLC: *Non-Small Cell Lung Cancer*

Oligo-dT: Oligo-desoxy-Thymidine

P53: Protein 53

PBS: *phosphate buffered saline*

PBST: *phosphate buffered saline + Tween*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PI: Propidium Iodid

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF: Polyvinylidenfluorid

Rb: Retinoblastom

RNA: Ribonukleinsäure

RNase: Ribonuklease

rpm: *revolutions per minute*

RT: Reverse Transkriptase

RT-PCR: *real-time Polymerase Chain Reaction*

S: *synthesis*

SAC: *spindle-assembly checkpoint*

SDS: Natriumdodecylsulfat

Ser: Serin

shRNA: *short hairpin RNA*

siRNA: *small interfering RNA*

TEMED: Tetramethylethyldiamin

thCD2: *trunkated human CD2*

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UB: Ubiquitin

UCR1: *Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex*

WPRES: *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

µM: mikromolar

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellzyklusregulation als zentrales Element der Tumorentstehung

### 1.1.1 Physiologischer Zellzyklus

Ein funktionierender Zellzyklus ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Zellteilung und somit für Wachstum und Zellerneuerung. Kommt es während der Zellteilung zu Fehlern oder Störungen, so kann dies bei Versagen der Kontrollmechanismen zu unkontrollierter Zellteilung und damit zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs führen.

Der physiologische Zellzyklus wird charakterisiert durch die Mitose, in welcher die Zellteilung stattfindet, sowie die Interphase, welche aus G1-Phase, S-Phase und G2-Phase besteht und etwa 95% des Zellzyklus ausmacht. Ruhende Zellen befinden sich in der G0-Phase, in der sie entweder verbleiben, aus der sie aber auch wieder in den Zellzyklus eintreten können (Cooper 1998).

Während der Interphase liegen die Chromosomen dekondensiert vor. Dabei ist die Zelle metabolisch aktiv, sie wächst und synthetisiert wichtige Proteine für die Genomverdoppelung. In der nachfolgenden S-Phase findet dann die DNA-Replikation statt, sodass am Ende Zwei-Chromatid-Chromosomen bestehen. Die G2-Phase dient der Zelle zur Vorbereitung auf die Mitose und besteht vornehmlich aus Proteinsynthese und Zellwachstum.

Hat die Zelle die Interphase durchlaufen, so kann sie in die Mitose eintreten, während derer wiederum verschiedene Phasen absolviert werden.

In der Prophase kondensiert sich das Chromatin, und es beginnt die Ausbildung des Spindelapparats, ausgehend von den Centriolen, welche zu den gegenüberliegenden Seiten der Zelle wandern und so die Spindelpole bilden. Die Prometaphase bezeichnet die Auflösung der Kernmembran. Während der darauffolgenden Metaphase heften sich die Mikrotubuli der

Spindelfasern an die Kinetochoren der Chromosomen und die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Nun werden die Zwei-Chromatid-Chromosomen getrennt, und die so entstandenen Ein-Chromatid-Chromosomen wandern zu den entgegengesetzten Polen der Zelle. Diesen Vorgang bezeichnet die Anaphase. Daraufhin bilden sich in der Telophase neue Kernmembranen, die Chromosomen dekondensieren wieder und der Spindelapparat wird aufgelöst. Es folgt schließlich die Zytokinese unter Neubildung der Zytoplasmamembran, was im Entstehen zweier genetisch identischer Tochterzellen resultiert (Cooper 2000; Janning, Knust 2008; Knippers 2006).

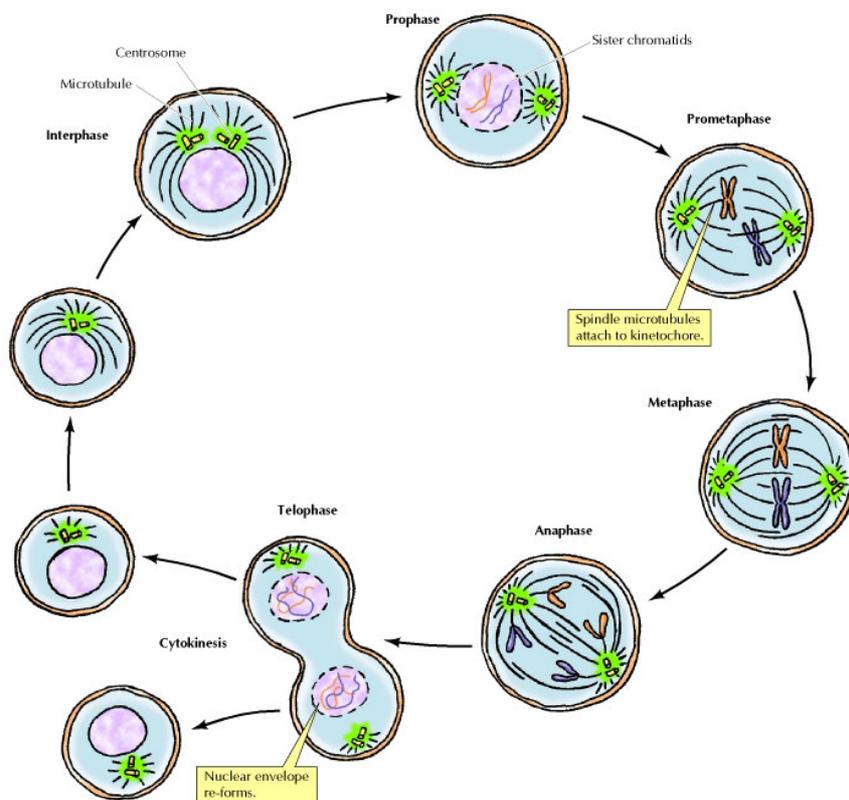


Abbildung 1: **Zellzyklusstadien.** Interphase, Mitose (Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase). (Cooper 2000)

## 1.1.2 Regulation des Zellzyklus

Fehler im Ablauf des Zellzyklus können schwerwiegende Konsequenzen wie eine Entartung der Zelle und daraufhin die Entstehung von Krebserkrankungen und Tumoren zur Folge haben (Hartwell, Kastan 1994).

Um einen regelrechten Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten, ist es daher notwendig, dass alle Vorgänge streng reguliert werden.

Hierbei sind verschiedene Kontrollpunkte bekannt. Diese befinden sich in der späten G1-Phase, am Ende der G2-Phase sowie in der Metaphase, und stellen sicher, dass die Zelle alle Voraussetzungen erfüllt, um in die nächste Zyklusphase eintreten zu können. Ist dies nicht der Fall, so wird der Zellzyklus an dieser Stelle angehalten und der Fehler behoben, bzw. falls das nicht möglich ist, die Apoptose der Zelle eingeleitet.

Die Regulationseinheiten bestehen aus periodisch aktivierbaren Proteinkinasen, den sogenannten Cyklin-abhängigen Kinasen (CDK), welche wiederum durch mehrere Mechanismen gesteuert werden. Hierbei werden die CDKs durch Bindung von Cyklinen aktiviert, sowie durch CDK-Inhibitor-Proteine (CKI), welche eingeteilt werden in die Ink4-Familie und die Cip/Kip-Familie, inhibiert und können durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen sowohl aktiviert als auch gehemmt werden (Rassow 2008; Lodish 2000; Loyer et al. 2005; Vermeulen et al. 2003).

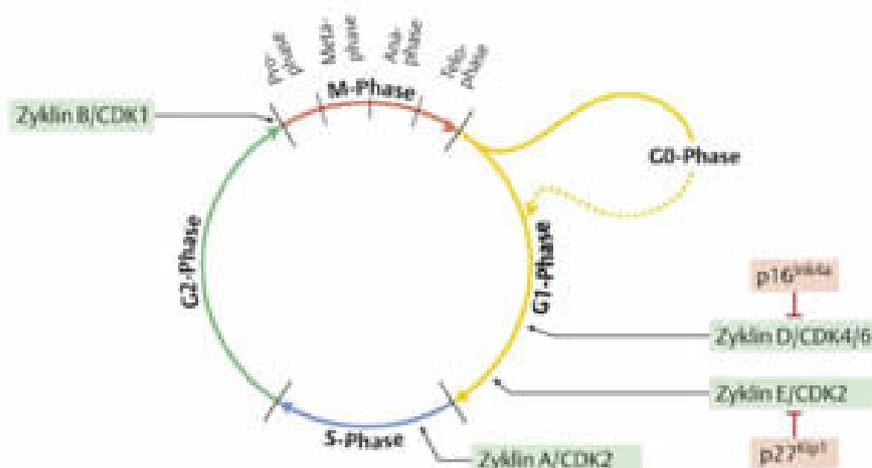


Abbildung 2: **Zellzyklusregulation.** In der späten G1-Phase wird mittels der Komplexe von Zyklin D/ CDK4/6 und Zyklin E/ CDK2 der Eintritt in die S-Phase kontrolliert, wo dann der Komplex Zyklin A/ CDK2 für den Beginn der Replikation sorgt. Am Ende der G2-Phase wird

*nach korrekter DNA-Replikation durch den MPF (Zyclin B/ CDK1) der Eintritt in die Mitose ausgelöst. (Rassow 2008)*

#### 1.1.2.1 Restriktionspunkt in der späten G1-Phase

In der späten G1-Phase entscheidet sich, ob sich die Zelle teilen wird. Sind die entsprechenden Bedingungen erfüllt und hat die Zelle die erforderliche Reife erreicht, wird durch mitogene Stimulierung Zyclin D induziert, welches Heterodimere mit CDK 4 oder CDK 6 bildet. Weiterhin wird ein Komplex aus Zyclin E und CDK2 initiiert (Ho, Dowdy 2002; Arellano, Moreno 1997).

Die aktivierten Heterodimere Zyclin D/ CDK4/6 und Zyclin E/ CDK2 führen im Verlauf zur Inhibierung des Tumorsuppressorgens Rb und damit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise E2F, wodurch die Transkription wichtiger Gene für die S-Phase eingeleitet wird und die Zelle somit im Zellzyklus weiterwandern kann (Ezhevsky et al. 2001). In der folgenden S-Phase sorgt die Expression von Zyclin A/ CDK2 dafür, dass die Replikation beginnen kann und DNA-Synthese stattfindet (Connell-Crowley et al. 1993).

Der G1/S-Übergang kann jedoch verhindert werden, indem eine vermehrte Expression des CKI p16<sup>Ink4a</sup> ZyclinD/ CDK4 hemmt und Zyclin E/ CDK2 durch P27<sup>Kip1</sup> inhibiert wird (Harbour et al. 1999; Rassow 2008).

#### 1.1.2.2 Restriktionspunkt am Ende der G2-Phase

Am Restriktionspunkt am Ende der G2-Phase muss sichergestellt werden, dass die DNA-Replikation korrekt abgelaufen ist, keine Schäden aufgetreten sind und die Zelle somit in die Mitose eintreten kann. Dies wird geregelt durch den Komplex aus Zyclin B und CDK 1, welcher auch als sogenannter „Maturation promoting factor“ (MPF) bezeichnet wird (Jackman et al. 2003).

Dieser MPF muss zunächst durch die cdc25-Phosphatase aktiviert werden, bevor er seine Wirkung entfalten kann und der Eintritt der Zelle in die Mitose ausgelöst wird (Rassow 2008; Hoffmann et al. 1993).

### 1.1.2.3 Restriktionspunkt in der Metaphase

In der Metaphase ist es notwendig, die korrekte Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene und die bipolare Bindung an die Spindelfasern zu kontrollieren, um dann die einwandfreie Teilung der Zwei-Chromatid-Chromosomen zu gewährleisten. Dies wird sichergestellt durch den sogenannten „spindle-assembly checkpoint“ (SAC) (Musacchio, Salmon 2007). Sind Chromosomen etwa nicht richtig über die Kinetochoren an den Mikrotubuli der Spindelfasern befestigt, so verhindert der SAC den Beginn der Anaphase und die Teilung der Schwesterchromatiden. Hierbei sind verschiedenste Protein-Interaktionen beteiligt; besonders wichtig erscheint dabei die Hemmung des Proteins cdc20, welches als Substrat des „anaphase promoting complex“ (APC) gilt, der für den Eintritt in die Anaphase verantwortlich ist (Hwang 1998). Erst wenn alle Chromatiden regelrecht an die Spindelfasern gebunden sind, wird SAC inaktiviert, wodurch cdc20 und APC wiederum aktiviert werden und somit die Teilung der Schwesterchromatiden in der Anaphase vorstattengehen kann (Musacchio, Hardwick 2002; Lara-Gonzalez et al. 2012; Foley, Kapoor 2013).

### 1.1.3 Irreguläre Zellteilung

Die oben genannten Mechanismen sorgen im Idealfall für einen regelrechten Ablauf des Zellzyklus und der Zellteilung, was die Grundlage für Wachstum und Regeneration des Gewebes darstellt. Ereignen sich jedoch Mutationen oder Fehlfunktionen in diesem komplexen Zusammenspiel verschiedener pro- und antimittotischer Faktoren, so kann es zur Dysregulation des Zellzyklus und zur unkontrollierten, ungehemmten Zellproliferation und damit in der Folge zur Entstehung von malignen Tumoren kommen.

Hierbei handelt es sich zumeist um eine Serie von mehreren Mutationen in unterschiedlichen Genen, welche in der Zelle akkumulieren, sodass es sich bei der Transformation in eine Tumorzelle um einen relativ langen Zeitraum handelt, der sich über mehrere Jahre erstreckt (Danielsson et al. 2013; Sulic et al. 2005).

Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang Gene, welche den Zellzyklus regulieren oder die Apoptose einleiten, sowie Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Man unterscheidet hier zwei Gruppen von Genen, deren Mutationen zu Störungen in der Zellproliferation führen. Protoonkogene kodieren für Proteine, welche eine Rolle in

mitogenen Signaltransduktionswegen spielen und somit vorwiegend die Expression von Transkriptionsfaktoren stimulieren, wodurch die Zellteilung veranlasst wird.

Es handelt sich hierbei zum Beispiel um Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, oder Proteinkinasen. Durch somatische Mutationen können Protoonkogene zu Onkogenen werden, deren Genprodukte dann vermehrt exprimiert und aktiviert werden, auch wenn kein Wachstumssignal vorhanden ist (sogenannte „gain of function“-Mutation). Da Onkogene dominant sind, genügt die Mutation in einem Allel, um die Zelle zu vermehrter Proliferation anzuregen (Croce 2008; Todd, Wong 1999).

Die zweite Gruppe bilden die Tumorsuppressorgene. Diese sind ebenfalls an der Zellzyklusregulation beteiligt und wirken wachstumshemmend. Tumorsuppressorgene sind rezessiv, sodass Mutationen in beiden Allelen vorhanden sein müssen, um einen Funktionsausfall hervorzurufen. Es handelt sich dabei um „loss of function“- Mutationen (Sherr 2004).

Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise p53, welches in rund der Hälfte aller Tumorerkrankungen einen Defekt aufweist (Vogelstein et al. 2000) und das Retinoblastomgen *RB* (Evan, Vousden 2001; Rassow 2008; Lodish 2000).

Im Folgenden soll nun spezifischer auf einige spezielle potentielle Onkogene eingegangen werden, auf denen die Ansätze der vorliegenden Arbeit beruhen.

## 1.2 *MYC*-Protoonkogen

### 1.2.1 Funktion

Das *c-MYC*-Protoonkogen (nachfolgend *MYC*) wurde vor etwa 30 Jahren als humanes, zelluläres Äquivalent des viralen Onkogens *v-MYC*, welches bei Vögeln zur sogenannten Myelocytomatosis - einer Leukämie - führt, entdeckt (Pelengaris et al. 2002; Dang 2012; Vennstrom et al. 1982).

Neben *l-MYC* und *n-MYC* ist es Mitglied der Familie der *MYC*-Gene, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren, die mittels ihrer bHLHZip-Domäne (basic Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper) gemeinsam mit ihrem Partner-Protein Max (ebenfalls mit bHLHZip-

Domäne) als Heterodimere an verschiedene DNA-Sequenzen binden können und somit eine Vielzahl an Genen aktivieren (Dang 1999; Blackwood, Eisenman 1991; Amati et al. 1993).

Hierbei spielt Myc eine große Rolle bei Vorgängen, die vor allem Zellwachstum und -proliferation angehen (Eilers 1999; Amati 2001). Während Myc in ruhenden Zellen kaum nachweisbar ist, nimmt seine Expression nach mitogener Stimulation rasch zu und die G1-Phase wird eingeleitet (Pelengaris et al. 2002). Hier aktiviert Myc die Komplexe aus Cyclin D/ CDK4/ 6 sowie Cyclin E/ CDK 2, welche essentielle Komponenten in der Progression des Zellzyklus darstellen [siehe auch unter 1.1.2.1] (Steiner et al. 1995; Berns et al. 1997; Amati et al. 1998). Zudem ist Myc von großer Bedeutung sowohl bei Angiogenese (Baudino et al. 2002; Dews et al. 2006), als auch bei der Proteinsynthese (Iritani, Eisenman 1999).

In gesunden Zellen werden bei Myc-Überexpression Apoptosewege wie beispielsweise die ARF-MDM2-p53-Kaskade ausgelöst, wohingegen bei malignen Zellen meist auch diese Signalwege beeinträchtigt sind und das Gleichgewicht zugunsten der Zellproliferation verschoben ist (Nilsson, Cleveland 2003).

Somit ist es augenscheinlich, dass eine Überexpression von Myc zu einer erhöhten Transformationsrate führt und damit an der Entstehung von Tumorerkrankungen wesentlich beteiligt ist, was seine weitreichende Bedeutung als Protoonkogen untermauert (Pelengaris et al. 2002; Keller et al. 2010; Meyer, Penn 2008; Oster et al. 2002).

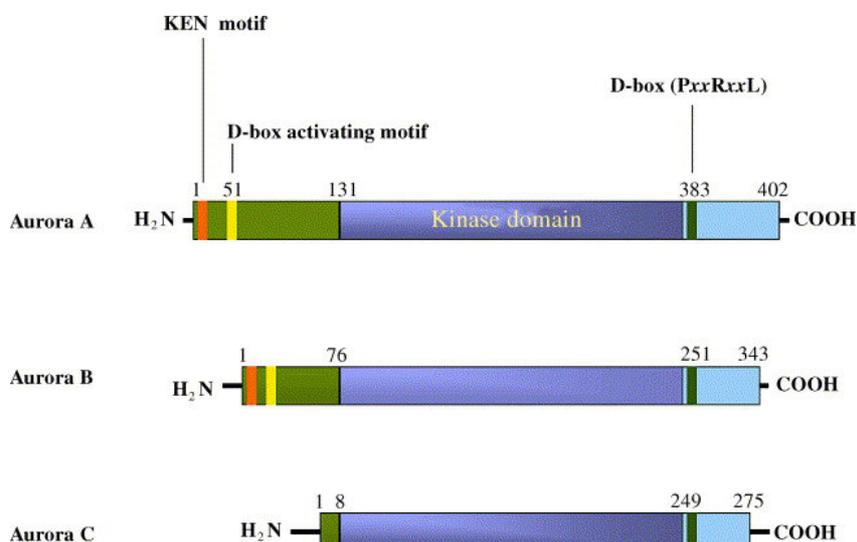
## 1.2.2 Überexpression in Tumoren

Die Expression von c-Myc ist in etwa 70 % aller Tumoren dereguliert (Dang 2012; Boxer, Dang. 2001), was durch unterschiedliche Mechanismen erzielt wird. Hierbei handelt es sich vor allem um Insertionen (Meyer, Penn. 2008; Payne et al. 1982), Amplifikationen des Gens (Alitalo et al. 1983; Dalla-Favera et al. 1982b; Collins, Groudine 1982), sowie chromosomale Translokationen. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise das Burkitt-Lymphom zu nennen. Hier besteht eine Translokation der Chromosomen 14, 2 oder 22, welche Gene für schwere und leichte Ketten der Immunglobuline tragen, mit Chromosom 8, auf dem sich *MYC* befindet, dessen Expression in der Folge hochreguliert wird und so zur Lymphomagenese beiträgt (Dalla-Favera et al. 1982a; Marcu et al. 1992; Boxer, Dang 2001).

Bei verschiedenen soliden Tumoren wie Mamma-, Kolon-, Ovarialkarzinom, sowie auch Osteosarkomen, Glioblastomen, Neuroblastomen und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte eine deregulierte Expression von c-Myc, beziehungsweise anderer Mitglieder der Familie wie n-Myc und l-Myc, nachgewiesen werden, wobei hier zumeist Amplifikationen auftreten (Dang 1999; Nesbit et al. 1999; Pelengaris et al. 2002). Oftmals sind diese Tumoren aggressiv und wenig differenziert und gehen mit einer schlechten Prognose einher (Brodeur et al. 1984; Wu et al. 2003; Herkert, Eilers 2010; Klapper et al. 2008).

### 1.3 Aurora Kinasen

Aurora Kinasen sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, welche eine essentielle Rolle im Zellzyklus spielen (Bolanos-Garcia 2005). Zum heutigen Zeitpunkt sind drei Mitglieder dieser Familie bekannt: Aurora A und B, welche bei der Proliferation vieler Zelltypen von Bedeutung sind (Fu et al. 2007a; Ducat, Zheng 2004), sowie Aurora C, über deren Funktion noch weniger bekannt ist, und welche bis jetzt hauptsächlich in testikulärem Gewebe nachgewiesen werden konnte (Kimura et al. 1999; Hu et al. 2000).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aurora Kinasen A, B und C.** Die C- und N-terminalen Domänen beinhalten vor allem regulatorische Sequenzen, während sich in der zentralen Region die katalytische Domäne befindet (Bolanos-Garcia 2005).

Aufgrund ihrer Schlüsselstellung in der Zellzyklusregulation können Aurora Kinasen wesentlich an der Entstehung von Tumoren und Krebserkrankungen beteiligt sein. In einer Vielzahl an Tumoren, wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, liegt eine vermehrte Expression von Aurora Kinasen vor (Bischoff et al. 1998; Kollareddy et al. 2008; Zhou et al. 1998; Sen et al. 1997), welche zudem auch häufig mit genetischer Instabilität und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Gautschi et al. 2008; Landen CN et al. 2007).

Es soll nun im Einzelnen auf die Isotypen Aurora A, B und C eingegangen werden.

### 1.3.1 Aurora Kinase A

Das Gen für die Aurora Kinase A ist auf Chromosom 20q13.2 lokalisiert und das kodierte Protein übt seine Funktion vorwiegend während der Zellteilung aus (Bischoff et al. 1998). Während der G2-Phase befindet sich Aurora A am Zentrosom, wo sie durch Phosphorylierung aktiviert wird (Hirota et al. 2003), und dann durch Rekrutierung, Phosphorylierung und Stabilisierung verschiedener Mikrotubuli-assoziiierter Proteine zur Reifung des Zentrosoms beiträgt (Meraldi, Nigg 2002; Berdnik, Knoblich 2002; Terada et al. 2003; Kinoshita et al. 2005), was eine Grundvoraussetzung zur Einleitung der Mitose darstellt.

Darüber hinaus wird Aurora Kinase A nach der Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase der Mitose an die proximalen Enden der Mikrotubuli befördert, wo sie grundlegend bei der Ausbildung des Spindelapparates mitwirkt (Tsai et al. 2003; Tsai, Zheng 2005). Weiterhin ist Aurora A auch bei der Teilung des Zentrosoms (Hannak et al. 2001; Marumoto et al. 2003) sowie beim Überwinden des G2/M-Restriktionspunktes (Cazales et al. 2005) beteiligt.

Das hiermit ersichtliche onkogene Potential der Aurora Kinase A wurde im Mausmodell bestätigt (Zhou et al. 1998; Ewart-Toland et al. 2003).

### 1.3.2 Aurora Kinase B

Auch die Aurora Kinase B, deren Gen sich auf Chromosom 17p13.1 befindet (Carvajal et al. 2006), spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus. Gemeinsam mit den nicht-enzymatischen Untereinheiten Survivin, Borealin und INCENP ist sie eine Komponente des „chromosomal passenger complex“ (CPC) (Vader et al. 2006; Honda et al. 2003) und bildet dessen katalytische Einheit. Der CPC ist an der Modifizierung von Chromatin-Proteinen, an der korrekten Trennung der Chromatiden während der Mitose sowie an der Zytokinese beteiligt und ist während des gesamten Zellzyklus aktiv. Während der Prometa- und Metaphase befindet sich der Komplex an den Zentromeren, und verlagert sich nach der Teilung der Chromatiden wieder in den Mittelteil, wo er bis zum Ende der Zellteilung verbleibt (Fu et al. 2007a; Gautschi et al. 2008). Aurora B phosphoryliert Histon H3 an Ser<sup>10</sup> und Ser<sup>28</sup>, was für die Kondensation der Chromosomen und damit für das Einsetzen der Mitose erforderlich ist (Hsu et al. 2000; Goto et al. 2002; Crosio et al. 2002), sowie dessen Variante CENP-A an Ser<sup>7</sup>, wodurch die korrekte Haftung der Kinetochoren an die Spindelfasern gewährleistet wird (Zeitlin et al. 2001; Kunitoku et al. 2003).

Weiterhin ist Aurora B an der regelrechten Trennung der Schwesterchromatiden beteiligt, indem sie die korrekte Anlagerung der Kinetochoren an die Mikrotubuli kontrolliert, sowie für die Rekrutierung von Proteinen des „spindle assembly checkpoints“ (siehe auch unter 1.1.2.3) zuständig ist. Erst wenn alle Kinetochoren korrekt an den Mikrotubuli befestigt sind, können sich die Schwesterchromatiden teilen (Vigneron et al. 2004; Morrow et al. 2005; Pinsky et al. 2006). Schließlich ist die Aurora Kinase B auch von großer Bedeutung bei der Zellteilung, wobei ihre Substrate hier unter anderem die Intermediärfilamente Vimentin und Desmin umfassen (Kawajiri et al. 2003; Goto et al. 2003).

Bei einer Hemmung der Aurora Kinase B kommt es demzufolge zur Hemmung der Zytokinese und zur Polyploidie (Fu et al. 2007a; Schumacher et al. 1998). Aurora Kinase B ist in zahlreichen Tumoren überexprimiert und hier mit schlechteren Überlebensraten sowie genetischer Instabilität assoziiert (Gautschi et al. 2008).

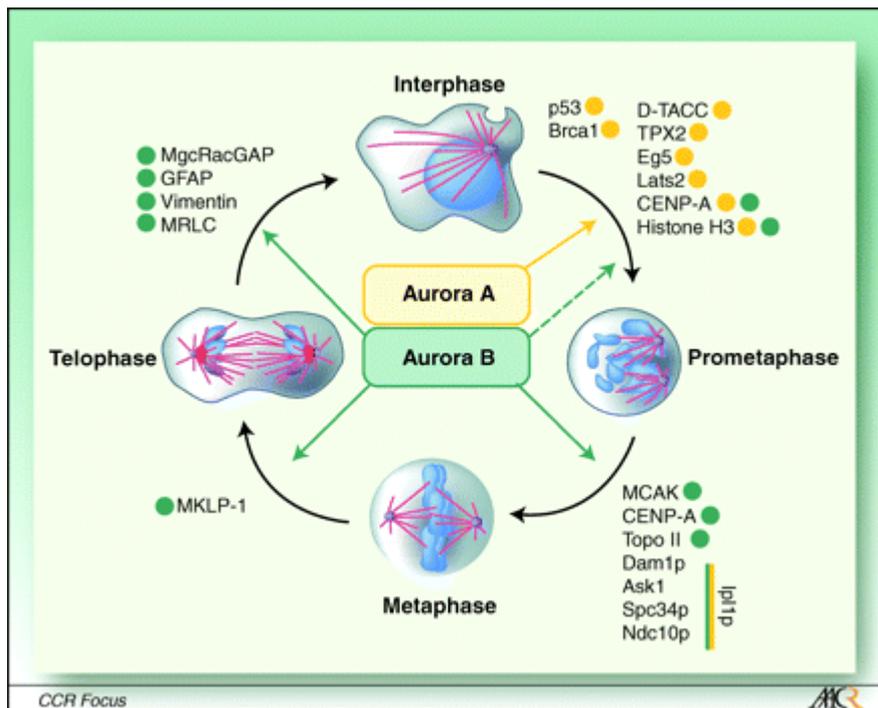


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Aurora Kinasen A und B im Zellzyklus sowie ihrer Substrate. Aurora A ist vorwiegend zu Beginn der Mitose aktiv, während Aurora B zu verschiedensten Zeitpunkten im Zellzyklus Proteine phosphoryliert (Gautschi et al. 2008).

### 1.3.3 Aurora Kinase C

Über die genaue Funktion der Aurora Kinase C ist zum heutigen Zeitpunkt noch relativ wenig bekannt. Sie wird vorwiegend im Hoden exprimiert und ist hierbei in Spermatogenese und Meiose involviert, während man in anderen Gewebearten nur sehr geringe Mengen an Aurora Kinase C feststellen kann (Khan et al. 2011). Man geht davon aus, dass Aurora C ebenfalls am Chromosomal passenger complex beteiligt ist, wobei sie an INCENP und Survivin bindet und somit ihre Funktion mit der von Aurora B weitgehend überlappt, bzw. sie diese bei einem Ausfall von Aurora B auch übernehmen kann (Sasai et al. 2004; Li et al. 2004; Yan et al. 2005).

Weiterhin ist Aurora Kinase C, deren Gen auf Chromosom 19q13.43 lokalisiert ist, auch in vielen Tumorzelllinien vermehrt exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass ihre Überexpression darüber hinaus Transformationen hervorruft und sie damit onkogenes Potential besitzt (Khan et al. 2011).

## 1.4 Aurora Kinase Inhibitoren

Tumoren sind charakterisiert durch unkontrolliertes, ungehemmtes Zellwachstum. Fehler in der Zellzyklusregulation können zu solch einer Entartung von Zellen führen. Aufgrund der oben beschriebenen elementaren Funktionen der Aurora Kinasen während Mitose und Zellteilung und deren vermehrter Expression in verschiedenen Tumorgeweben, zeigen sie großes Potential als Zielscheibe der Krebstherapie (Fu et al. 2007a; Gautschi et al. 2008), zumal gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von Aurora A mittels RNA-Interferenz das Tumorstadium unterdrückt und die Sensitivität gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung erhöht (Hata et al. 2005).

Während der letzten Jahre wurden daher zahlreiche Aurora Kinase Inhibitoren (AKI) entwickelt und in präklinischen und klinischen Studien evaluiert (Kollareddy et al. 2012; Friedberg et al. 2014; Löwenberg et al. 2011). Diese niedermolekularen Inhibitoren wirken beispielsweise durch Hemmung der Interaktion mit den Partnerproteinen der Aurora Kinasen oder durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle der katalytischen Domäne (Keen, Taylor 2004). Im Folgenden soll beispielhaft auf zwei Vertreter dieser Gruppe von Inhibitoren eingegangen werden, welche auch bei den Experimenten für diese Arbeit angewandt wurden.

### 1.4.1 R763/AS703569

Bei R763/AS703569 handelt es sich um einen potenten Pan-Aurora Kinase Inhibitor, der Aurora A, B und C zelltypabhängig mit einer IC<sub>50</sub> von 4, 4.8 und 6.8 nM, sowie auch wenige andere Kinasen wie Abl, FLT1 und FLT3 hemmt. Dieser Inhibitor ist oral verfügbar und ein kompetitiver Hemmstoff von ATP (Kollareddy et al. 2012). Präklinisch ließen sich beim Einsatz dieses Inhibitors phänotypische Veränderungen wie ein vergrößertes Zellvolumen, Endoreduplikation mit polyploiden Chromosomensätzen und Apoptose erkennen. Die orale Applikation zeigte auch in vivo ein signifikant verringertes Tumorstadium und verlängertes Gesamtüberleben (McLaughlin et al. 2010). R763/AS703569 wurde bereits in mehreren klinischen Studien getestet, wobei bei mehreren Patienten ein Ansprechen auf hämatologischer und zytologischer Ebene sowie eine Stabilisierung der Krankheit beobachtet werden konnte. Es mussten jedoch auch vermehrt unerwünschte und dosislimitierende Nebenwirkungen wie Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie sowie Diarrhoe festgestellt

werden (Renshaw JS, Patnaik A, Gordon M, Beerman M, Fischer D, Gianella-Borradori A, Lin C, Mendelson D 2007; Sonet et al. 2008).

#### 1.4.2 MLN 8237 (Alisertib)

MLN 8237 (Alisertib) ist ein Inhibitor, der über eine 200fach höhere Selektivität für Aurora Kinase A als für Aurora B verfügt. Er hemmt Aurora A mit einer IC<sub>50</sub> von 1.2 nM, indem er ihre Phosphorylierung inhibiert und ist ebenfalls oral applizierbar (<http://www.selleckchem.com/products/MLN8237.html>, 29.10.2014). Präklinische Studien in Modellen von Lymphomen, Leukämien, Multiplem Myelom, Brust- und Prostatakarzinom zeigten ein Ansprechen mit vermehrtem Zelltod sowie in vivo ein reduziertes Tumolvolumen und verlängertes Überleben (Maris et al. 2010; Manfredi et al. 2011; Görgün et al. 2010). Der Inhibitor wurde auch in klinischen Studien getestet, einzeln oder in Kombination mit anderen Krebsmedikamenten, wobei vor allem eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht werden konnte (Boss et al. 2009). An unerwünschten Wirkungen sind vor allem Neutropenie, Anämie und Mukositis zu nennen, wenngleich diese geringer ausfallen als beim Vorgänger MLN 8054 (Cervantes et al. 2012; Dees et al. 2012; Matulonis et al. 2012). Derzeit wird MLN 8237 in mehreren Phase II Studien untersucht.

### 1.5 Aurora Kinasen werden in Myc-induzierten Lymphomen überexprimiert

Sowohl für Myc als auch für die Aurora Kinasen konnte in zahlreichen Tumorgeweben eine Überexpression festgestellt werden (Boxer, Dang 2001; Kollareddy et al. 2008). Es konnte hierbei ein Zusammenhang zwischen diesen potentiellen Onkogenen festgestellt werden, wobei in Myc-assoziierten B-Zell-Lymphomen die Aurora Kinasen A und B vermehrt exprimiert werden. Dabei wird bei Myc-Aktivität die Aurora Kinase A direkt und die Aurora Kinase B indirekt reguliert und es kommt zu erhöhten mRNA- ebenso wie Proteinlevels im Vergleich zu Wildtypzellen (den Hollander et al. 2010). Des Weiteren waren Myc-positive Lymphomzellen signifikant sensitiver gegenüber einer Behandlung mit Aurora Kinase Inhibitoren, was ebenfalls für eine Verbindung zwischen Myc und Aurora Kinasen spricht.

Hier kommt es zur fehlerhaften Funktion der Mitose und damit zur Polyploidie beziehungsweise zur Apoptose und Autophagie. Dabei ist zu beachten, dass die Inhibition der Aurora Kinasen beim Myc-induzierten Lymphom wirkungsvoll ist ungeachtet des p53-Status und somit eine Mangelhaftigkeit von p53 keine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermittelt (Yang et al. 2010). Der Einsatz von Aurora Kinase Inhibitoren bei Myc-überexprimierenden Lymphomen ist somit ein vielversprechender Therapieansatz, da er zum selektiven Tod der Myc-positiven Zellen führt (den Hollander et al. 2010; Yang et al. 2010). Desgleichen konnte auch eine Wirksamkeit von Aurora Kinase Inhibitoren in Krebszelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms, in welchen eine Amplifikation von *c-MYC* vorlag, nachgewiesen werden (Sos et al. 2012).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Therapie von Krebserkrankungen konnte im Lauf der letzten Jahre wesentlich verbessert werden, was vor allem auch der Etablierung der sogenannten “targeted therapy”, der gezielten Krebstherapie, zu verdanken ist. Hierbei richtet sich das Augenmerk auf spezifische Moleküle und Stoffwechselwege, welche besonders in Tumorzellen vorhanden und aktiv sind, sodass die Therapie gezielt auf maligne Zellen gerichtet wird und somit rationaler und effizienter, sowie mit weniger Nebenwirkungen durchgeführt werden kann (Sawyers 2004). Die Hemmung von Aurora Kinasen durch niedermolekulare Inhibitoren ist ein weiterer Schritt in diese Richtung. Der Einsatz verschiedener Aurora Kinase Inhibitoren wurde bereits in mehreren klinischen Studien erprobt, wobei ein Ansprechen gezeigt werden konnte. Es musste jedoch auch festgestellt werden, dass während der Therapie mit Aurora Kinase Inhibitoren, sowohl in vitro als auch in vivo, Resistenzen gegenüber diesen Substanzen auftraten und deren Wirksamkeit abnahm (Kollareddy et al. 2012).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Gene zu identifizieren, deren durch Überexpression oder durch einen Knockdown vermehrt oder vermindert exprimierte Proteine eine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln können. Da bekannt ist, dass Aurora Kinasen A und B in Myc-induzierten Lymphomen überexprimiert werden und somit ein gutes Angriffsziel für eine Inhibition darstellen (den Hollander et al. 2010), sollten die Experimente mit Myc-Lymphomzellen durchgeführt werden. Zunächst sollte eine geeignete Konzentration des Aurora Kinase Inhibitors ermittelt werden, bei der ein Zelluntergang deutlich zu beobachten ist und somit die Ausbildung relevanter Resistenzen ausreichend gut beurteilbar ist. Hierbei würden zwei Vertreter aus der Gruppe der Aurora Kinase Inhibitoren untersucht, der Pan-AKI R763/AS703569 sowie der Aurora A-spezifische Inhibitor MLN8237. Um die Auswirkungen einer Resistenz gegenüber dem AKI einschätzen zu können, sollten auch Zellen untersucht werden, welche *AURKA*- bzw. *AURKB*-Mutationen trugen und somit weniger sensibel auf den Inhibitor sind. Im Anschluss daran sollten die Lymphomzellen mit einer siRNA library sowie auch mit einer cDNA library infiziert werden, um Knockdowns beziehungsweise eine Überexpression von zahlreichen verschiedenen Genen zu erreichen. Die Entwicklung einer möglichen Resistenz sollte daraufhin in der Zellkultur

mit der zuvor festgelegten Konzentration des Aurora Kinase Inhibitors erfolgen, wobei ein Farbumschlag des Mediums als ausschlaggebender Faktor für einen vermehrten Verbrauch von Nährstoffen und somit für ein Wachstum und ein Überwinden der Wirkung des Inhibitors angesehen wurde.

Würde solch ein Zellklon gefunden, sollten diese Zellen weiterhin kultiviert und dann die für die Resistenz verantwortlichen Gene durch den Vergleich mit der siRNA library beziehungsweise mittels Genexpressionsanalyse identifiziert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Arbeitsgeräte und Zubehör

*Tabelle 1: Verwendete Geräte*

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
4°C Kühlschrank (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
-20°C Gefrierschrank (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
-80°C Gefrierschrank (V.I.P. <sup>TM</sup> -86°C ULT, MDF-U52V)	<i>SANYO Electric Biomedical Co.</i>
Analysewaage	<i>Kern</i>
Brutschrank (Heraeus Hera cell 240)	<i>Heraeus</i>
Durchflusszytometer (Coulter® Epics® XL <sup>TM</sup> )	<i>Beckman Coulter GmbH-Diagnostics</i>
Filmentwickler (Hyperprocessor)	<i>Amersham Life Science</i>
Gelelektrophoresekammer (Multigel Long)	<i>Biometra GmbH</i>
Glasplatten (Multigel Long)	<i>Biometra GmbH</i>
Glaswaren	<i>Labware SCHOTT AG</i>
Heizschüttler (Thermomix comfort)	<i>Eppendorf AG</i>
Homogenisator (SONOPLUS HD 2070)	<i>Bandelin Electronic</i>
Infrarotlampe	<i>Petra</i>
Isoliergummis	<i>Biometra</i>
Kämme (Whatman Biometra Comb Horizon, 20 well 1mm und 2mm)	<i>Whatman<sup>®</sup> GmbH</i>
Lichtmikroskop	<i>Zeiss</i>

Microfuge (Heraeus Biofuge fresco)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (Heraeus Megafuge 3.0 RS)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (Heraeus Multifuge 3s)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (MiniSpin)	<i>Eppendorf AG</i>
Pipetboy	<i>Integra Biosciences AG</i>
Pipetten	<i>Eppendorf</i>
Real time PCR Maschine (StepOnePlus™)	<i>Applied Biosystems</i>
Sicherheitswerkbank (HeraSafe HSP 18)	<i>Heraeus</i>
Spektrophotometer (SmartSpec™ PLUS)	<i>Bio-Rad</i>
Stickstofftank (K-Series Cryo Storage Systems)	<i>Taylor Wharton GmbH</i>
Transferkammer	<i>Bio Rad</i>
Vortexer (MS1 Minishaker)	<i>IKA® Werke GmbH &amp; Co. KG</i>
Wasserbad	<i>Grant</i>
Zählkammer (Neubauer improved)	<i>LO-Laboroptik</i>

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial*

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
6 well-Platten	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
12 well-Platten	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
96 well-Platten	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
Einmalküvetten	<i>Carl Roth</i>
FACS-Röhrchen, 5 ml	<i>BD Biosciences</i>
Kryoröhrchen (Cryo Tubes™)	<i>Corning</i>
MicroAmp™ (Optical 96-Well Reaction Plate)	<i>Applied Biosystems</i>
Objekträger	<i>Mediware</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i>
PVDF-Membran	<i>Bio-Rad</i>
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	<i>Eppendorf</i>
Röntgenfilm CL-Xposure	<i>Thermo Scientific</i>

Spritzenfilter (Filtropur S)	<i>Sarstedt</i>
Whatman® Papier	<i>Biometra</i>
Zellkulturflaschen	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
Zentrifugenröhren, 15ml und 50ml	<i>Sarstedt</i>

### 3.1.3 Chemikalien

*Tabelle 3: Verwendete Chemikalien*

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
$\alpha$ -MEM	<i>Gibco</i>
2-Mercaptoethanol, 50 mM	<i>Invitrogen</i>
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)	<i>Vybrant®</i>
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	<i>Sigma-Aldrich</i>
Agarose NEEO ultra quality Roti®Garose	<i>Carl Roth</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
AS703569/ R763	<i>EMD Serono</i>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich</i>
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	<i>Invitrogen</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Riedel-de Haën</i>
dNTP Mix, 10 mM	<i>Fermentas</i>
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	<i>Invitrogen</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Invitrogen</i>
4,5g/l Glucose	<i>Gibco</i>
Ethanol	<i>Riedel-de Haën</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Carl Roth</i>
Fetales Kälber Serum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
Formalin (4 %)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Gelatine	<i>Sigma</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i>

Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	<i>Gibco</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich</i>
Isopropanol	<i>Fluka</i>
L-Glutamin, 200 mM	<i>Invitrogen</i>
Lipofectamin® 2000	<i>Invitrogen</i>
Methanol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Milchpulver	<i>Fluka</i>
MLN 8237	<i>Selleck</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	<i>Invitrogen</i>
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	<i>Invitrogen</i>
Opti-Mem® I Reduced Serum Media	<i>Invitrogen</i>
Penicillin/Streptomycin (P/S)	<i>Invitrogen</i>
PEG-it™ Virus Concentration	<i>System Biosciences</i>
Phosphat Buffered Saline (PBS)	<i>PAA</i>
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	<i>Invitrogen</i>
Polybren (Hexadimethrinbromid)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Propidium Iodid (PI)	<i>Invitrogen</i>
Puromycin Dihydrochlorid	<i>Gibco</i>
RNase OUT	<i>Invitrogen</i>
RPMI-1640 Medium (-L-Glutamin)	<i>Gibco</i>
SuperSignal West (Pico/Dura/Femto)	<i>Pierce</i>
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	<i>Carl Roth</i>
Trypanblau 0,4 %	<i>Invitrogen</i>
Trypsin-EDTA-Lösung	<i>Gibco</i>
Tween 20	<i>Carl Roth</i>

### 3.1.4 Kits

*Tabelle 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Kits*

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Global UltraRapid™ Titering Kit	System Biosciences
Qiagen® Omniscript RT Kit	Qiagen
Qiagen® Qiaschredder	Qiagen

### 3.1.5 Antikörper

*Tabelle 5: Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden*

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>
Anti-β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-Bcl 2	Maus	BD Pharmingen
Anti-Myc	Kaninchen	Santa Cruz
Anti-Aurora A	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-Aurora B	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-Histon H3	Kaninchen	Millipore
Anti-Kaninchen	Ziege	GE Healthcare
Anti-Maus	Schaf	GE Healthcare

## 3.1.6 Puffer

Tabelle 6: Verwendete Puffer

Name	Reagenzien
Blockierpuffer	PBS 10% Trockenmilch 0,1% Tween
FACS-Puffer	0,1% BSA PBS
Ladepuffer, 50 ml (5x):	3,88 g DTT 250 mM Tris-HCl ph 6,8 5 g SDS 6,25 g Bromphenolblau (1 %) 50 % Glycerol 50 ml deionisiertes Wasser
Lysepuffer:	1 mM PMSF 10 mM $\beta$ -Glycerophosphat 0,2 mM NaF 0,1 mM NaVO <sub>4</sub> 10 % einer Roche Mini-Complete Tablette ARF

Trenngel:	7,5-12 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % SDS 3 % APS 0,07 % TEMED
Sammelgel:	5 % Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % SDS 7 % APS 0,14 % TEMED
SDS-Laufpuffer (10x):	14,4 % Glycin 3 % Tris 1 % SDS deionisiertes Wasser
Transferpuffer:	20 % Methanol 10 % SDS Laufpuffer (10x) deionisiertes Wasser

### 3.1.7 Primer

*Tabelle 7: Verwendete Primer*

Gen	Primer	Sequenz 5' → 3'
<i>AURKA</i>	Fw	CACACGTACCAGGAGACTTACAGA
<i>AURKA</i>	Rev	AGTCTTGAAATGAGGTCCCTGGCT
<i>AURKB</i>	Fw	GCCCCTCGCGGGGAACTCTA
<i>AURKB</i>	Rev	GGCATGCACCGACCAGCCAA
<i>WPRE</i>	Fw	CCGTTGTCCGTCAACGTG
<i>WPRE</i>	Rev	AGTTGACAGGTGGTGGCAAT
<i>UCRI</i>	Fw	TTAACAATCCGCTTGGACATGA
<i>UCRI</i>	Rev	AAAATCAGTTCGCCAGAAGCA
<i>UB</i>	Fw	TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT
<i>UB</i>	Rev	GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA

### 3.1.8 Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide

*Tabelle 8: Verwendete Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide*

Aurora A Mutante (pBABE- <i>AURKA</i> -Puro)	Hergestellt von AG Keller
Aurora B Mutante (pBABE- <i>AURKB</i> -Puro)	Hergestellt von AG Keller
cDNA library	Zur Verfügung gestellt von Jonas Nilsson, Schweden
pBABE-Puro	Addgene

pPACKF1 plasmid mix (pMD2.G, pFIV-34N)	Zur Verfügung gestellt von Jonas Nilsson, Schweden
GeneNet™ Mouse 40K siRNA Library	Zur Verfügung gestellt von Jonas Nilsson, Schweden
<i>c-MYC</i> GFP	Hergestellt von AG Keller
<i>MIG</i> GFP	Addgene
MSCV thCD2	Zur Verfügung gestellt von Prof. Marc Schmidt-Supprian

### 3.1.9 Medien

*Tabelle 9: Zellmedien*

Lymphomzellmedium:	RPMI 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung 1 % NEAA 1 % L-Glutamin 0,1 % 2-Mercaptoethanol
NIH 3T3- und Phoenixzellmedium:	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung (bei NIH3T3)
293TN-Zellmedium:	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1% L-Glutamin 4.5 g/l Glucose 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung

Einfriermedium: FCS  
10% DMSO

### 3.1.10 Zelllinien

*Tabelle 10: Verwendete Zelllinien*

Lymphomzelllinien 580 und 665:	In vitro aus Primärlymphom etablierte Eμ-Myc-Zelllinien, Suspensionszellen
293TN:	Retrovirus-produzierende humane Nierenzelllinie, adhärent
NIH 3T3:	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, adhärent
Phoenix E:	Retrovirus-produzierende Zelllinie, basierend auf der humanen Zelllinie 293T, adhärent

### 3.1.11 Softwareprogramme

*Tabelle 11: Softwareprogramme*

FlowJo Version 7  
Microsoft Excel  
Microsoft Paint  
Microsoft PowerPoint  
Microsoft Word

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Es wurden die Lymphomzelllinien 580 und 665, die murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, sowie die Retrovirus-produzierenden Zelllinien 293TN und Phoenix E Zellen kultiviert. Als Medium diente hierbei für die Lymphomzellen RPMI versetzt mit 10 % FCS, 1% Penicillin/Streptomycin Lösung, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% L-Glutamin und 0,1% 2-Mercaptoethanol. Sie wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert. Für die NIH3T3-Zellen wurde DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin Lösung verwendet, ebenso für die Phoenixzellen, hier jedoch ohne Antibiotika. Die 293TN-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1% L-Glutamin, 4.5g/l Glucose und 1% Penicillin/ Streptomycin Lösung kultiviert. Je nach Dichte wurden die adhären Zellen trypsinisiert und gesplittet. Alle Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank gehalten.

Zum Einfrieren wurden  $10 \times 10^6$  Zellen in 700µl Medium, 200µl FCS und 100µl DMSO zum Schutz vor Kristallbildung in ein Kryoröhrchen pipettiert, das zunächst bei -80°C gelagert und später in flüssigen Stickstoff überführt wurde.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad aufgewärmt, die Zellen dann zügig in frisches Medium aufgenommen und das toxische DMSO durch Zentrifugieren entfernt. Nun konnten die Zellen im Brutschrank kultiviert werden.

### 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit 0,5%-iger Trypanblaulösung verdünnt und ein Tropfen dieser Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Daraufhin konnten die Zellen unter dem Mikroskop gezählt werden.

### 3.2.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay stellt eine Methode zur Bestimmung der Viabilität von Zellen dar. Es wird hierbei der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden Zellen zu blauem Formazan reduziert. Diese Farbänderung kann spektrometrisch gemessen werden (Mosmann 1983).

Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit einer Verdünnungsreihe der Aurora Kinase Inhibitoren R763/AS703569 (0,78- 100nM) und MLN8237 (4-500nM) angesetzt und nach 24 und 48 Stunden Messungen am Spektrometer durchgeführt, wobei zwei Stunden vorher 40µl MTT zugegeben wurde.

### 3.2.4 Durchflusszytometrie

#### 3.2.4.1 Zellzyklusanalyse

Zur Zellzyklusanalyse wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen der Aurora Kinase Inhibitoren R763/AS703569 und MLN8237 inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen durch Waschen in PBS und anschließender Zentrifugation und Suspension in 70% Ethanol für die Analyse fixiert. Nach einer Wartezeit von mindestens vier Stunden wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert und mit Propidium Iodid Staining Solution (PI) gefärbt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten konnte die Messung mittels PI-FACS im FL3-Kanal durchgeführt werden. Da PI zwischen DNA-Basenpaare interkaliert, kann durch dessen Bindung der DNA-Gehalt der Zellen gemessen werden. Da Zellen je nach Zellzyklusphase unterschiedliche Mengen an DNA enthalten, kann so eine Zuordnung der Zellen in eine bestimmte Phase des Zellzyklus erfolgen. Hierdurch gelang auch eine Beurteilung von Diploidie oder Polyploidie der Zellen sowie eine Einordnung in die subG0-Phase.

#### 3.2.4.2 FACS-Analyse der GFP-Expression

Um den Anteil der Zellen zu ermitteln, welche das fluoreszierende Markerprotein GFP enthalten, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und in FACS-Puffer

resuspendiert. Dann wurden sie durchfluszytometrisch analysiert. Dies diente unter Anderem der Messung der Infektionseffizienz bei der retroviralen Transduktion.

### 3.2.5 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA- und RNA-Sequenzen, welche auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion beruht und gleichzeitig eine Quantifizierung der Nukleinsäuren erlaubt. Diese Quantifizierung wird durch Fluoreszenzmessungen während der exponentiellen Phase der PCR ermöglicht (Gut et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zum einen zur Messung der Expression der in die Zellen eingebrachten Mutationen von Aurora Kinase A und B sowie zur Titerkontrolle nach Infektion mit der siRNA library verwendet. Als housekeeping genes wurden Ubiquitin und UCR1 eingesetzt, welche in allen Zellen ubiquitär vorhanden sind.

#### 3.2.5.1 Arbeitsabläufe bei der quantitativen real-time PCR

Die RNA-Isolation wurde nach Anleitung des Herstellers mithilfe des RNeasy Kits von Quiagen<sup>®</sup> durchgeführt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese mittels Quiagen<sup>®</sup> Omniscript RT Kit. Hierbei wurden 2µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf 24µl aufgefüllt. Dann wurden 4µl 10x RT-Puffer, 4µl dNTP, 4µl Oligo-dT, 2µl RNase out und 2µl Reverse Transkriptase zugefügt. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, danach wurde durch Erhitzen auf 93°C das Enzym inaktiviert. Daraufhin konnte die real-time PCR durchgeführt werden. Hierzu wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

*Tabelle 12: Pipettierschema real-time PCR*

<i>15,6µl</i>	<i>SYBR<sup>®</sup>Green</i>
<i>0,5µl</i>	<i>Rox</i>
<i>0,05µl</i>	<i>Primer A</i>
<i>0,05µl</i>	<i>Primer B</i>

8 $\mu$ l      H<sub>2</sub>O  
 0.8 $\mu$ l      cDNA

Die quantitative real-time PCR wurde am StepOnePlus™-Gerät von Applied Biosystems durchgeführt. Dabei wurden die Proben zunächst in einem Zyklus für 2 Minuten auf 50°C und dann für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Daraufhin folgten 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 1 Minute bei 60°C (Annealing). Zur relativen quantitativen Auswertung wird schließlich die Menge des untersuchten Gens mit dem housekeeping gene in Relation gesetzt.

### 3.2.5.2 Titerkontrolle nach Infektion mit der siRNA library

Zur Determinierung der Prozentzahl an Zellen, welche mit der siRNA library infiziert sind, wurde eine Titerkontrolle nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurde hierzu das Global UltraRapid Lentiviral Titer Kit™ von System Biosciences verwendet. Die GeneNet™ siRNA library enthält das WPRE-Element, welches zusammen mit den lentiviralen Konstrukten in das Genom der Zielzellen transduziert wird. Die Anzahl der in die Zellen integrierten Kopien von WPRE korreliert daher mit der der lentiviralen Konstrukte und wird mit dem ubiquitär exprimierten housekeeping gene UCR1 normiert. Mithilfe von vorhandenen Standards kann eine Standardkurve erstellt werden und durch Auftragung des ermittelten Wertes die Multiplicity of Infection (MOI) ermittelt werden, welche der Prozentzahl an infizierten Zellen entspricht.

*Tabelle 13: Pipettierschema Titerkontrolle mittels RT-PCR*

12.5  $\mu$ L      2X SYBRTaq Mix  
 1  $\mu$ L      25x Primer Mix UCR1 bzw. WPRE  
 2 $\mu$ l      cDNA  
 9,5 $\mu$ l      H<sub>2</sub>O

Die real-time PCR wird ebenfalls nach dem unter 3.2.5.1 beschriebenen Schema durchgeführt, wobei am Ende ein Dissoziationsschritt hinzugefügt wird.

### 3.2.6 Western Blot

#### 3.2.6.1 Herstellung von Zelllysaten und Proteinbestimmung nach Bradford

Für den Proteinnachweis mittels Western Blot wurden jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen verwendet. Diese wurden zunächst unter Anwendung eines Lyse-Puffers (siehe 3.1.6) lysiert, 15 Minuten auf Eis gelagert und dann mit 30% Power sonifiziert. Nach Zentrifugation für fünf Minuten mit 13000 rpm bei 4°C und Abnahme des Überstands konnte die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgen. Hierbei wurde das Protein Assay Bradford im Verhältnis von 1:5 mit sterilem Wasser verdünnt und ein Milliliter davon zusammen mit einem Mikroliter des Lysats in eine lichtundurchlässige Küvette gegeben. Nun konnte im Photometer die Proteinkonzentration gemessen werden. Es wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit 5x Loading Buffer und ARF Buffer auf 60µl aufgefüllt, für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

#### 3.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben in 12%-igem oder 15%-igem Trenngel und Sammelgel aufgetragen. Für die Zusammensetzung der Gele siehe 3.1.6. Die mit dem Gel gefüllten Glasplatten wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit Running Buffer aufgefüllt wurde. Nun wurden 15 µl Marker und jeweils 30µl der Proben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde dann an das Power Pac angeschlossen und für etwa 20 Minuten ließ man die Proben bei 60 Volt ins Sammelgel laufen. Nach weiteren zwei Stunden bei 120 Volt waren die Proben dann komplett aufgetrennt.

#### 3.2.6.3 Nass-Transfer

Mittels Nass-Transfer wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde zunächst in Methanol aktiviert und dann zusammen mit dem Trenngel zwischen zwei

Whatman-Papers in die Transferkammer eingelegt. Hierbei muss die Membran für einen erfolgreichen Transfer in Richtung der Anode zu liegen kommen. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und unter Verwendung einer Kühlschleife wurde der Transfer bei einer Stromstärke von 1000mA für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Reaktionen für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank in 5%-ige Milch gegeben.

#### 3.2.6.4 Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Der primäre Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wurde zusammen mit 5ml Milch zur Membran gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank auf der Rollbank inkubiert. Nach drei zwanzigminütigen Waschschritten in PBS-Tween konnte der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:10 000 in 10ml Milch gelöst und ebenfalls mit der Membran etwa eine Stunde lang inkubiert werden. Es folgten wiederum vier Waschschrritte mit PBST für jeweils 10 Minuten.

#### 3.2.6.5 Entwickeln

Es wurde eine Entwicklerlösung auf die Membran aufgetragen, wobei „Super Signal West“ Entwicklerlösungen (Pierce) vom Typ Pico, Dura und Femto eingesetzt wurden. Die Membran wurde anschließend in der Dunkelkammer auf einen Film aufgelegt und für variable Zeitabschnitte belichtet. Um Fehler in der Beladung der Gele auszuschließen, wurde stets  $\beta$ -Aktin als interne Ladungskontrolle verwendet.

### 3.2.7 Transfektion

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das Verfahren der Lipofektion und der retroviralen Transduktion genutzt. Es wurden Mutationen von Aurora Kinase A und B in die Lymphomzellen und das Protoonkogen *c-MYC* in NIH3T3-Zellen transfiziert.

### 3.2.7.1 Lipofektion

Bei der Lipofektion wird das genetische Material mittels Liposomen in die Zielzelle eingeschleust. Es kommt hierbei zu einer Komplexbildung zwischen den kationischen Lipiden und den anionischen Nukleinsäuren. Aufgrund ihrer äußerlich positiven Ladung und ihrer Lipophilie interagieren diese Komplexe mit der negativ geladenen und hydrophoben Zellmembran und werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen (Felgner et al. 1987).

Zur Produktion von retroviralen Partikeln wurden Zellen vom Typ Phoenix E verwendet. Von diesen wurden am Tag vor der Transfektion  $2,2 \times 10^6$  Zellen ausplattiert und ohne Zusatz von Antibiotika zum Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden zusammen mit jeweils 500  $\mu$ l Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium zum einen 10  $\mu$ g des Plasmids, zum anderen 20  $\mu$ l Lipofektamine<sup>™</sup> 2000 angesetzt. Nach einer fünfminütigen Wartezeit wurden die beiden Ansätze vermischt und noch einmal für 20 Minuten inkubiert. Dann wurde jeweils ein Milliliter sehr vorsichtig auf die Phoenixzellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank von vier bis sechs Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch  $\alpha$ -MEM ersetzt. Die Phoenixzellen produzierten nun retrovirale Partikel und gaben diese in das Medium ab.

### 3.2.7.2 Retrovirale Transduktion

Nach 12, 24 und 36 Stunden wurde der retrovirale Überstand von den Zellen abgenommen, durch 45  $\mu$ l Zellfilter gefiltert und unter Zugabe von 8  $\mu$ g/ml Polybren zur Verbesserung der Transduktionseffizienz auf die Zielzellen übertragen. Bei den adhärennten Zellen genügte dies, um eine ausreichende Infektionsrate zu erzielen. Für die Suspensionszellen wurde zusätzlich noch eine Spin Infection bei 36°C und 1200rpm für 60 Minuten durchgeführt. Die Plasmide mit den Mutationen von Aurora A und B sowie deren Leervektor enthielten außerdem eine Resistenz gegen Puromycin, sodass durch Zugabe von 3  $\mu$ l/ml Medium dieses Antibiotikums eine Selektion der Zellen erfolgen konnte, welche erfolgreich infiziert wurden. Anschließend wurde die Effizienz der Transfektion in real time PCR und Western Blot nachgewiesen. Das *c-MYC*-Konstrukt besaß dagegen das Reportergen GFP, sodass hier die Infektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt werden konnte.

### 3.2.8 Transduktion der siRNA- und der cDNA library

#### 3.2.8.1 Lipofektion

Die Transduktion der siRNA library wurde nach dem Protokoll des Herstellers *System Biosciences* (GeneNet™ Lentiviral shRNA Libraries User Manual) durchgeführt. Zur Produktion der lentiviralen Partikel wurden 293TN Zellen verwendet. Diese wurden am Vortag der Transfektion zu  $3 \times 10^6$  Zellen in 10cm-Platten ausplattiert. Es erfolgte die Lipofektion wie unter 3.2.7.1 beschrieben. Hierbei wurden pro Ansatz 20µl Lipofectamine mit 0,5ml Opti-MEM® I Reduced Serum Medium sowie 2µg der siRNA library mit 6,6µg beziehungsweise 3,4µg der Packplasmide pFIV34N und pMD2.G und ebenfalls 0,5ml Opti-MEM® vermischt. Nach fünf Minuten wurden die beiden Ansätze vereinigt und nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf die 293TN Zellen gegeben.

#### 3.2.8.2 Konzentration des Virusüberstands

Nach 12, 24 und 36 Stunden wurde der Virusüberstand abgenommen. Nach Empfehlung des Herstellers wurden die viralen Partikel mit *PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5x)*, bestehend aus Polyethylenglycol, konzentriert. Hierbei wurde *PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5x)* im Verhältnis 1:4 zum Überstand gegeben, 12 Stunden bei 4°C gekühlt und anschließend für 30 Minuten mit 1500xg bei 4°C zentrifugiert. Nun konnten die lentiviralen Partikel als beiges Pellet wahrgenommen werden. Nach Abnahme des Überstandes wurde noch einmal für fünf Minuten zentrifugiert und jegliche verbleibende Flüssigkeit abgenommen. Nun wurde das Pellet in 1 ml kaltem PBS gelöst und bei -80°C gelagert.

Alle Arbeiten in Verbindung mit den lentiviralen Partikeln wurden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt.

#### 3.2.8.3 Lentivirale Transduktion

Für die lentivirale Transduktion wurden die Zielzellen jeweils mit 1ml Medium zusammen mit 8µg/ml Polybren und 2µl des Viruskonzentrats versetzt. Bei den Suspensionszellen erfolgte eine Spin Infection für eine Stunde bei 1200rpm und 32°C, welche nach 24 und 48 Stunden wiederholt wurde.

Zur Überprüfung der Infektionseffizienz wurde eine Titerkontrolle mittels real-time PCR durchgeführt, siehe hierzu 3.2.5.2.

#### 3.2.8.4 Modifikationen im Protokoll

Nachdem die Titerkontrolle und somit die Infektion der Lymphomzelllinien 580 und 665 nach oben beschriebenem Protokoll nicht erfolgreich waren, wurden verschiedene Änderungen vorgenommen und die Versuche wiederholt.

Statt der 293TN Produktionszelllinie wurden die etablierten Phoenix E Zellen verwendet. Auf die Konzentration des Virusüberstandes mit *PEG-it™ Virus Precipitation Solution* wurde verzichtet, stattdessen wurde der virale Überstand direkt auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Da es nicht gelang, die Lymphomzelllinien zu infizieren, wurde der Versuch anstelle von diesen mit NIH3T3 myc Zellen durchgeführt, da diese Zelllinie im Allgemeinen leicht zu infizieren ist.

Entsprechend diesen Modifikationen konnte schließlich nach mehrmaligem Wiederholen des Versuchs eine Transduktionseffizienz von 64% erzielt werden.

#### 3.2.8.5 Transduktion der cDNA library

Die Transfektion der cDNA library erfolgte auf gleiche Weise wie oben beschrieben unter Verwendung von Phoenix E Zellen als Verpackungszelllinie. Zusammen mit der cDNA library wurde das Plasmid MSCV thCD2 in 1%-iger Konzentration transfiziert, um eine Kontrolle der Transduktionseffizienz zu gewährleisten. Hierzu wurde nach erfolgter Transduktion ein CD2 FACS durchgeführt, wobei eine Positivität der CD2-Färbung bei 1% der Zellen erwartet wurde, um von einer gelungenen Transduktion sprechen zu können.

### 3.2.9 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Programm Excel 2010 (Microsoft Windows) verwendet, wobei der Student's t-Test angewendet wurde. Nur zweiseitig ermittelte p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ermittlung einer geeigneten Konzentration des Aurora Kinase Inhibitors

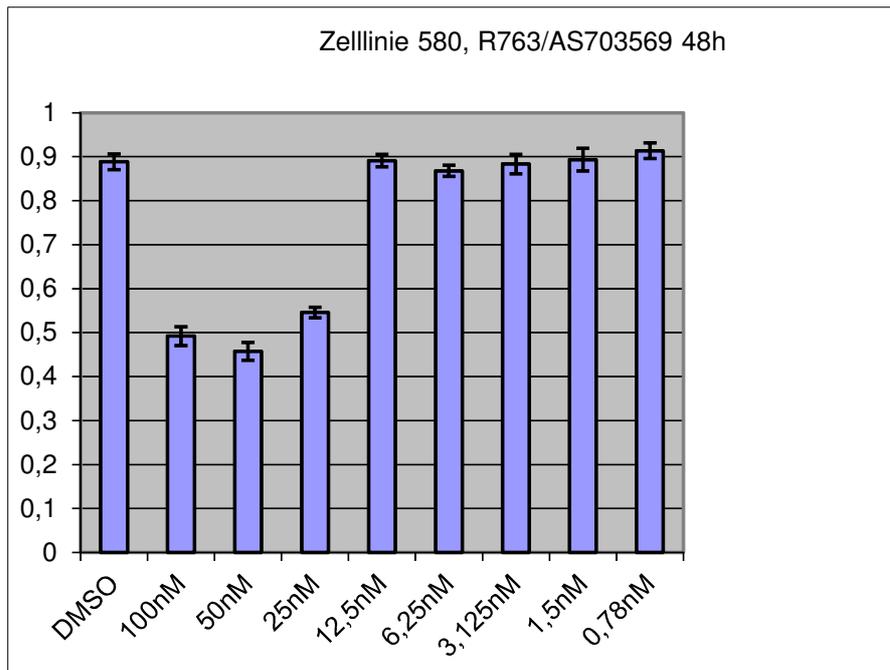
Es ist bekannt, dass in Myc-induzierten Lymphomzellen Aurora Kinase A und B vermehrt exprimiert werden (den Hollander et al. 2010). Der Einsatz von Aurora Kinase Inhibitoren (AKI) ist daher ein vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Myc-induzierten Lymphomen (Yang et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Mechanismen zu einer Resistenz von Myc-Lymphomzellen gegenüber der Exposition mit Aurora Kinase Inhibitoren führen.

Um später eine Resistenz feststellen zu können, musste zunächst eine geeignete Konzentration des Inhibitors ermittelt werden, bei der die Aurora Kinase-Funktion effizient inhibiert wird und die Zellen sicher absterben.

#### 4.1.1 25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/ AS703569 (Pan-Aurora Kinase Inhibitor) als wachstumshemmende Wirkstoffkonzentration

Es wurde zunächst ein MTT-Assay durchgeführt, wobei in einer 96-well-Platte myc-Lymphomzellen der Zelllinien 580 und 665 (Dreifachbestimmung, jeweils 100 000 Zellen pro well) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,78nM bis 100nM) des Inhibitors R763/AS703569 für 24h und 48h inkubiert wurden. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, war die Viabilität der Zellen (als Beispiel ist hier die Zelllinie 580 nach 48h dargestellt) ab einer Konzentration von 25nM deutlich reduziert im Vergleich zur Negativkontrolle.



**Abbildung 5: Ermittlung einer geeigneten Konzentration von R763/AS703569.** Zellen der Lymphomzelllinie 580 wurden 48h mit dem Inhibitor inkubiert. Daraufhin wurde MTT zu den Zellen gegeben und nach 2h die Viabilität mittels Farbumschlag spektrophotometrisch gemessen. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors zwischen 0,78nM und 100nM eingesetzt. Man kann erkennen, dass die Viabilität ab einer Konzentration von 25nM im Vergleich zur Negativkontrolle (nur DMSO, kein Inhibitor) deutlich abnimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen ( $\pm$ Standardabweichung).

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels PI-FACS durchgeführt. Die Zelllinien 580 und 665 wurden wiederum für 24h und 48h mit dem Inhibitor inkubiert, als Beispiel sei in Abbildung 6 die Linie 580 nach 48h R763/AS703569-Exposition dargestellt. Hier konnte man deutlich erkennen, dass bei einer Konzentration von 25 und 100nM die Viabilität der Zellen erheblich eingeschränkt ist. Ein Großteil der Zellen befindet sich in der subG0-Phase und ein weiterer großer Anteil besitzt einen oktoploiden Chromosomensatz, was die Polyploidie als Reaktion auf Aurora Kinase Inhibitoren bestätigt (Yang et al. 2010; Wilkinson et al. 2007). Dagegen sieht man bei den Zellen, die mit 10nM R763/AS703569 inkubiert wurden, im Vergleich zur Negativkontrolle kaum einen Unterschied.

Somit wurde eine Konzentration von 25nM R763/AS703569 für die weiteren Experimente als geeignet erachtet, da bei dieser Konzentration eine etwaige Resistenz der Zellen gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitor deutlich sichtbar sein sollte.

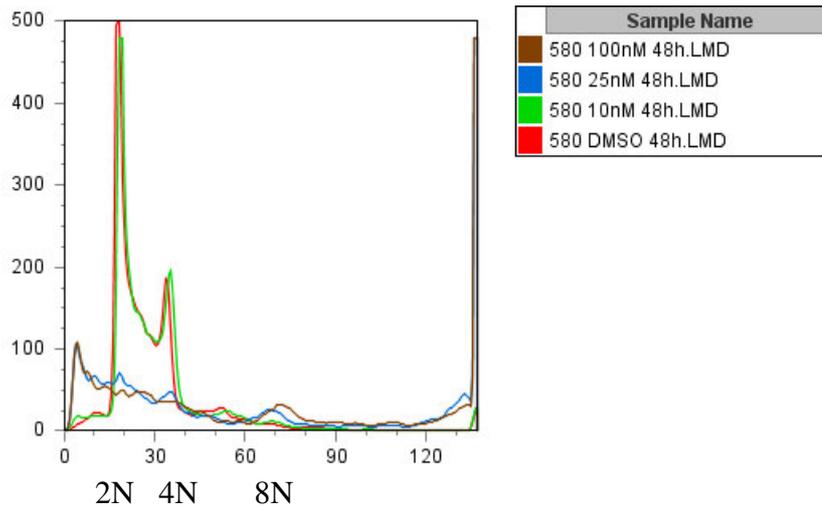


Abbildung 6: *PI-FACS, Zelllinie 580 mit 10, 25 und 100nM R763/AS703569. Die Zellen wurden 48h mit dem Inhibitor inkubiert, dann fixiert und mit Propidium-Iodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Ab einer Konzentration von 25nM befanden sich die meisten Zellen in der subG0-Phase oder wurden polyploid. Als Negativkontrolle wurde DMSO in gleicher Verdünnung wie der Inhibitor verwendet.*

#### 4.1.2 Geringeres Ansprechen auf den Aurora A-spezifischen Inhibitor

##### MLN8237

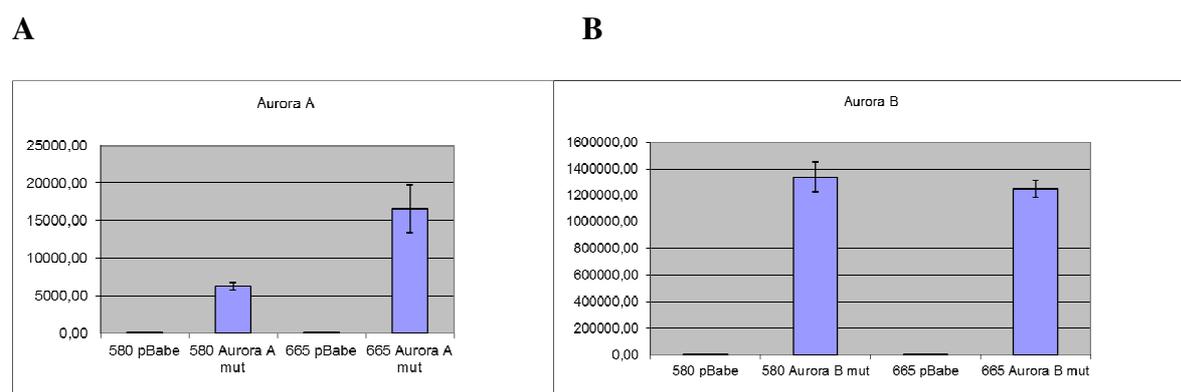
In gleicher Weise wie unter 4.1.1 beschrieben, wurden die Zelllinien 580 und 665 mit einem weiteren Aurora Kinase-Inhibitor, MLN 8237, untersucht. Dieser Inhibitor hemmt selektiv die Funktion der Aurora Kinase A (IC<sub>50</sub>= 1,2nM). Hierbei wurde festgestellt, dass im Vergleich zu R763/AS703569 eine höhere Konzentration des Inhibitors nötig war, um das normale Wachstum der Lymphomzelllinien zu hemmen. Bei einer Inkubation der Linie 665 über 48 Stunden mit 200nM MLN 8237 befanden sich beispielsweise in der Zellzyklusanalyse 28,8% der Zellen in der subG0-Phase und 39,3% waren als polyploid anzusehen. Das verminderte Ansprechen auf den selektiven Aurora Kinase A Inhibitor ist dabei wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in Myc-überexprimierenden Zellen die Promotoraktivität für *AURKB* im Vergleich zu *AURKA* um ein Vielfaches mehr erhöht wird, was Aurora B zum wichtigeren Angriffsziel in Myc-induzierten Lymphomen macht (den Hollander et al. 2010). Da jedoch bei einer so hohen Konzentration wie 200nM vermutlich auch Aurora B zum Teil mitinhibiert wird, lässt sich der Zelluntergang sowie die Polyploidie als Effekt der Aurora B-Hemmung erklären.

## 4.2 Untersuchung von Lymphomzellen mit Mutation von *AURKA* beziehungsweise *AURKB*

In der vorliegenden Arbeit sollten Resistenzmechanismen untersucht werden, die zu einer Unempfindlichkeit von Lymphomzellen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren (AKI) führen. Um den Effekt einer Resistenz besser einschätzen zu können, wurden zunächst Lymphomzellen untersucht, in welche *AURKA* bzw. *AURKB* eingebracht wurden, an die aufgrund einer Mutation der Inhibitor nicht mehr binden konnte. Die Zellen sollten dementsprechend unempfindlich dem AKI gegenüber sein.

### 4.2.1 Infizierte Lymphomzellen zeigen deutliche Überexpression von Aurora A und B

In die Lymphomzelllinien 580 und 665 wurde jeweils ein Plasmid eingebracht, das eine Punktmutation im Gen für Aurora Kinase A (G216V) bzw. B (G160V) besaß (pBABE-*AURKA*-puro, pBABE-*AURKB*-puro), sowie zur Kontrolle ein Leervektor (pBABE-puro). Eine Überexpression von Aurora Kinase A und B konnte sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 gezeigt wird.



**Abbildung 7: Expression der AURKA/B-Mutation in Lymphomzellen der Linie 580 und 665; real-time-PCR, semiquantitative Auswertung.** Im Vergleich zu den Zellen mit Leervektor (pBABE) sieht man eine um ein Vielfaches erhöhte Expression von AURKA (A) und AURKB (B) in den transduzierten Zellen. Die PCR wurde mit 40 Zyklen durchgeführt. Als

Ladungskontrolle wurde die Expression von Ubiquitin gemessen und bei der Auswertung von der Expression der AURKA/B-Mutante abgezogen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei Ansätzen ( $\pm$ Standardabweichung).

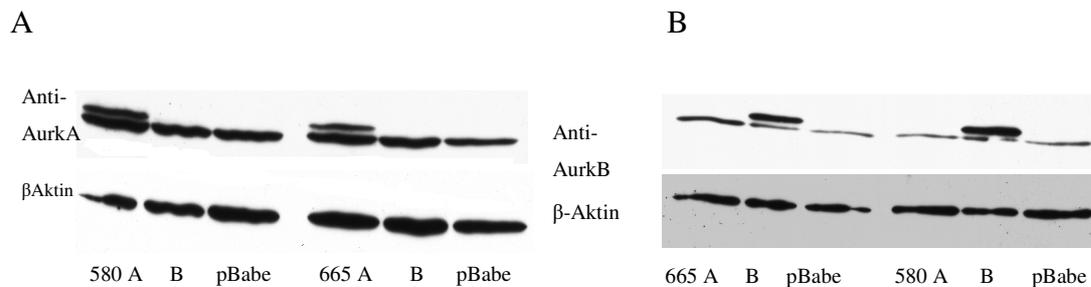


Abbildung 8: **Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Aurka (A) und Aurkb (B) in Lymphomzelllinien 580 und 665 nach Transduktion.** In den Zellen mit der eingebrachten AURKA- bzw. AURKB-Mutation sieht man eine deutlich verbreiterte Bande für die jeweilige Aurora Kinase. Es wurde mit Antikörpern gegen Aurka bzw. Aurkb gefärbt. Als Ladungskontrolle wurde Beta-Aktin verwendet.

Da es sich bei Histon H3 um ein bekanntes Substrat von Aurka/b handelt (Hirota et al. 2005; Giet, Glover 2001; Ding et al. 2011), wurden weiterhin die Proteinlevels von phosphoryliertem Histon H3 (pHH3) in den transfizierten Lymphomzellen bestimmt. Aurka/b phosphorylieren Histon H3 an Serin-10.

Erhöhte Levels von pHH3 in den Aurka- bzw. Aurkb-überexprimierenden Lymphomzellen deuten daher auf eine erfolgreiche Transfektion sowie eine gute Funktion von Aurka und Aurkb hin.

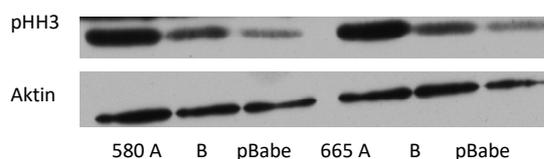


Abbildung 9: **Vermehrte Expression von pHH3 als Effekt von Aurka/b-Überexpression; Western Blot.** Erhöhte Proteinlevels von phosphoryliertem Histon H3 (pHH3) bestätigen die gelungene Überexpression von mutierten AURKA/ B in den Lymphomzellen, da es sich bei

*Histon H3 um ein bekanntes Substrat der Aurora Kinasen handelt, welches an Serin 10 phosphoryliert wird (Hirota et al. 2005; Giet, Glover 2001).*

#### 4.2.2 Aurora B-Mutante besitzt wirkungsvolle Resistenz gegenüber R763/AS703569

Daraufhin wurden die entwickelten *AURKA/B*-mutierten Lymphomzellen auf ihre Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren getestet und mit dem Wildtyp verglichen. Erwartet wurde, dass die *AURKA/B*-mutierten Zellen weitestgehend unempfindlich gegenüber dem AKI sind, da sie funktionsfähige Aurora Kinasen besaßen, an welche der AKI aufgrund der Mutation in der Bindungsstelle nicht binden und somit keine Wirkung erzielen konnte.

Um dies zu untersuchen, wurden sowohl die *AURKA/B*-Mutanten als auch Kontrollzellen mit Leervektor für 24 bzw. 48 Stunden mit dem Aurora Kinase Inhibitor R763/AS703569 inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen im MTT-Assay ermittelt, sowie eine Zellzyklusanalyse im FACS durchgeführt.

Hierbei wurde deutlich, dass die Zellen mit *AURKB*-Mutation sichtlich weniger sensibel auf den AKI reagieren als die Kontrollzellen. Als Beispiel sei hier eine Zellzyklusanalyse nach 48 Stunden mit 25nM R763/AS703569 gezeigt. Während die Kontrollzellen der Linie 665, wie schon in den entsprechenden vorherigen Versuchen gezeigt, mit Apoptose (33% der Zellen befinden sich in der subG0-Phase) und Polyploidie (23% der Zellen) reagieren, zeigen die *AURKB*-mutierten Zellen ein annähernd normales Verhalten im Zellzyklus und sind in ihrer Viabilität kaum eingeschränkt (4,9% in subG0, 5,6% polyploid). Es besteht somit ein signifikanter Unterschied in der Reaktion der *AURKB*-mutierten Zellen in Hinblick auf Apoptose ( $p=0,004$ ) und Polyploidie ( $p=0,003$ ). Ein ähnlich markanter Unterschied konnte auch noch bei einer Konzentration von 100nM R763/AS703569 beobachtet werden.

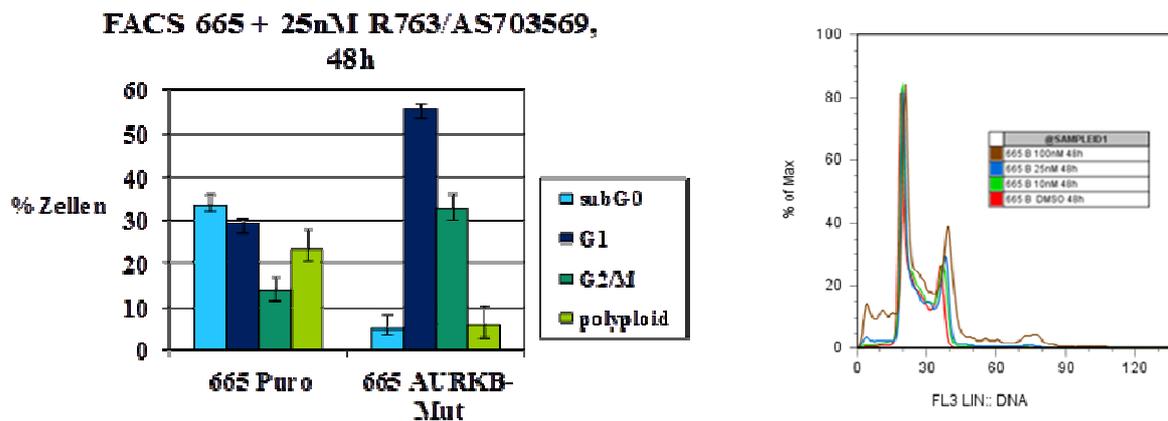


Abbildung 10: Zellen mit mutierter Aurora Kinase B sind resistenter gegenüber dem AKI im Vergleich zur Kontrolle. Die Zellen wurden jeweils 48h mit 25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 inkubiert. Daraufhin wurde eine Zellzyklusanalyse mit Propidium-Iodid-Färbung durchgeführt. Man kann sehen, dass die Zellen mit exprimierter AURKB-Mutation nach Exposition mit dem AKI ein annähernd normales Zellbild zeigen, während die Kontrollzellen mit Leervektor bei gleicher Exposition einerseits in Apoptose gehen ( $p=0,004$ ; Student's *t*-test) und andererseits polyploid werden ( $p=0,003$ ). Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen ( $\pm$ Standardabweichung).

Ein vergleichbares Ergebnis konnte jedoch für die AURKA-mutierten Zellen nicht erzielt werden. Diese Zellen zeigten in ihrer Reaktion auf den AKI ein ähnliches Bild wie die Wildtyp-Zellen: Ein Großteil der Zellen befand sich in der subG0-Phase, ein weiterer Teil reagierte mit Polyploidie. Im Vergleich zur Kontrolle konnte keine signifikante Resistenz gegenüber dem AKI festgestellt werden ( $p=0,83$ ). Dies bestärkt wiederum die These, dass in Myc-induzierten Lymphomen Aurora Kinase B das vordergründige Angriffsziel für Aurora Kinase Inhibitoren darstellt (den Hollander et al. 2010).

Durch die beschriebenen Experimente stellte sich heraus, dass eine wirkungsvolle Resistenz der Myc-assoziierten Lymphomzellen gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 bei einer Konzentration von 25nM des Inhibitors sehr gut beurteilt werden konnte.

## 4.3 Evaluation von Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren

### 4.3.1 Infektion von Myc-Lymphomzellen mit siRNA library

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Myc-assoziierte Lymphomzellen auf Resistenzmechanismen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren zu untersuchen und diese näher zu analysieren.

Dazu sollte zunächst eine siRNA library in die Zellen transfiziert werden und diese nach erfolgreicher Infektion mit 25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 inkubiert werden. Die Zellen sollten dann auf ein Wachstum hin beobachtet werden, wobei ein Farbumschlag des Mediums als ausschlaggebender Faktor angesehen wurde.

#### 4.3.1.1 Etablierung einer Methode zur Infektion mit der siRNA library

Die Transfektion wurde weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers der siRNA library durchgeführt. Die siRNA library wurde von Jonas Nilsson zur Verfügung gestellt. Sie besteht aus 150 000 siRNA-Sequenzen, welche 39 000 murine mRNAs zum Ziel haben, wobei für die meisten Zielgene vier verschiedene siRNA-Sequenzen vorliegen (<http://www.systembio.com/rnai-libraries/mouse-genome-wide/technical-details>. 10.07.2012). SiRNAs sind kleine, etwa 19-23 Nukleotide umfassende doppelsträngige RNA-Stücke, wobei sie am 3'-Ende einen Überhang von 2 Nukleotiden besitzen und das 5'-Ende phosphoryliert ist (Hannon 2002). Die RNA wird entwunden und ein Einzelstrang wird in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut. RISC kann nun zur siRNA komplementäre mRNA-Sequenzen erkennen und spaltet diese endonukleolytisch, woraufhin die entsprechende mRNA funktionslos und die Translation und Proteinproduktion gehemmt wird (Hannon 2002, Rüdell S, Meister G. 2007). Zur Produktion von lentiviralen Partikeln, die einzelne siRNA-Sequenzen enthalten, wurden Zellen der Linie 293TN (Humane embryonale Nieren Zell-Linie) mit den Lentivektor-Konstrukten der siRNA library sowie zwei verschiedenen Pack-Plasmiden (pFIV34N und pMD2.G) in Gegenwart von Lipofectamine transfiziert. Anschließend wurde der nach 24, 36 und 48 Stunden produzierte Virus, versetzt mit 8µg/ml Polybrene, auf die Lymphomzellen gegeben und jeweils eine Spin-Infektion durchgeführt.

#### 4.3.1.2 Titerkontrolle nach Infektion mit der siRNA library mittels real time PCR

Im Hinblick auf die späteren Untersuchungen auf Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren war es wichtig, eine Titerbestimmung zur Kontrolle der Transduktionseffizienz durchzuführen. Um etwaige Resistenzen gut beurteilen und charakterisieren zu können, sollte jede einzelne Lymphomzelle nicht mehr als einen Knockdown erfahren.

Die Titerkontrolle wurde mit dem Global UltraRapid Lentiviral Titer Kit von System Biosciences durchgeführt, welches vom Hersteller insbesondere für Transduktionen der siRNA library empfohlen wird.

Dazu werden die infizierten Zellen lysiert und in der real time PCR wird das WPRE-Element (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulation Element), welches im lentiviralen Konstrukt integriert und damit auch in den infizierten Zellen vorhanden ist, amplifiziert und mit dem ubiquitär exprimierten UCR1 verglichen. Die Anzahl der Kopien von WPRE korreliert somit mit den eingebauten Konstrukten.

Das Verhältnis der infektiösen Viruspartikel zu der Anzahl der zu infizierenden Zellen wird durch den Ausdruck multiplicity of infection (MOI) beschrieben. Um letztendlich die MOI der mit der siRNA library infizierten Zellen zu bestimmen, wurde mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards mit bekannter MOI eine Standardkurve ermittelt.

Hierbei werden die MOIs der Standards gegen  $2^{-\Delta Ct}$  [ $\Delta Ct = Ct \text{ WPRE} - Ct \text{ UCR1}$ ] aufgetragen und daraus eine Standardkurve erstellt, in deren Gleichung  $2^{-\Delta Ct}$  der Proben eingesetzt wird und somit die MOI der infizierten Zellen errechnet werden kann.

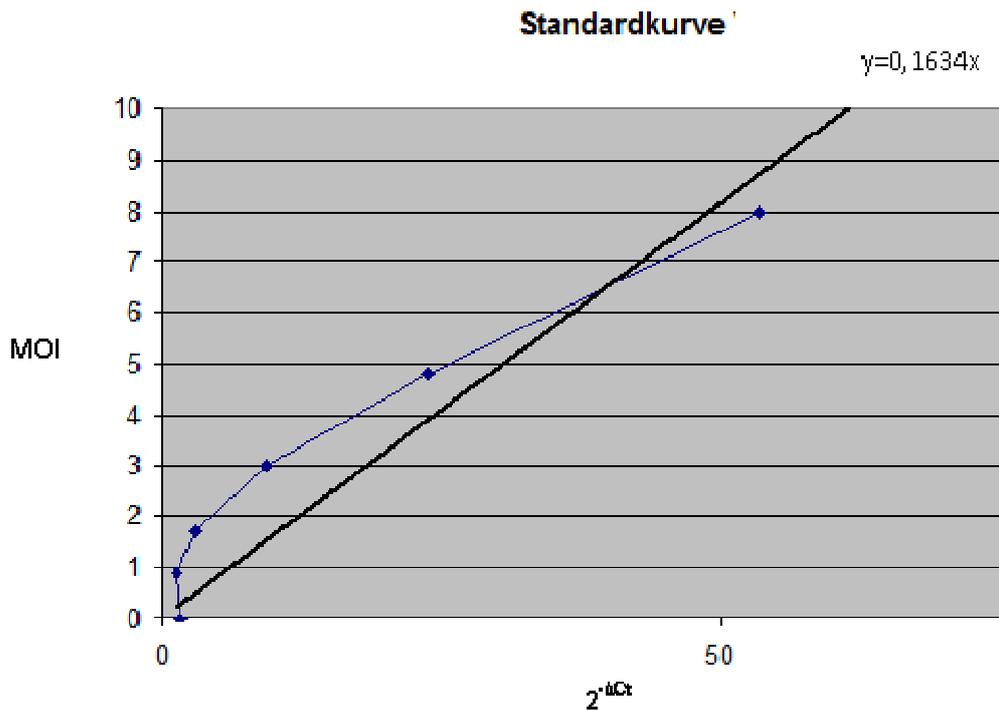
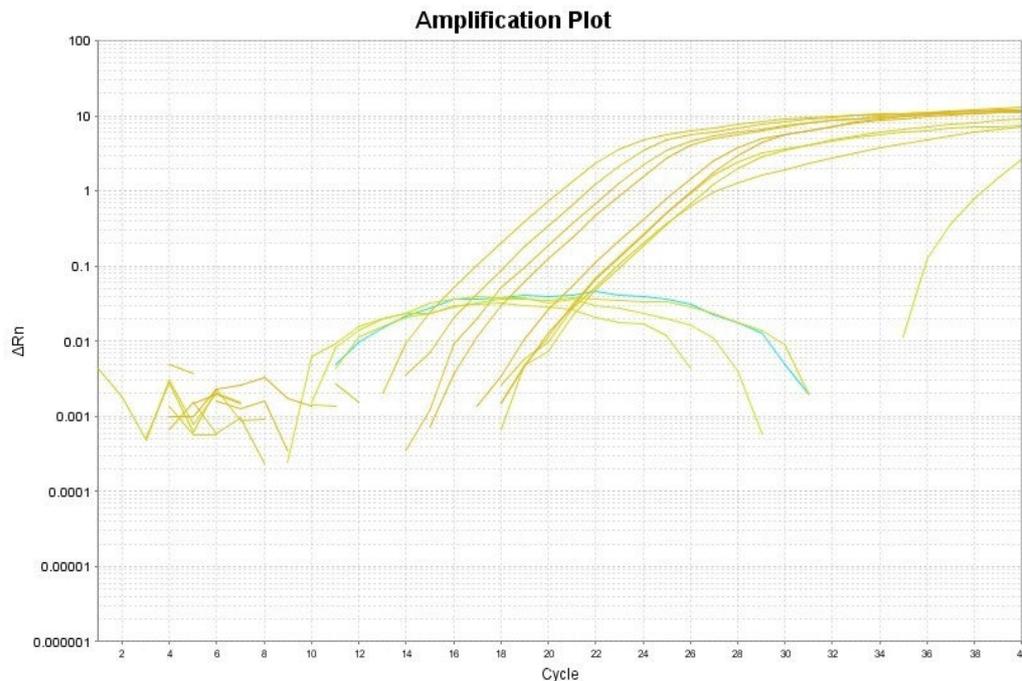


Abbildung 11: *Ermittlung einer Standardkurve zur Titerbestimmung als Kontrolle der Infektion.* Die bekannten MOIs der im Kit enthaltenen Standards wurden gegen den errechneten Wert  $2^{-\Delta Ct}$  aufgetragen. In der real time PCR wurden dabei Primer (forward und reverse) für UCRI und WPRE verwendet.  $\Delta Ct$  bezeichnet hierbei die Differenz zwischen UCRI und WPRE. Nach Hinzufügen einer Trendlinie kann die Gleichung der Standardkurve bestimmt werden.

#### 4.3.1.3 Keine erfolgreiche Infektion der Lymphomzelllinien möglich

Nach Erstellung einer Standardkurve wurde die real time PCR in gleicher Weise mit den infizierten Lymphomzelllinien 580 und 665 durchgeführt. Hierbei wurde jedoch festgestellt, dass für diese Proben keine relevante Amplifikation von WPRE zustande kam (siehe Abbildung 12), was auf einen fehlenden Einbau der siRNA library-Konstrukte in die Zellen hindeutete. Auch nach mehrmaligem Wiederholen der Versuche und verschiedenen Modifikationen im Protokoll für die Transduktion konnte kein Erfolg erzielt werden. Dies wurde der Tatsache zugeschrieben, dass die Lymphomzelllinien generell nicht einfach zu infizieren sind und auch vom Hersteller der siRNA library bestätigt wird, dass verschiedene Zelllinien sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigen, was die Effizienz der Infektion angeht. Als Beispiel sei hier die murine Monozyten-Makrophagen Zell-Linie P388 genannt, die nur eine

Effizienz zwischen 0,02 und 0,18 im Verhältnis zur Linie H1299 zeigt, welche als Vergleich herangezogen wurde (System Biosciences).



**Abbildung 12: Keine erfolgreiche Infektion der Lymphomzellen.** Im gezeigten Amplification Plot der real time PCR erkennt man keine Amplifikation von WPRE in den Lymphomzelllinien. Dagegen sieht man bei den Standards über weite Strecken einen exponentiellen Anstieg der Amplifikation.

#### 4.3.2 Infektion von NIH 3T3 Myc- Zellen mit der siRNA library

Da die Lymphomzelllinien 580 und 665 nicht erfolgreich mit der siRNA library infiziert werden konnten, wurde der Versuch mit NIH 3T3 Zellen (einer murinen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie) wiederholt. Diese Zellen sind besonders geeignet für Transduktionen und zeigten auch im Protokoll des Herstellers der siRNA library eine bessere Transduktionseffizienz.

#### 4.3.2.1 NIH Myc Zellen zeigen höhere Sensitivität gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren im Vergleich zu Kontrollzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Myc ein bestimmender Faktor in Hinblick auf die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren ist, da die Aurora Kinasen in Myc-überexprimierenden Zellen vermehrt exprimiert werden (den Hollander et al. 2010; Yang et al. 2010).

Daher wurde zunächst *MYC* in die NIH 3T3-Zellen transduziert, um vergleichbare Bedingungen zu den Lymphomzellen zu schaffen und eine ausreichende Sensitivität gegenüber dem AKI zu gewährleisten. Für die Transduktion wurden *MYC*-Konstrukte sowie zur Kontrolle der Leervektor MIG verwendet, welche beide GFP als Reportergen besaßen. Die Effizienz der Transduktion wurde mittels GFP-Detektion in der FACS-Analyse bestätigt. Hierbei waren jeweils etwa 85% der Zellen GFP-positiv, was für einen wirkungsvollen Einbau der Konstrukte in die NIH 3T3-Zellen spricht.

Daraufhin wurden die transduzierten Zellen für 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des AKI R763/AS703569 inkubiert und anschließend die Sensitivität gegenüber dem AKI in einer Zellzyklus-Analyse (PI-FACS) beurteilt.

Hierbei konnte die Hypothese, dass die Myc-überexprimierenden NIH3T3-Zellen empfindlicher auf den Inhibitor reagieren, bestätigt werden. Als Beispiel sei dazu in Abbildung 13 eine Zellzyklus-Analyse nach 48 Stunden mit 50nM R763/AS703569 gezeigt. Hierbei ist deutlich erkennbar, dass die NIH Myc-Zellen sensibler gegenüber dem AKI sind. Während 62 % der NIH Myc-Zellen Polyploidie aufweisen, sind dies bei den Zellen mit dem Leervektor MIG 45 %. In der subG0 Phase befinden sich 16 % der NIH Myc-Zellen, jedoch nur 2 % der NIH MIG, die Myc-überexprimierenden Zellen zeigen damit einen weitaus größeren Anteil toter Zellen. Somit kann durchaus davon ausgegangen werden, dass durch die Myc-Überexpression in den NIH3T3-Zellen eine um Einiges höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitor besteht ( $p < 0,001$ ).

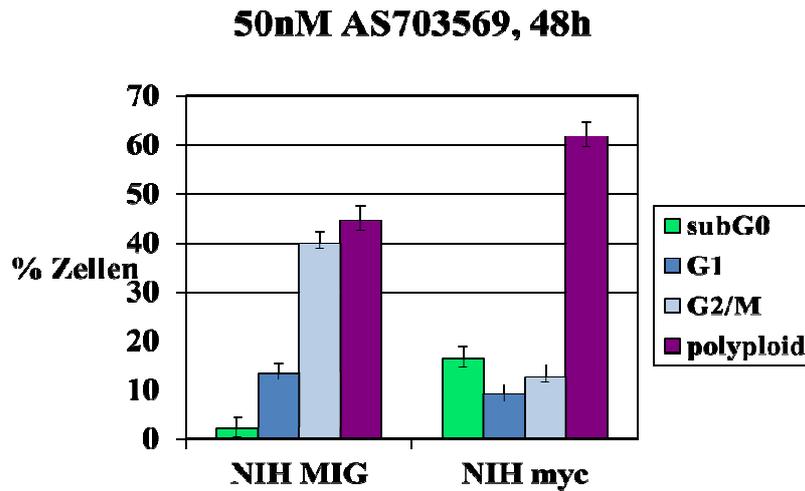
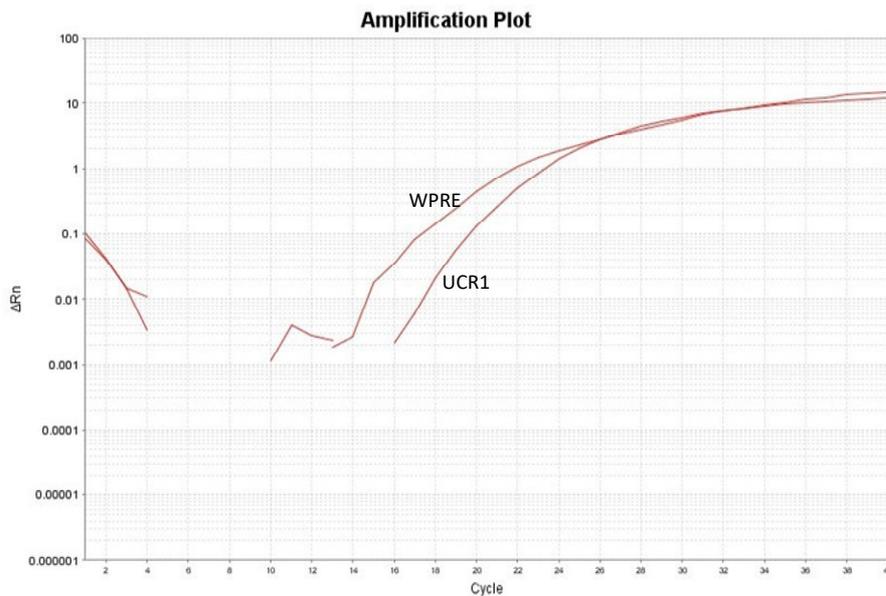


Abbildung 13: NIH Myc-Zellen sind empfindlicher gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitor als entsprechende Zellen mit MIG-Leervektor. Die Zellen wurden jeweils in gleicher Weise für 48h mit 50nM R763/AS703569 inkubiert, dann fixiert und PI-gefärbt. Anschließend wurde eine Zellzyklusanalyse im FACS durchgeführt. 16 % der NIH Myc-Zellen zeigen dabei eine Reaktion mit Zelltod (subG0-Phase) und 62 % mit Polyploidie. Demgegenüber befinden sich nur 2 % der NIH MIG-Zellen in der subG0-Phase (Student's t-test;  $p < 0,001$ ) und 45 % sind polyploid ( $p < 0,001$ ). Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen ( $\pm$ Standardabweichung).

#### 4.3.2.2 Erfolgreiche Infektion der NIH Myc Zellen mit siRNA library

Die Infektion der NIH Myc-Zellen mit der siRNA library wurde in ähnlicher Weise durchgeführt wie unter 4.3.1.1 beschrieben. Zur Produktion des Lentivirus wurden Phoenixzellen verwendet, die Transfektion der siRNA library wurde unter Zugabe der Packplasmide pVSV-G und pFIV-34N sowie von Lipofectamine durchgeführt. Die NIH Myc-Zellen wurden daraufhin dreimal für 12 Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert. Wiederum wurde eine Titerkontrolle mithilfe des Global UltraRapid Lentiviral Titer Kit von System Biosciences durchgeführt.

Nun konnte eine Amplifikation von WPRE festgestellt werden, was auf einen erfolgreichen Einbau der siRNA-Konstrukte in die Zellen hindeutete.



**Abbildung 14: Erfolgreiche Transduktion der siRNA library in die NIH myc-Zellen.** Von dem in der real-time PCR ermittelten Ct-Wert für WPRE wurde Ct UCR1 abgezogen ( $\Delta Ct$ ).  $2^{-\Delta Ct}$  wurde berechnet und in die aus der Standardkurve ermittelte Gleichung  $y=0,1634x$  (siehe Abbildung 11) eingesetzt, woraufhin eine MOI von 0,64 bestimmt wurde.

$\Delta Ct$  wurde berechnet und  $2^{-\Delta Ct}$  wurde in die Gleichung der Standardkurve eingesetzt (siehe auch 4.3.1.2).

Hierbei konnte eine MOI von 0,64 errechnet werden. Da die Titerbestimmung direkt mit den transduzierten Zellen durchgeführt wurde, ist dies ein Maß für die Effizienz der Transduktion und steht für die Anzahl an Vektoren, die in eine Zelle integriert wurden, bzw. es wurden 64 % der Zellen mit einem Vektor infiziert.

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass ein ausreichender Anteil an Zellen ein siRNA-Konstrukt aufgenommen und damit einen Knockdown erfahren hat.

#### 4.3.3 Erfolgreiche Infektion der NIH Myc-Zellen mit einer cDNA library

Neben der Hypothese, dass der Knockdown verschiedener Gene eine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln kann, besteht auch die Möglichkeit, durch die Überexpression bestimmter Gene eine Unempfindlichkeit gegenüber dem AKI herbeizuführen.

Um dies ebenfalls zu untersuchen, wurde in gleicher Weise wie oben für die siRNA library beschrieben, eine cDNA library in die NIH Myc-Zellen transduziert.

Diese besteht aus einer großen Anzahl von cDNAs, welche aus der transkribierten mRNA hergestellt werden (Ko 1990). Die cDNA library wurde ebenfalls von Jonas Nilsson zur Verfügung gestellt.

Von Phoenixzellen wurde nach Zugabe der cDNA-Plasmide und Lipofectamine Virus produziert, mit welchem anschließend die NIH Myc-Zellen infiziert wurden.

Da die cDNA library keinerlei Reportergen enthielt und es somit nicht möglich war, die Effizienz der Transduktion zu beurteilen, wurde zusätzlich der Vektor MSCV thCD2 transfiziert. Hierbei wurde ein Prozent der Konzentration der cDNA library eingesetzt.

Anschließend wurden die Zellen mit Anti-CD2 gefärbt und in der FACS-Analyse beurteilt. Da sieben Prozent der Zellen CD2-positiv waren, wurde von einer guten Transduktionseffizienz ausgegangen und damit auch auf eine erfolgreiche Infektion der cDNA library geschlossen.

Nun sollten die Zellen im nächsten Schritt auf die Entwicklung von Resistenzen in Gegenwart des Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 mittels eines Screenings untersucht werden.

#### 4.3.4 Keine Entwicklung von Resistenzen gegenüber AKI bei den infizierten NIH Myc Zellen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Knockdown beziehungsweise ektopter Expression von Genen einen Hinweis auf bestimmte Proteine zu erhalten, welche Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln können.

Nachdem die siRNA library sowie die cDNA library erfolgreich in die NIH Myc-Zellen transduziert worden waren, sollten nun mittels eines Screenings entsprechende Gene identifiziert werden, welche für ein Wachstum der Zellen trotz Zugabe eines AKI verantwortlich sind und somit Resistenzfaktoren darstellen.

Dazu wurden die Zellen in 96-well-Platten ausplattiert und mit der als geeignet befundenen Konzentration von 25nM des Inhibitors R763/AS703569 inkubiert. Ein Wachstum der Zellen sollte als ausschlaggebender Hinweis auf eine Resistenzentwicklung dienen.

Hierbei war es wichtig, dass eine genügend große Anzahl an Zellen verwendet wurde, um möglichst viele Knockdowns beziehungsweise Überexpressionen zu screenen.

Da die siRNA library aus 150 000 Konstrukten bestand und von einer Transduktionseffizienz von 64 % ausgegangen wurde, mussten somit mindestens 235 000 Zellen ausplattiert werden. Um die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses zu erhöhen, wurden sicherheitshalber 15 96-well-Platten mit NIH Myc-Zellen, die mit der siRNA library infiziert worden waren, und 15 Platten mit Zellen mit der cDNA library ausplattiert.

Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht zu dicht ausgesät wurden, sodass ein etwaiges Wachstum eines Zellklons, der eine Resistenz gegenüber dem AKI aufwies, gute Wachstumsbedingungen hatte. Als Indikator für ein Wachstum der Zellen im Beisein des Inhibitors sollte ein Farbumschlag des roten DMEM-Mediums ins Gelbliche dienen, was ein Hinweis auf den zunehmenden Verbrauch von im Medium enthaltenen Nährstoffen ist.

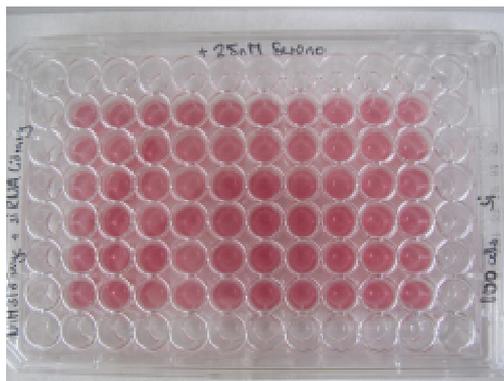
Die Anzahl der Zellen pro well musste dementsprechend so gering gehalten werden, dass das Medium sich nicht unspezifisch nach nur wenigen Tagen verfärbte, sondern ein Farbumschlag tatsächlich nur bei einem gesteigerten Zellwachstum auftrat und damit als Zeichen für eine Resistenzentwicklung der Zellen gewertet werden konnte.

Es wurden mehrere Versuche durchgeführt, wobei jeweils zwischen 100 und 2000 Zellen pro well ausplattiert wurden. Die Zellen wurden mit 25nM R763/AS703569 inkubiert und das Medium wurde einmal pro Woche gewechselt.

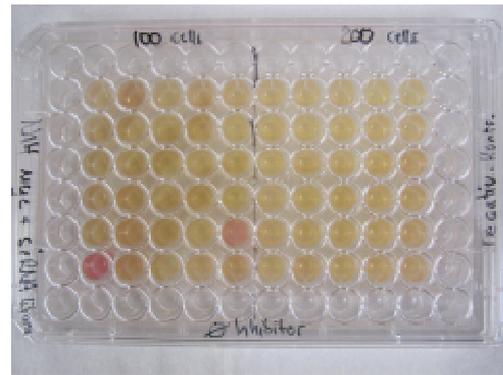
Obwohl die Zellen mehrere Wochen so behandelt wurden, konnte weder für die NIH Myc-Zellen mit infizierter siRNA library noch für die cDNA library Zellen in bestimmten wells ein Farbumschlag festgestellt werden und somit auch kein Wachstum eines resistenten Klons.

Auch mikroskopisch konnte kein well ermittelt werden, in welchem Zellen durch normales Wachstum herausstachen. Die NIH Myc-Zellen zeigten lediglich eine schon bekannte Reaktion auf den Inhibitor, indem sie sehr groß und blasig wurden, vermutlich ein Korrelat zur Polyploidie und fehlenden Zellteilung (vergleiche hierzu Abbildung 13). Viele Zellen gingen in Apoptose und lösten sich vom Untergrund ab.

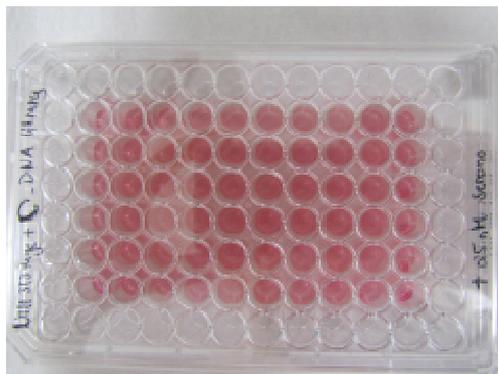
Dagegen zeigten die zur Kontrolle ohne Inhibitor ausplattierten Zellen ein regelrechtes Wachstum, die wells waren nach kurzer Zeit dicht bewachsen und das Medium verfärbte sich gleichmäßig gelb.



**siRNA-library + 25nM AS703569**



**siRNA-library, Kontrolle ohne Inhibitor**



**cDNA-library + 25nM AS703569**

Abbildung 15: *Kein Wachstum der mit der siRNA- bzw. cDNA library infizierten NIH Myc-Zellen in Gegenwart des AKI. Es wurden jeweils 100 bzw. 200 Zellen pro well ausplattiert und mit 25nM R763/AS703569 inkubiert. Auch nach mehreren Wochen zeigte sich in keinem well ein Farbumschlag als Hinweis auf ein resistenzvermitteltes Zellwachstum. In der Negativkontrolle ohne den Inhibitor erkennt man dagegen deutlich die Gelbfärbung des Mediums.*

Nachdem der Versuch mehrere Male wiederholt worden war, und nie ein Wachstum in einzelnen wells zu beobachten war, musste festgestellt werden, dass das Screening auf Resistenzmechanismen gegen Aurora Kinase Inhibitoren nicht erfolgreich war.

#### 4.4 Überexpression von Bcl-2 vermittelt Resistenz gegenüber AKI

Da der Versuch, durch den Einbau einer siRNA- und einer cDNA library in Myc-überexprimierende Zellen Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren hervorzurufen,

letztendlich als gescheitert angesehen wurde, sollte nun versucht werden, die verwendeten Methoden als durchaus funktional zu bestätigen.

Hierbei wurde ein Gen untersucht, von dem schon bekannt ist, dass es eine gewisse Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermittelt.

In der Literatur ist beschrieben, dass Aurora Kinase A eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 bewirkt. Wird Bcl-2 dagegen durch RNA-Interferenz mittels siRNA gehemmt, so nehmen anti-apoptotische Effekte von Aurora-Kinase A signifikant ab, und die Viabilität der Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung ist deutlich herabgesetzt im Vergleich zu Kontrollzellen mit funktionierendem Bcl-2. Dies deutet darauf hin, dass Bcl-2 an dem anti-apoptotischen Effekt einer Aurora A-Überexpression maßgeblich beteiligt ist (Wang et al. 2006).

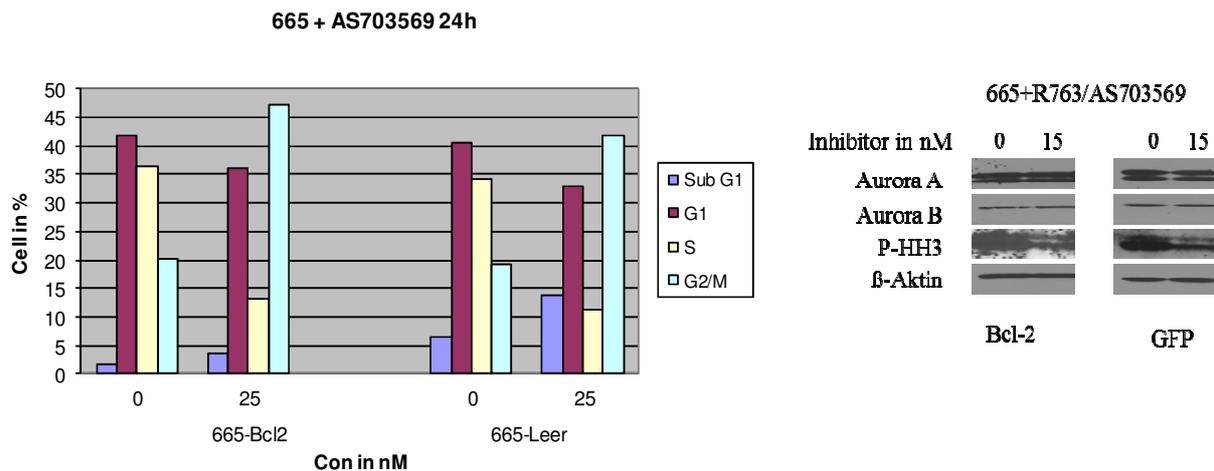
Darüber hinaus ist bekannt, dass der Aurora Kinase Inhibitor VX680 zu einer Anhebung der Bax/Bcl 2-Ratio führt, wobei nach einer Behandlung mit dem AKI erhöhte Mengen des pro-apoptotischen Proteins Bax sowie ein verringerter Spiegel des anti-apoptotischen Bcl-2 nachzuweisen sind (Huang et al. 2008).

Zudem konnte herausgestellt werden, dass die Bcl-2-Expression eine Aussagekraft im Hinblick auf die Prognose bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) hat, da eine hohe Bax/Bcl 2-Ratio sowohl mit einer höheren Rate an Komplettremissionen als auch einer längeren Überlebenszeit einhergeht (Del Poeta et al. 2003) und eine erhöhte Expression von Bcl-2 mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie korreliert (Tothova et al. 2002).

Weiterhin konnte von einer befreundeten Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 in Myc-assoziierten Lymphomzellen mit einer verringerten Sensitivität gegenüber verschiedenen Aurora Kinase Inhibitoren in Zusammenhang steht. Hierbei wurden Bcl-2-überexprimierende Zellen der Lymphomzelllinie 665 sowie Kontrollzellen mit Leervektor für 24 Stunden mit einer Konzentration von 25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 inkubiert. Anschließend wurde eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Dabei konnte man erkennen, dass die Zellen mit Leervektor im Vergleich zu den Bcl-2-überexprimierenden Zellen deutlich stärker auf den AKI reagieren und früher in Apoptose gehen. Etwa 14 % dieser Zellen befinden sich nach 24 Stunden in der subG1-Phase, bei den Bcl-2-überexprimierenden Zellen sind es dagegen nur 3,5 % ( $p=0,001$ ).

Dies deutet darauf hin, dass durch Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 durchaus eine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren erwirkt werden kann.

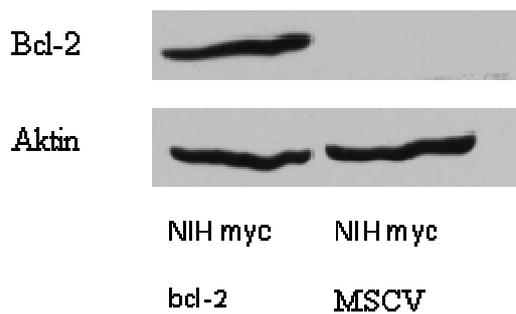
Ähnliche Ergebnisse konnten bei vergleichbaren Versuchen mit dem Aurora Kinase Inhibitor VX680 erzielt werden. Die Daten wurden freundlicherweise von Zhoulei Li zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 16: Bcl-2-überexprimierende Lymphomzellen sind weniger empfindlich gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren.** Zellen der Lymphomzelllinie 665 mit Bcl-2-Überexpression, bzw. Kontrollzellen mit GFP-Leervektor wurden für 24 Stunden mit 25nM des AKI R763/AS703569 inkubiert. In der Zellzyklusanalyse ist zu erkennen, dass die Leervektor-Zellen deutlich sensitiver auf den Inhibitor reagieren. 14% dieser Zellen befinden sich in Apoptose (subG1-Phase), dagegen nur 3,5% der Bcl-2-überexprimierenden Zellen (Student's t-test;  $p=0,001$ ). Der Western Blot nach einstündiger Inkubation mit dem AKI zeigt eine verminderte Hemmung der Expression von pHH3 – einem Substrat der Aurora Kinasen - bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen mit Leervektor [In Kollaboration mit Zhoulei Li].

Da somit davon ausgegangen wurde, dass eine Überexpression von Bcl-2 eine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln kann, sollte nun erwiesen werden, dass der Versuchsansatz des Screenings auf Resistenzen bei den mit der siRNA- bzw. cDNA library infizierten Zellen durchaus sinnvoll geplant war, indem Bcl-2-überexprimierende Zellen als Positivkontrolle verwendet wurden.

Dazu wurde zunächst ein BCL2-Konstrukt in die NIH Myc-Zellen transduziert. Die Überexpression von Bcl-2 wurde anschließend mittels Western Blot nachgewiesen.



*Abbildung 17: Bcl-2 Überexpression in NIH Myc-Zellen. Man erkennt eine deutliche Expression in den mit Bcl-2 infizierten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor MSCV. Es wurde mit Antikörpern gegen Bcl-2 gefärbt. Als Ladungskontrolle wurde Beta-Aktin verwendet.*

Nach erfolgreicher Überexpression von Bcl-2 wurden die Zellen daraufhin in gleicher Weise wie zuvor schon die Zellen mit der siRNA- bzw. cDNA library in 96-well-Platten ausplattiert und mit 25nM des Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 inkubiert. Hierbei wurden jeweils 2000 Zellen pro well ausplattiert und über mehrere Wochen mit dem AKI inkubiert, wobei das Medium wöchentlich gewechselt wurde.

Um einen Unterschied augenscheinlich zu machen, wurden auf einer Platte jeweils Zellen mit Bcl-2-Überexpression sowie Zellen, die mit der siRNA library infiziert worden waren ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich beide Zelllinien ohne Inhibitor ausplattiert.

Nach 20 Tagen konnte man schließlich einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erkennen. Während die NIH Myc-Zellen mit der siRNA library keinerlei Farbänderung des Mediums zeigten, war bei den Bcl-2-überexprimierenden Zellen ein Farbumschlag des Mediums ins Gelbliche ersichtlich, was für einen Verbrauch von Nährstoffen im Medium und damit für Viabilität und Wachstum der Zellen spricht.

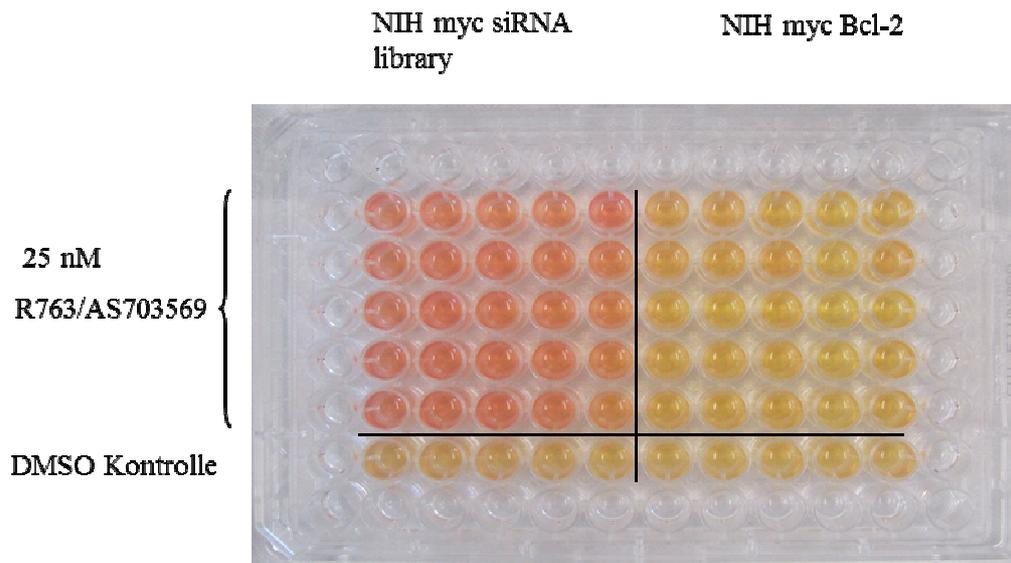


Abbildung 18: ***Bcl-2-überexprimierende NIH Myc-Zellen zeigen Wachstum trotz Zugabe des AKI.*** Jeweils 2000 Zellen wurden pro well ausplattiert und mit 25nM des Inhibitors R763/AS703569 inkubiert. Am Tag 20 nach Zugabe des Inhibitors kann man deutlich erkennen, dass sich das Medium der Bcl-2-überexprimierenden Zellen durch einen Farbumschlag ins Gelbe auszeichnet, während die Zellen, welche mit der siRNA library infiziert wurden, keine Veränderung zeigen.

Somit kann man feststellen, dass das Screening auf resistente Zellen methodisch durchaus zum Erfolg hätte führen können, wenn durch den Einbau der siRNA- bzw. der cDNA library Gene gehemmt bzw. überexprimiert worden wären, welche durch verminderte bzw. vermehrte Proteinexpression wirkungsvolle Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermittelten.

## 5 Diskussion

Im Zuge der steigenden Lebenserwartung leiden immer mehr Menschen an Krebserkrankungen. Laut dem Statistischen Bundesamt rangieren diese auf dem zweiten Platz der häufigsten Todesursachen in Deutschland, hinter den Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems

(<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>; 21.11.2014). Daher ist die wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet von größter Relevanz. Fehler in der Zellzyklusregulation sind maßgeblich an der Entstehung von Tumoren beteiligt (Hartwell, Kastan 1994). Ein großes Interesse liegt hierbei bei den Kontrollpunkten, welche ein Fortschreiten im Zellzyklus und in der Folge die Zellteilung regulieren, sowie bei den dabei beteiligten Proteinen. Aurora Kinasen nehmen Schlüsselpositionen sowohl beim G2/M-Übergang als auch während der Metaphase ein, sind beteiligt an der korrekten Positionierung der Chromosomen, der Ausbildung des Spindelapparats sowie der Zellteilung, und gewährleisten einen reibungslosen Ablauf des Zellzyklus (Fu et al. 2007b; Vader, Lens 2008). In vielen Tumorgeweben wurde eine erhöhte Expression von Aurora Kinasen nachgewiesen, was mit onkogener Transformation und genetischer Instabilität in Verbindung gebracht werden konnte (Lo Iacono et al. 2011; Bischoff et al. 1998). Wie man am Beispiel der BCR-ABL Kinase erkennen kann, die bei der chronisch myeloischen Leukämie häufig überexprimiert ist, und deren Hemmung durch Imatinib und seine Nachfolgemedikamente die Therapie der CML revolutioniert hat (Druker et al. 2001; Smith 2011), hat die Inhibition von überexprimierten Kinasen in Tumoren ein großes Potential. Dies macht auch Aurora Kinasen zur Zielscheibe der modernen Krebstherapie. Es wurden bereits eine Reihe von Aurora Kinase Inhibitoren entwickelt, welche entweder spezifisch Aurora A oder B hemmen oder unspezifisch alle Aurora Kinasen. Diese wurden sowohl präklinisch als auch klinisch untersucht und getestet. Goldberg et al beschrieben beispielsweise eine Phase II- Studie mit dem Aurora A Inhibitor MLN 8237 bei akuter myeloischer Leukämie (AML), wobei sie eine Ansprechrate von 17% sowie eine Stabilisierung der Krankheit in 49% erreichen konnten (Goldberg et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse erzielten Friedberg et al bei Patienten mit aggressiven B- und T-Zelllymphomen.

Hier wurde eine Ansprechrate von 27% sowie das Erreichen einer „stable disease“ bei 33% angeführt (Friedberg et al. 2014). Auch der Einsatz des in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Inhibitors R763/AS703569 führte in Phase I-Studien zur Krankheitsstabilisierung (Sonet A et al. 2008). Des Weiteren zeigten Aurora Kinase Inhibitoren ebenfalls eine Wirksamkeit bei therapierefraktären CML-Erkrankungen, welche aufgrund der T315I-Mutation der BCR-ABL Kinase resistent gegenüber einer Behandlung mit Imatinib sind (Modugno et al. 2007; Kelly et al. 2011). Giles et al demonstrierten zum Beispiel eine klinische Studie, bei der sich eine Ansprechrate von 44% auf den Pan-Aurora Kinase Inhibitor MK-0457 bei Patienten mit therapieresistenter CML erreichen ließ (Giles et al. 2013). Auch in Kombinationstherapie mit etablierten Medikamenten konnten Erfolge durch Aurora Kinase Inhibitoren erzielt werden. So stellte sich etwa heraus, dass AKIs in Kombination mit Docetaxel bei soliden Tumoren deutlich häufiger eine Stabilisierung der Krankheit nach sich zogen als die Monotherapie mit dem Taxan (Minton et al. 2010). Hier mag die Ursache sein, dass Aurora Kinase Inhibitoren in präklinischen Studien zu einer Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Taxanen führten (Sehdev et al. 2013; Scharer et al. 2008; Shimomura et al. 2010; Lin et al. 2012). Dies untermauert den Anspruch, dass die Inhibition von Aurora Kinasen, sowohl als Mono- wie auch als Kombinationstherapie, einen durchaus vielversprechenden Ansatzpunkt in der „targeted therapy“ darstellt.

Trotz der Erfolge von neuen Entwicklungen in der Therapie von Krebserkrankungen muss jedoch auch eingewendet werden, dass häufig primär Resistenzen der Tumorzellen gegenüber dem Präparat bestehen, beziehungsweise diese nach einigen Anwendungszyklen auftreten, was ein erhebliches Problem in der Behandlung von Tumoren darstellt (Kollareddy et al. 2012). Als Beispiel lässt sich hier wiederum die chronisch myeloische Leukämie mit *BCR-ABL*-Translokation nennen, bei der es im langfristigen Therapieverlauf mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zur Resistenzentwicklung und zum Wirksamkeitsverlust des Medikaments kommen kann (Shah et al. 2002; O'Hare et al. 2007). Desgleichen musste auch beim Her2-positiven Mammakarzinom trotz anfänglichem Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab in der Mehrheit der Patienten innerhalb eines Jahres ein Krankheitsprogress festgestellt werden (Nahta et al. 2006) und beim NSCLC kommt es ebenfalls rasch zur Resistenzentwicklung gegenüber dem EGFR-Inhibitor Gefitinib (Gandara et al. 2014). Es ist daher von großer Wichtigkeit, die auftretende Resistenzentwicklung genauer zu charakterisieren und ihren Ursprung näher zu bestimmen. Dabei kann es sich zum einen um Mutationen in der Zielstruktur des Medikaments selbst handeln, wie beispielsweise

der Kinase-Domäne, sodass der eingesetzte Inhibitor nicht mehr binden kann und keine Wirkung mehr zeigt (Gorre et al. 2001; Failes et al. 2012). Andererseits kann die Resistenz durch Dysregulation weiterer Gene vermittelt werden, welche der Tumorzelle alternative Überlebenswege bereitstellen, zum Beispiel durch aktive Ausschleusung des Inhibitors aus der Zelle (Guo et al. 2009; Pallis, Russell 2004; van der Holt et al. 2005). Derartige Gene können als Biomarker dienen, um ein Ansprechen auf die Therapie besser vorherzusagen zu können, und damit die Therapie individueller und vor allem effektiver zu gestalten, wie etwa durch die Kombination mehrerer unterschiedlicher Wirkstoffe, sowie um unerwünschte Wirkungen zu minimieren (Kollareddy et al. 2012; Jain et al. 2009; Sahin et al. 2014; Zhang et al. 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf Grundlage der oben genannten Erkenntnisse, solche Gene zu ermitteln, welche, sei es durch vermehrte oder verminderte Expression, Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren in Myc-induzierten Lymphomen hervorrufen können.

## 5.1 Aurora Kinase Inhibition führt zu Polyploidie und Zelluntergang bei Myc-Lymphomzellen

Wie den Hollander et al beschrieben haben, werden die Aurora Kinasen A und B in Myc-induzierten Lymphomen vermehrt exprimiert, wobei die Transkription von *AURKA* direkt und von *AURKB* indirekt durch c-Myc reguliert wird (den Hollander et al. 2010). Eine Hemmung der Aurora Kinasen kann daher selektiv zum Untergang von Myc-überexprimierenden Zellen führen. Diese synthetische Letalität schreiben Yang et al vor allem einer Inhibition von Aurora Kinase B zu (Yang et al. 2010). Es ist bekannt, dass der Einsatz von AKI bei Tumorzellen Defekte in Mitose und Zytokinese nach sich zieht (Vader et al. 2008; Harrington et al. 2004). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Inkubation der Myc-Lymphomzellen mit verschiedenen Konzentrationen des Pan-Aurora Kinase Inhibitors R763/AS703569 zeigte bereits ab einer Konzentration von 25nM eine deutlich eingeschränkte Viabilität der Zellen. Neben einem Eintreten in die subG0-Phase, was dem Zelltod gleichzusetzen ist, konnte in der Zellzyklusanalyse eine vermehrte Polyploidie der Zellen nachgewiesen werden. Sie enthielten oftmals einen tetra (4N)- oder oktoploiden (8N) Chromosomensatz. Die Aurora Kinasen spielen eine bedeutende Rolle in der

Zellzyklusregulation und der Zellteilung. Aurora A ist vor allem bei der Reifung des Zentrosoms sowie der Ausbildung des Spindelapparates beteiligt (Terada et al. 2003; Kinoshita et al. 2005; Tsai, Zheng 2005; Barr, Gergely 2007), und ihre Inhibition führt zur Checkpoint-Aktivierung und zum mitotischen Arrest, was schließlich die Apoptose der Zelle zur Folge haben kann (Hilton, Shapiro 2014; Hirota et al. 2003). Aurora Kinase B ist dagegen unter anderem für die Trennung der Chromatiden und die Zellteilung zuständig (Pinsky et al. 2006; Goto et al. 2003; Ruchaud et al. 2007). Ihre Hemmung führt folglich zum Verlust der korrekten Anlagerung der Zwei-Chromatid-Chromosomen und deren Teilung, wie auch zum Versagen der Zellteilung. Des Weiteren können die Zellen den mitotischen Checkpoint umgehen, da die nötige Aktivierung von zuständigen Proteinen durch Hemmung von Aurora B ausbleibt, wodurch die Progression im Zellzyklus erhalten bleibt und DNA-Replikation weiterhin stattfinden kann, was in Endoreduplikation und Polyploidie resultiert (Hilton, Shapiro 2014; Keen, Taylor 2009; Hauf et al. 2003; Ditchfield et al. 2003).

Eine vieldiskutierte Frage ist, ob Aurora Kinase A oder B die größere Rolle bei der Tumorentstehung spielt und damit, welche der Kinasen das höhere Potential für ein Ansprechen der Therapie mit einem spezifischen Inhibitor zeigt (Giet et al. 2005; Hilton, Shapiro 2014; Girdler et al. 2006). Zunächst wurde der Aurora Kinase A aufgrund ihrer Rolle in der Tumorigenese eine größere Bedeutung zugeschrieben. Jedoch konnten bei spezifischer Hemmung von Aurora B vergleichbare Effekte erzielt werden wie bei gleichzeitiger Inhibierung beider Kinasen, was das Augenmerk mehr auf Aurora B lenkte (Green et al. 2011; Mountzios et al. 2008). In präklinischen und klinischen Studien konnten spezifische Hemmstoffe beider Kinasen Erfolge erringen. Der Aurora A Inhibitor MLN 8237 zeigte sich zum Beispiel bei Multiplem Myelom, AML und verschiedenen gynäkologischen Tumoren wirksam (Infante et al. 2008; Görgün et al. 2010; Goldberg et al. 2014; Matulonis et al. 2012; Cervantes et al. 2012). Für den Aurora B-spezifischen Inhibitor AZD1152 konnte eine Effizienz bei verschiedenen soliden Tumoren wie Mamma-, Kolon- und Lungenkarzinom sowie auch bei der AML festgestellt werden (Löwenberg et al. 2011; Gully et al. 2010; Wilkinson et al. 2007). Es scheint daher essentiell, für verschiedene Tumortypen vorzugsweise den jeweils am besten wirksamen Inhibitor zu ermitteln und einzusetzen, um das Auftreten unerwünschter Wirkungen zu reduzieren und dem Patienten die für ihn möglichst optimale Therapie zukommen zu lassen. Obwohl die Expression sowohl von Aurora A als auch von Aurora B durch c-Myc hochreguliert wird, scheint im Myc-induziertem Lymphom Aurora Kinase B die wichtigere Rolle zu spielen (den Hollander et al.

2010; Yang et al. 2010; Hook et al. 2012). Dies konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es wurden dazu Mutationen von *AURKA* beziehungsweise *AURKB* in den Lymphomzellen überexprimiert, welche durch Punktmutationen in der Bindestelle des Inhibitors dessen Wirkung herabsetzen sollten. Die Funktion der mutierten Kinasen wurde auf Proteinebene durch den vermehrten Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 sichergestellt, bei welchem es sich um ein bekanntes Substrat der Aurora Kinasen handelt (Hirota et al. 2005). Nachfolgend konnte bei der *AURKB*-Mutante ein deutlich reduzierter Effekt des AKI R763/AS703569 beobachtet werden; die Zellen zeigten ein annähernd normales Verhalten im Zellzyklus. Dagegen wurde bei den *AURKA*-Mutanten kein derartiger Einfluss wahrgenommen. Sie reagierten auf den AKI mit Polyploidie und Zelltod in vergleichbarer Weise wie die Wildtypzellen. Diese Ergebnisse bestärken somit die Annahmen in der Literatur, dass Aurora Kinase B in Myc-induzierten Lymphomen das vordergründige Ziel für die Inhibition darstellt. Eine Überexpression des Onkogens *c-MYC* könnte daher ein Biomarker für ein vermehrtes Ansprechen auf spezifische Aurora Kinase B Inhibitoren sein.

## 5.2 Methodische Aspekte bezüglich des Screenings auf Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Resistenzen zu ermitteln, welche die Wirksamkeit von Aurora Kinase Inhibitoren herabsetzen, um diese dann gegebenenfalls als Marker zu verwenden und ein etwaiges Ansprechen auf eine Therapie mit Aurora Kinase Inhibitoren besser einschätzen zu können. Mehrere Möglichkeiten der Resistenzentstehung sind vorstellbar: Einerseits kann es durch Mutationen in den Zielstrukturen selbst, also in diesem Fall den Aurora Kinasen, zum Verlust der Bindefähigkeit des Inhibitors kommen (Gorre et al. 2001). Andererseits können Veränderungen in anderen Genen, beispielsweise durch Überexpression, zu einer Überwindung der Inhibitorwirkung führen (Guo et al. 2009; van der Holt et al. 2005). Hier könnte man etwa an anti-apoptotische Proteine oder Transportproteine denken, welche den Inhibitor aus der Zelle ausschleusen können. Diese Arbeit befasste sich mit dem zweiten genannten Mechanismus der Resistenzentwicklung. Dabei war der Ansatzpunkt, dass in die Zellen mittels Knockdowns oder Überexpressionen bestimmter Gene eine Resistenz gegenüber dem AKI hervorgerufen würde. Hierzu wurde zum einen eine siRNA library, bestehend aus 150 000 siRNA-Sequenzen, in die Zellen transduziert, wobei

für die meisten Zielgene vier verschiedene Sequenzen vorhanden waren. Zum anderen wurde auch eine cDNA library transduziert, welche eine Überexpression der Zielgene auslösen sollte. Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen mit dem Aurora Kinase Inhibitor kultiviert, wobei die Zielvorstellung ein vermehrtes Wachstum derjenigen Zellen war, welche durch vermehrte oder verminderte Expression bestimmter Proteine eine Resistenz entwickeln und daraufhin dem Inhibitor trotzen konnten. Bedauerlicherweise konnte jedoch trotz mehrmaligem Ansetzen des Versuchs mit entsprechend hohen Zellzahlen keinerlei Wachstum der Zellen und somit kein Hinweis auf eine ausgebildete Resistenz gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitor beobachtet werden. Man sollte daher zunächst kritisch die verwendeten Methoden beurteilen, um etwaige Irrtümer im Versuchsaufbau zu identifizieren und somit eventuell eine Erklärung für das Versagen des durchgeführten Experiments zu finden.

Ursprünglich sollten Myc-Lymphomzellen mit den beiden libraries infiziert werden. Dies stellte sich jedoch nach zahlreichen Versuchen als unmöglich heraus, was dadurch bedingt sein mochte, dass eine Infektion von Lymphomzellen generell schwierig ist und auch vom Hersteller der siRNA library deutliche Unterschiede in der Transduktionseffizienz für verschiedene Zelllinien eingeräumt wurden. Als Ausweichlösung wurden dann NIH 3T3-Zellen infiziert, eine murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie. Hier konnte nun eine erfolgreiche Infektion erreicht werden. Dennoch kann das Verwenden einer anderen Zelllinie unter Umständen dazu beigetragen haben, dass sich schlussendlich keine verwertbare Resistenz zeigte. Durch das zusätzliche Einbringen von *c-MYC* in die NIH 3T3-Zellen wurde jedoch versucht, gleiche Bedingungen wie in den Lymphomzellen zu schaffen. Zudem war die Erwartungshaltung, dass eine Resistenz durch Knockdown oder Überexpression eines bestimmten Genes vermittelt würde und dabei wäre der eingesetzte Zelltyp von untergeordneter Bedeutung.

Des Weiteren wurde zwar bei den mit der siRNA library infizierten Zellen eine Titerkontrolle zur Messung der Transduktionseffizienz durchgeführt, die erfolgreich infizierten Zellen konnten jedoch nicht selektiert werden, sodass bei der erreichten Effizienz von 64% immerhin 36 % der verwendeten Zellen keinerlei Knockdown erfahren hatten. Dies wurde jedoch durch eine entsprechend höhere Anzahl von Zellen, die mit dem Inhibitor kultiviert wurden, ausgeglichen, sodass eine auftretende Resistenz in jedem Fall zu beobachten hätte sein müssen.

Bei der Infektion der Zellen mit der cDNA library gab es keine Möglichkeit, die Transduktionseffizienz valide zu messen, da die library keinerlei Reportergen enthielt. Es wurde daher zusätzlich der Vektor MSCV thCD2 in 1% der Konzentration der cDNA library mittransduziert, um mittels durchflusszytometrischer Messung CD2 zu beurteilen und damit auf die Transduktionseffizienz der library schließen zu können. Obwohl sieben Prozent der Zellen CD2-positiv waren und man daher von einer sehr guten Effizienz ausging, kann man letztendlich natürlich nicht mit endgültiger Sicherheit behaupten, dass die Zellen auch wirksam mit der cDNA library infiziert wurden.

Eine weitere Problematik, die es anzusprechen gilt, ist die Frage, wie viele Zellen schließlich für das Screening auf 96-well-Platten mit dem Aurora Kinase Inhibitor pro well ausplattiert werden sollten. Als Indikator einer Resistenzentwicklung wurde ein Farbumschlag des Zellmediums angesehen, das auf einen Verbrauch der enthaltenen Nährstoffe hinweist. Hierbei musste man demnach beachten, dass nicht zu viele Zellen in einem well kultiviert wurden, die dann allein durch ihre Zahl schon viele Nährstoffe benötigen und ohne eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor zur raschen Verfärbung des Mediums führen können. Die Anzahl der ausplattierten Zellen pro well sollte daher sehr gering gehalten werden, sodass ein Farbumschlag nur bei wirklich durch eine Resistenz bedingtem gesteigertem Zellwachstum auftrat. Es wurden daher mehrere Versuche durchgeführt, wobei jeweils zwischen 100 und 2000 Zellen pro well ausplattiert wurden. Um eventuell entstehenden resistenten Zellkolonien optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde auch das Medium regelmäßig gewechselt. Dennoch konnte über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Wochen keine Farbänderung des Mediums festgestellt werden.

Womöglich ist jedoch der verwendete Indikator für eine Resistenzentwicklung gegenüber R763/AS703569, der Farbumschlag des Mediums, ungenau und nicht geeignet, um die Ausbildung einer Resistenz zu beurteilen. Bei der relativ geringen Zellzahl, die pro well ausplattiert wurde, dauert es möglicherweise zu lange, bis ein Großteil der Nährstoffe im Medium aufgebraucht ist und sich die Farbe ändert, zumal man ja davon ausgeht, dass der überwiegende Teil der Zellen am Einfluss des Aurora Kinase Inhibitors zugrunde geht. Die Zellen wurden jedoch auch mikroskopisch regelmäßig beurteilt, und auch hier konnte sich kein schnell wachsender Zellklon herauskristallisieren, der ein Fingerzeig auf eine Resistenzentwicklung gewesen wäre. Darüber hinaus wurde nachfolgend, um die Methode als durchaus funktional zu bestätigen, das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in den Zellen

überexprimiert, von welchem bekannt ist, dass es Resistenzen gegenüber Zytostatika vermitteln kann (Kassim et al. 1999; Real et al. 2002; Cluzeau et al. 2012). Hierbei konnte bei den Bcl-2 überexprimierenden Zellen nach 20 Tagen ein deutlich sichtbarer Farbumschlag des Mediums zur Kenntnis genommen werden und ein besseres Wachstum der Bcl-2 positiven Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit der siRNA library infiziert wurden, beobachtet werden. Angesichts dieser Tatsache kann man abschließend feststellen, dass die verwendete Methode durchaus zu einem Ergebnis hätte führen können, wenn durch die transduzierten Knockdowns beziehungsweise Überexpressionen eine wirksame Resistenz in den Zellen zustande gekommen wäre.

### 5.3 Überexpression von Bcl-2 geht mit verminderter Sensitivität gegenüber AKI einher

Beim Screening der NIH 3T3 Myc-Zellen auf Resistenzentwicklung gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren mittels Transduktion einer siRNA- und einer cDNA library konnten bedauerlicherweise keine Resistenzen ermittelt werden. Um die verwendete Methode als valide zu belegen, wurde daher das anti-apoptotische Protein Bcl-2 überexprimiert, woraufhin die Zellen ein deutlich gesteigertes Wachstum im Vergleich zu den Wildtypzellen und auch zu den mit den libraries infizierten Zellen zeigten. Bcl-2 spielt eine zentrale Rolle in der Apoptose und ist ein anti-apoptotischer Vertreter der gleichnamigen Proteinfamilie (Cory, Adams 2002). In einer Reihe von Krebserkrankungen konnten Veränderungen der Expression von Proteinen dieser Familie nachgewiesen werden. Beispielsweise ist eine vermehrte Expression von Bcl-2 durch Translokation oder Amplifikation in Non-Hodgkin-Lymphomen zu beobachten (Tsujimoto et al. 1985; Monni et al. 1997). Überdies kann Bcl-2 den durch zytotoxische Substanzen induzierten Zelltod unterdrücken und seine Überexpression dadurch mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einhergehen (Yip, Reed 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Aurora-Kinase A eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 bewirkt, was bei einer Aurka-Überexpression in einer Hemmung der Apoptose resultiert (Wang et al. 2006). Die Behandlung mit dem Aurora Kinase Inhibitor VX680 führt zu einer Anhebung der Bax/Bcl 2-Ratio, wobei die Expression von Bcl-2 gehemmt wird und so das Gleichgewicht auf der pro-apoptotischen Seite liegt (Huang et al. 2008).

Weiterhin war von einer befreundeten Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen worden, dass die Überexpression von Bcl-2 in Myc-Lymphomzellen deren Sensitivität gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren verringert. Diese Grundlagen führten zu der Annahme, dass eine Überexpression von Bcl-2 mit einer vermehrten anti-apoptischen Aktivität und einer messbaren Resistenz gegenüber dem AKI einhergeht, was anhand der durchgeführten Versuche bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu Wildtypzellen zeigten diejenigen Zellen, in welchen Bcl-2 überexprimiert wurde, ein Wachstum in Gegenwart des AKI und durch den daher vermehrten Verbrauch von Nährstoffen und einer Farbänderung des Mediums konnte dies auch makroskopisch beobachtet werden. Hierdurch konnte aufgezeigt werden, dass die verwendete Screening-Methode durchaus sinnvoll war.

#### 5.4 Beurteilung von Genen, welche Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln können

Die Herangehensweise der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente führte schlussendlich nicht zum Ziel. Es konnten keine relevanten Gene, die für eine Resistenzentwicklung gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren verantwortlich wären, ermittelt werden. Dagegen gelang es mehreren anderen Forschungsgruppen, durch unterschiedliche Methoden derartige Gene zu identifizieren. Guo et al gelang es, gegenüber dem Aurora Kinase B selektiven Inhibitor AZD1152 resistente Kolon- und Pankreaszellen zu generieren, indem sie die Zellen in Anwesenheit von 1µM des Inhibitors für drei Monate kultivierten. Die überlebenden Zellen (weniger als 0,01%) wurden selektiert und mittels genomweiter Microarray-Analyse untersucht. Hierbei konnte eine Überexpression der Gene *ABCB1*, welches für MDR1 kodiert, sowie von *ABCG2*, welches für BCRP kodiert, festgestellt werden. Diese Proteine sind beide Mitglieder der ABC-Transporter Familie, welche über eine ATP-bindende Kasette als gemeinsames Strukturelement verfügen und Substrate aktiv über die Zellmembran transportieren können, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, Resistenzen gegenüber verschiedenen Medikamenten zu vermitteln (Jones, George 2004; Vlaming et al. 2009; Ling 1997; Rees et al. 2009). Die Überexpression dieser Proteine reicht alleinig aus, um eine Resistenz gegenüber AZD1152 aufrecht zu erhalten und zeigt ebenfalls eine Kreuzresistenz gegenüber dem Pan-Aurora Kinase Inhibitor VX680 (Guo et al. 2009).

Auch in AML-Zelllinien konnte bei Überexpression von MDR1 und BCRP eine verminderte Sensitivität gegenüber AZD1152 nachgewiesen werden (Grundy et al. 2011).

Ähnliche Ergebnisse konnten Seamon et al erzielen. Diese Arbeitsgruppe kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass BCRP für die Resistenzentwicklung gegenüber dem Inhibitor JNJ-7706621, welcher Aurora Kinasen sowie Cyklin-abhängige Kinasen hemmt, verantwortlich ist. Hier wurden die Zellen für 12 Monate mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors kultiviert und anschließend resistente Zellen selektiert, bei denen eine Überexpression von ABCG2 festgestellt wurde (Seamon et al. 2006).

Demgegenüber konnten Girdler et al mehrere Punktmutationen in *AURKB* ermitteln, welche zur Resistenzbildung gegenüber dem selektiven Aurora B Inhibitor ZM447439 führten. Hier wurden Tumorzellen kontinuierlich für drei Wochen mit einer zytotoxischen Dosis des AKI kultiviert. Daraufhin konnten mehrere resistente Kolonien gewonnen werden. Da jedoch die Aktivität der Aurora Kinase B in diesen Zellen noch erhalten war, fiel der Verdacht auf Veränderungen innerhalb des *AURKB*-Gens. Bei der nachfolgenden Sequenzierung konnten fünf Punktmutationen identifiziert werden, welche sich in der Kinase-Domäne von Aurkb befinden und somit eine effektive Bindung des Inhibitors verhindern. Für diese Zelllinien wurden auch Kreuzresistenzen gegenüber anderen Aurora B Inhibitoren wie VX-680 und Hesperadin beschrieben (Girdler et al. 2008).

Es lässt sich somit feststellen, dass Resistenzen gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren sowohl durch Punktmutationen in den Zielstrukturen entstehen können, als auch durch vermehrte Expression beispielsweise von Genen der ABC-Transporterfamilie, was zum aktiven Transport des Medikaments aus der Tumorzelle führt. Methodisch war den oben genannten Arbeitsgruppen gemein, dass die Zellen für einen längeren Zeitraum im Beisein eines Aurora Kinase Inhibitors kultiviert wurden und sich daraufhin resistente Kolonien bildeten, welche genauer untersucht wurden. Es scheint somit, dass diese Methode eher zielführend ist, als die im Vorhinein durchgeführte Überexpression oder RNA-Interferenz mittels cDNA- und siRNA libraries, welche die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete.

## 5.5 Biomarker für Ansprechen auf Aurora Kinase Inhibitoren als wichtige Elemente in der Therapie von Krebserkrankungen

Aurora Kinasen sind aufgrund ihrer Funktionen während Mitose und Zellteilung wichtige Schlüsselenzyme des Zellzyklus (Fu et al. 2007b). In vielen Tumorgeweben konnte ihre Überexpression nachgewiesen werden, was sie zu einem vielversprechenden Ziel der modernen Krebstherapie macht (Green et al. 2011). Zahlreiche niedermolekulare Hemmstoffe konnten bereits entwickelt werden, welche Aurora Kinasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibieren und auch in klinischen Studien bereits Erfolge verbuchen konnten (Goldberg et al. 2014; Friedberg et al. 2014). Ein maßgebliches Problem der sogenannten „targeted therapy“ ist die Entwicklung von Resistenzen gegenüber dem Therapeutikum, die sowohl primär als auch im Laufe der Behandlung auftreten kann. Es ist daher von großer Wichtigkeit, derartige Resistenzentwicklungen zu identifizieren und zu charakterisieren, was der Ansatz der vorliegenden Arbeit war. Auch wenn dies hier letztendlich nicht zum Erfolg führte, ist das Bestreben, Gene zu finden, welche durch vermehrte oder verminderte Expression Resistenzen gegenüber AKI vermitteln können, durchaus gerechtfertigt. Es wäre schließlich möglich, durch die gezielte Untersuchung solcher Biomarker dem Patienten eine individuelle Therapie zukommen zu lassen, welche effektiv und wirksam ist und gleichzeitig die auftretenden Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Dies kann nur erreicht werden, wenn man die Wirksamkeit der Chemotherapeutika bereits vor der Verabreichung einschätzen kann (Kollareddy et al. 2012). Anderen Forschungsgruppen gelang es bereits, derartige Gene zu identifizieren, welche die Sensitivität dem AKI gegenüber deutlich herabsetzen (Guo et al. 2009; Seamon et al. 2006). Dies eröffnet schließlich auch neue Möglichkeiten für Kombinationstherapien, welche präzise auf den Tumor zugeschnitten sind. Ein weiterer Ansatzpunkt der Forschung kann die Entwicklung von Aurora Kinase Inhibitoren sein, welche neue Bindungsarten besitzen und somit durch internale Punktmutationen in den *AURK*-Genen ausgelöste Resistenzen überwinden können (Girdler et al. 2008).

Es gibt daher in diesem Bereich noch ein großes Potential für Nachforschungen und Untersuchungen, um schließlich dem Patienten nicht nur die bestmögliche Therapie, sondern auch eine größtmögliche Lebensqualität während der Behandlung bieten zu können.

## 6 Zusammenfassung

Fehler und Dysfunktionen im äußerst komplexen Prozess der Mitose können den Ausgangspunkt für genomische Instabilität und damit für die Tumorigenese darstellen (Lengauer et al. 1998). In den letzten Jahren konnten Aurora Kinasen als wichtige Bausteine im Bereich der Zellzyklusregulation herausgestellt werden und ihre Überexpression wurde in einer Reihe von Tumoren beschrieben (Gautschi et al. 2008). Dies macht die Inhibition von Aurora Kinasen zu einem vielversprechenden Ziel in der Therapie maligner Erkrankungen.

Es wurde gezeigt, dass Aurora Kinasen in Myc-induzierten Lymphomen überexprimiert sind und deren Hemmung hier zum Untergang der Tumorzellen führt, was die Grundlage dieser Arbeit bildet (den Hollander et al. 2010). In mehreren klinischen Studien musste jedoch festgestellt werden, dass die Tumorzellen im Therapieverlauf Resistenzen gegen die verwendeten Aurora Kinase Inhibitoren aufwiesen (Kollareddy et al. 2012). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es demnach, Gene zu ermitteln, welche für eine solche Resistenzbildung verantwortlich sein könnten.

Zunächst wurde die geeignete Konzentration des Aurora Kinase Inhibitors ermittelt, bei der die für die Versuche verwendeten Lymphomzellen zuverlässig abgetötet wurden und somit die Entwicklung von Resistenzen sowohl in der Zellkultur als auch in MTT-Assay und FACS sicher beurteilt werden konnte. Hierbei wurden zwei verschiedene AKI getestet. Für den Pan-Aurora Kinase Inhibitor R763/AS703569 konnte 25nM als zutreffende Konzentration eruiert werden. Der Aurora A Inhibitor MLN 8237 wurde ebenfalls getestet, hier war jedoch eine deutlich höhere Konzentration von 200nM notwendig, um einen sicheren Zelltod zu gewährleisten, was Aurora Kinase B als das vordergründige Ziel in Myc-induzierten Lymphomen bestätigte. Die nachfolgenden Versuche wurden daher mit R763/AS703569 durchgeführt. Des Weiteren wurden Punktmutationen von Aurora A und B in die Zellen eingebracht, welche die Struktur der Kinasen dementsprechend veränderten, dass der Inhibitor nicht mehr binden konnte. Nachdem diese Zellen mit 25nM des Inhibitors inkubiert wurden, ließ sich bei den *AURKB*-Mutanten eine deutliche Resistenz gegenüber dem AKI feststellen. Diese Zellen zeigten in der Zellzyklusanalyse mittels PI-FACS ein annähernd normales Bild.

Für die *AURKA*-Mutanten ließ sich jedoch keine derartige Resistenz feststellen, was wiederum für den niedrigeren Stellenwert von Aurora A im Myc-induzierten Lymphom spricht. Dennoch konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass eine etwaige Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren sowohl in der Zellkultur als auch in der Zellzyklusanalyse deutlich sichtbar sein sollte. Nachfolgend wurde versucht, eine siRNA library sowie eine cDNA library in die Lymphomzellen zu transduzieren. Dies war jedoch nicht erfolgreich, sodass stattdessen NIH3T3-Zellen, welche Myc überexprimieren, infiziert wurden. Hier gelang eine erfolgreiche Infektion, es konnte jedoch im Verlauf keine Resistenzentwicklung gegenüber dem AKI beobachtet werden. Um die verwendete Methodik zu validieren, wurde schlussendlich das anti-apoptische Protein Bcl-2 in den Zellen überexprimiert, von dem bekannt ist, dass es eine Resistenz gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren vermitteln kann. Dabei zeigte sich nachfolgend auch in der Zellkultur unter Inkubation mit dem Inhibitor R763/AS703569 ein im Vergleich zu den Leervektor-Zellen deutlich weniger gehemmt Zellwachstum, sodass von einer Resistenzentwicklung ausgegangen werden konnte. Somit hätte die verwendete Methodik durchaus zum Ziel führen können, wenn durch die Infektion mit den beiden libraries Gene vermehrt oder vermindert exprimiert worden wären, die eine Überwindung der Inhibitorwirkung erreichen und durch verminderte Wachstumshemmung eine Resistenz vermitteln hätten können.

Nichtsdestotrotz ist die Untersuchung von Resistenzmechanismen gegen Medikamente, welche zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden, von großer Bedeutung. Durch die Charakterisierung von Biomarkern für das Ansprechen auf bestimmte Therapien kann man dem Patienten eine wirksame Behandlung zukommen lassen und ihm nutzlose und nebenwirkungsreiche Therapien ersparen und dadurch seine Versorgung verbessern wie auch seine Lebensqualität erhöhen.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Alisertib (MLN8237) | Aurora Kinase inhibitor | Read Reviews & Product Citations. Online verfügbar unter <http://www.selleckchem.com/products/MLN8237.html>, zuletzt geprüft am 15.11.2014.
- Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis). Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>, zuletzt geprüft am 15.11.2014.
- Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM: Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (6) 1983. S. 1707-1711.
- Amati B: Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat Cell Biol* 3 (5) 2001. S. 112-3.
- Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J: Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3 1998. S. 250-68.
- Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H: The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J* 12 (13) 1993. S. 5083-5087.
- Arellano M, Moreno S: Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (4) 1997. S. 559-573.
- Barr AR, Gergely F: Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 120 (Pt 17) 2007. S. 2987-2996.
- Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL: c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 16 (19) 2002. S. 2530-2543.
- Berdnik D, Knoblich JA: Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 12 (8) 2002. S. 640-647.

- Berns K, Hijmans EM, Bernards R: Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene* 15 (11) 1997. S. 1347-1356.
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD: A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO journal* 17 (11) 1998. S. 3052-3065.
- Blackwood EM, Eisenman RN: Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251 (4998) 1991. S. 1211-1217.
- Bolanos-Garcia VM: Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (8) 2005. S. 1572-1577.
- Boss DS, Beijnen JH, Schellens, Jan H M: Clinical experience with aurora kinase inhibitors: a review. *The oncologist* 14 (8) 2009. S. 780-793.
- Boxer LM, Dang CV: Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20 (40) 2001. S. 5595-5610.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224 (4653) 1984. S. 1121-1124.
- Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK: Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 12 (23) 2006. S. 6869-6875.
- Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B: CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 4 (9) 2005. S. 1233-1238.
- Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrisnan K, Roselló S, Andreu J, Jung J, Sanchis-Garcia JM, Piera A, Blasco I, Maños L, Pérez-Fidalgo J, Fingert H, Baselga J, Tabernero J: Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (17) 2012. S. 4764-4774.
- Cluzeau T, Robert G, Mounier N, Karsenti JM, Dufies M, Puissant A, Jacquel A, Renneville A, Preudhomme C, Cassuto J, Raynaud S, Luciano F, Auberger P: BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients. *Oncotarget* 3 (4) 2012. S. 490-501.
- Collins S, Groudine M: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 298 (5875) 1982. S. 679-681.

- Connell-Crowley L, Solomon MJ, Wei N, Harper JW: Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Molecular Biology of the Cell* 4 (1) 1993. S. 79-92.
- Cooper, Geoffrey M. 2000: *The cell. A molecular approach*. 2nd ed. Washington, D.C., Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates.
- Cooper S: On the proposal of a G0 phase and the restriction point. *FASEB J* 12 (3) 1998. S. 367-373.
- Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* 2 (9) 2002. S. 647-656.
- Croce CM: Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine* 358 (5) 2008. S. 502-511.
- Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P: Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 22 (3) 2002. S. 874-885.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM: Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (24) 1982a. S. 7824-7827.
- Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC: Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299 (5878) 1982b. S. 61-63.
- Dang CV: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19 (1) 1999. S. 1-11.
- Dang CV: MYC on the path to cancer. *Cell* 149 (1) 2012. S. 22-35.
- Danielsson F, Skogs M, Huss M, Rexhepaj E, O'Hurley G, Klevebring D, Pontén F, Gad, Annica K B, Uhlén M, Lundberg E: Majority of differentially expressed genes are down-regulated during malignant transformation in a four-stage model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (17) 2013. S. 6853-6858.
- Dees EC, Cohen RB, Mehren M von, Stinchcombe TE, Liu H, Venkatakrishnan K, Manfredi M, Fingert H, Burris HA, Infante JR: Phase I study of aurora A kinase inhibitor MLN8237 in advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and bioavailability of two oral formulations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (17) 2012. S. 4775-4784.

- Del Poeta G, Venditti A, Del Principe, Maria Ilaria, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Franchi A, Bruno A, Mazzone C, Panetta P, Suppo G, Masi M, Amadori S: Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101 (6) 2003. S. 2125-2131.
- den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, Kremer M, Graf N, Scheerer M, Hall MA, Goga A, Bubnoff N von, Duyster J, Peschel C, Cleveland JL, Nilsson JA, Keller U: Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood* 116 (9) 2010. S. 1498-1505.
- Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A: Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38 (9) 2006. S. 1060-1065.
- Ding J, Swain JE, Smith GD: Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* 78 (2) 2011. S. 80-90.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS: Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology* 161 (2) 2003. S. 267-280.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344 (14) 2001. S. 1031-1037.
- Ducat D, Zheng Y: Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 301 (1) 2004. S. 60-67.
- Eilers M: Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells* 9 (1) 1999. S. 1-6.
- Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411 (6835) 2001. S. 342-348.
- Ewart-Toland A, Briassouli P, de Koning, John P, Mao J, Yuan J, Chan F, MacCarthy-Morrogh L, Ponder, Bruce A J, Nagase H, Burn J, Ball S, Almeida M, Linardopoulos S, Balmain A: Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* 34 (4) 2003. S. 403-412.
- Ezhevsky SA, Ho A, Becker-Hapak M, Davis PK, Dowdy SF: Differential Regulation of Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein by G1 Cyclin-Dependent Kinase Complexes In Vivo. *Mol Cell Biol* 21 (14) 2001. S. 4773-4784.

- Failes TW, Mitic G, Abdel-Halim H, Po'uha ST, Liu M, Hibbs DE, Kavallaris M: Evolution of resistance to Aurora kinase B inhibitors in leukaemia cells. *PloS one* 7 (2) 2012. S. 30734.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21) 1987. S. 7413-7417.
- Foley EA, Kapoor TM: Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (1) 2013. S. 25-37.
- Friedberg JW, Mahadevan D, Cebula E, Persky D, Lossos I, Agarwal AB, Jung J, Burack R, Zhou X, Leonard EJ, Fingert H, Danaee H, Bernstein SH: Phase II study of alisertib, a selective Aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B- and T-cell non-Hodgkin lymphomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (1) 2014. S. 44-50.
- Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 5 (1) 2007a. S. 1-10.
- Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR* 5 (1) 2007b. S. 1-10.
- Gandara DR, Li T, Lara PN, Kelly K, Riess JW, Redman MW, Mack PC: Acquired resistance to targeted therapies against oncogene-driven non-small-cell lung cancer: approach to subtyping progressive disease and clinical implications. *Clinical lung cancer* 15 (1) 2014. S. 1-6.
- Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Gandara DR: Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (6) 2008. S. 1639-1648.
- Giet R, Glover DM: *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) 2001. S. 669-682.
- Giet R, Petretti C, Prigent C: Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends in cell biology* 15 (5) 2005. S. 241-250.
- Giles FJ, Swords RT, Nagler A, Hochhaus A, Ottmann OG, Rizzieri DA, Talpaz M, Clark J, Watson P, Xiao A, Zhao B, Bergstrom D, Le Coutre, P D, Freedman SJ, Cortes JE: MK-0457, an Aurora kinase and BCR-ABL inhibitor, is active in patients with BCR-ABL T315I leukemia. *Leukemia* 27 (1) 2013. S. 113-117.

- Girdler F, Gascoigne KE, Eyers PA, Hartmuth S, Crafter C, Foote KM, Keen NJ, Taylor SS: Validating Aurora B as an anti-cancer drug target. *Journal of cell science* 119 (Pt 17) 2006. S. 3664-3675.
- Girdler F, Sessa F, Patercoli S, Villa F, Musacchio A, Taylor S: Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chemistry & biology* 15 (6) 2008. S. 552-562.
- Goldberg SL, Fenaux P, Craig MD, Gyan E, Lister J, Kassis J, Pigneux A, Schiller GJ, Jung J, Jane Leonard E, Fingert H, Westervelt P: An exploratory phase 2 study of investigational Aurora A kinase inhibitor alisertib (MLN8237) in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res Rep* 3 (2) 2014. S. 58-61.
- Görgün G, Calabrese E, Hideshima T, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, Ikeda H, Bianchi G, Hu Y, Cirstea D, Santo L, Tai Y, Nahar S, Zheng M, Bandi M, Carrasco RD, Raje N, Munshi N, Richardson P, Anderson KC: A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* 115 (25) 2010. S. 5202-5213.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5531) 2001. S. 876-880.
- Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M: Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* 278 (10) 2003. S. 8526-8530.
- Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M: Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7 (1) 2002. S. 11-17.
- Green MR, Woolery JE, Mahadevan D: Update on Aurora Kinase Targeted Therapeutics in Oncology. *Expert Opin Drug Discov* 6 (3) 2011. S. 291-307.
- Grundy M, Seedhouse C, Russell NH, Pallis M: P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the aurora-B kinase inhibitor barasertib-hQPA. *BMC cancer* 11 2011. S. 254.
- Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeung JA, Velazquez-Torres G, Wang E, Yeung SJ, Lee M: Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer. *Mol Cancer* 9 2010. S. 42.
- Guo J, Anderson MG, Tapang P, Palma JP, Rodriguez LE, Niquette A, Li J, Bouska JJ, Wang G, Semizarov D, Albert DH, Donawho CK, Glaser KB, Shah OJ: Identification of genes that confer tumor cell resistance to the aurora B kinase inhibitor, AZD1152. *The pharmacogenomics journal* 9 (2) 2009. S. 90-102.

- Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H: One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 77 (1) 1999. S. 37-46.
- Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K: Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 155 (7) 2001. S. 1109-1116.
- Hannon GJ: RNA interference. *Nature* 418 (6894) 2002. S. 244-251.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC: Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98 (6) 1999. S. 859-869.
- Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec, Julian M C, Miller KM: VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nature medicine* 10 (3) 2004. S. 262-267.
- Hartwell L, Kastan M: Cell cycle control and cancer. *Science* 266 (5192) 1994. S. 1821-1828.
- Hata T, Furukawa T, Sunamura M, Egawa S, Motoi F, Ohmura N, Marumoto T, Saya H, Horii A: RNA interference targeting aurora kinase a suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65 (7) 2005. S. 2899-2905.
- Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters J: The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of cell biology* 161 (2) 2003. S. 281-294.
- Herkert B, Eilers M: Transcriptional repression: the dark side of myc. *Genes & cancer* 1 (6) 2010. S. 580-586.
- Hilton JF, Shapiro GI: Aurora kinase inhibition as an anticancer strategy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (1) 2014. S. 57-59.
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H: Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114 (5) 2003. S. 585-598.
- Hirota T, Lipp JJ, Toh B, Peters J: Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438 (7071) 2005. S. 1176-1180.

- Ho A, Dowdy SF: Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 12 (1) 2002. S. 47-52.
- Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G: Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 12 (1) 1993. S. 53-63.
- Honda R, Korner R, Nigg EA: Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 14 (8) 2003. S. 3325-3341.
- Hook KE, Garza SJ, Lira ME, Ching KA, Lee NV, Cao J, Yuan J, Ye J, Ozeck M, Shi ST, Zheng X, Rejto PA, Kan, Julie L C, Christensen JG, Pavlicek A: An integrated genomic approach to identify predictive biomarkers of response to the aurora kinase inhibitor PF-03814735. *Molecular cancer therapeutics* 11 (3) 2012. S. 710-719.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD: Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102 (3) 2000. S. 279-291.
- Hu HM, Chuang CK, Lee MJ, Tseng TC, Tang TK: Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1. *DNA Cell Biol* 19 (11) 2000. S. 679-688.
- Huang X, Luo S, Xu J, Li J, Xu D, Wang L, Yan M, Wang X, Wan X, Zheng F, Zeng Y, Liu Q: Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood* 111 (5) 2008. S. 2854-2865.
- Hwang LH: Budding Yeast Cdc20: A Target of the Spindle Checkpoint. *Science* 279 (5353) 1998. S. 1041-1044.
- Infante J, Dees EC, Cohen RB, Burris H, O'Neil B, Murphy P, Lee Y, Pappas J, Ecsedy JA, Eton O: 280 POSTER Phase I study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of MLN8237, a selective Aurora A kinase inhibitor, in the United States. *European Journal of Cancer Supplements* 6 (12) 2008. S. 90-91.
- Iritani BM, Eisenman RN: c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (23) 1999. S. 13180-13185.
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J: Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature cell biology* 5 (2) 2003. S. 143-148.
- Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, Batchelor TT, Sorensen AG: Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature reviews. Clinical oncology* 6 (6) 2009. S. 327-338.

- Janning, Wilfried; Knust, Elisabeth 2008: Genetik. Allgemeine Genetik, Molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik. 2., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Jones PM, George AM: The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. Cellular and molecular life sciences : CMLS 61 (6) 2004. S. 682-699.
- Kassim SK, Ali HS, Sallam MM, Fayed ST, Seada LS, abd-Elkawy E, Seada MA, Khalifa A: Increased bcl-2 expression is associated with primary resistance to chemotherapy in human epithelial ovarian cancer. Clin Biochem 32 (5) 1999. S. 333-338.
- Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, Tatsuka M, Takahashi M, Nagata K, Inagaki M: Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. Mol Biol Cell 14 (4) 2003. S. 1489-1500.
- Keen N, Taylor S: Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. Nat Rev Cancer 4 (12) 2004. S. 927-936.
- Keen N, Taylor S: Mitotic drivers--inhibitors of the Aurora B Kinase. Cancer metastasis reviews 28 (1-2) 2009. S. 185-195.
- Keller U, Huber J, Nilsson JA, Fallahi M, Hall MA, Peschel C, Cleveland JL: Myc suppression of Nfkb2 accelerates lymphomagenesis. BMC cancer 10 2010. S. 348.
- Kelly KR, Ecsedy J, Medina E, Mahalingam D, Padmanabhan S, Nawrocki ST, Giles FJ, Carew JS: The novel Aurora A kinase inhibitor MLN8237 is active in resistant chronic myeloid leukaemia and significantly increases the efficacy of nilotinib. Journal of cellular and molecular medicine 15 (10) 2011. S. 2057-2070.
- Khan J, Ezan F, Crémet J, Fautrel A, Gilot D, Lambert M, Benaud C, Troadec M, Prigent C: Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. PloS one 6 (10) 2011. S. 26512.
- Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y: Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. J Biol Chem 274 (11) 1999. S. 7334-7340.
- Kinoshita K, Noetzel TL, Pelletier L, Mechtler K, Drechsel DN, Schwager A, Lee M, Raff JW, Hyman AA: Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. J Cell Biol 170 (7) 2005. S. 1047-1055.
- Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A, Loeffler M, Trümper L, Pfreundschuh M, Siebert R: Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-

- Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* 22 (12) 2008. S. 2226-2229.
- Knippers, Rolf 2006: *Molekulare Genetik*. 68 Tabellen. 9., komplett überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Ko MS: An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res* 18 (19) 1990. S. 5705-5711.
- Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajdich M: Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 152 (1) 2008. S. 27-33.
- Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmshatriya PS, Lepsik M, Hajdich M: Aurora kinase inhibitors: Progress towards the clinic. *Invest New Drugs* 30 (6) 2012. S. 2411-2432.
- Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T: 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) 2003. S. 853-864.
- Landen, Charles N Jr, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, Bodurka DC, Gershenson DM, Brinkley WR, Sood AK: Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 13 (14) 2007. S. 4098-4104.
- Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS: The spindle assembly checkpoint. *Current biology* : CB 22 (22) 2012. S. 966-80.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396 (6712) 1998. S. 643-649.
- Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, Taniguchi H, Furukawa K, Urano T: Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* 279 (45) 2004. S. 47201-47211.
- Lin Y, Richards FM, Krippendorff B, Bramhall JL, Harrington JA, Bapiro TE, Robertson A, Zheleva D, Jodrell DI: Paclitaxel and CYC3, an aurora kinase A inhibitor, synergise in pancreatic cancer cells but not bone marrow precursor cells. *British journal of cancer* 107 (10) 2012. S. 1692-1701.
- Ling V: Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 40 (7) 1997. S. S3.

- Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, Scagliotti GV: Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *Journal of translational medicine* 9 2011. S. 100.
- Lodish, Harvey F. 2000: *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman.
- Löwenberg B, Muus P, Ossenkoppele G, Rousselot P, Cahn J, Ifrah N, Martinelli G, Amadori S, Berman E, Sonneveld P, Jongen-Lavrencic M, Rigaudeau S, Stockman P, Goudie A, Faderl S, Jabbour E, Kantarjian H: Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood* 118 (23) 2011. S. 6030-6036.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM: Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cellular Signalling* 17 (9) 2005. S. 1033-1051.
- Manfredi MG, Ecsedy JA, Chakravarty A, Silverman L, Zhang M, Hoar KM, Stroud SG, Chen W, Shinde V, Huck JJ, Wysong DR, Janowick DA, Hyer ML, Leroy PJ, Gershman RE, Silva MD, Germanos MS, Bolen JB, Claiborne CF, Sells TB: Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic assays. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (24) 2011. S. 7614-7624.
- Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ: myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 61 1992. S. 809-860.
- Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Lock R, Carol H, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Wu J, Smith MA, Houghton PJ: Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatric blood & cancer* 55 (1) 2010. S. 26-34.
- Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, Saya H: Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 278 (51) 2003. S. 51786-51795.
- Matulonis UA, Sharma S, Ghamande S, Gordon MS, Del Prete, Salvatore A, Ray-Coquard I, Kutarska E, Liu H, Fingert H, Zhou X, Danaee H, Schilder RJ: Phase II study of MLN8237 (alisertib), an investigational Aurora A kinase inhibitor, in patients with platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *Gynecologic oncology* 127 (1) 2012. S. 63-69.
- McLaughlin J, Markovtsov V, Li H, Wong S, Gelman M, Zhu Y, Franci C, Lang DW, Pali E, Lasaga J, Low C, Zhao F, Chang B, Gururaja TL, Xu W, Baluom M, Sweeny D, Carroll D, Sran A, Thota S, Parmer M, Romane A, Clemens G, Grossbard E, Qu K, Jenkins Y, Kinoshita T, Taylor V, Holland SJ, Argade A, Singh R, Pine P, Payan DG, Hitoshi Y: Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569

- identified through an image-based phenotypic screen. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136 (1) 2010. S. 99-113.
- Meraldi P, Nigg EA: The centrosome cycle. *FEBS Lett* 521 (1-3) 2002. S. 9-13.
- Meyer N, Penn LZ: Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer* 8 (12) 2008. S. 976-990.
- Minton SE, LoRusso P, Lockhart AC, Saif M, Krishnamurthi SS, Pickett-Gies CA, Wang Y, Guan S, Roben E, Stein MN: A phase I study of MK-5108, an oral aurora A kinase inhibitor, in both monotherapy and in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 28 (15) 2010. S. 13026.
- Modugno M, Casale E, Soncini C, Rosettani P, Colombo R, Lupi R, Rusconi L, Fancelli D, Carpinelli P, Cameron AD, Isacchi A, Moll J: Crystal structure of the T315I Abl mutant in complex with the aurora kinases inhibitor PHA-739358. *Cancer research* 67 (17) 2007. S. 7987-7990.
- Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S: BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90 (3) 1997. S. 1168-1174.
- Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott, Maria I F, Ditchfield C, Taylor SS: Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci* 118 (Pt 16) 2005. S. 3639-3652.
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2) 1983. S. 55-63.
- Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos M: Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer treatment reviews* 34 (2) 2008. S. 175-182.
- Musacchio A, Hardwick KG: The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (10) 2002. S. 731-741.
- Musacchio A, Salmon ED: The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (5) 2007. S. 379-393.
- Nahta R, Yu D, Hung M, Hortobagyi GN, Esteva FJ: Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 3 (5) 2006. S. 269-280.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV: MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18 (19) 1999. S. 3004-3016.

- Nilsson JA, Cleveland JL: Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22 (56) 2003. S. 9007-9021.
- O'Hare T, Eide CA, Deininger, Michael W N: Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110 (7) 2007. S. 2242-2249.
- Oster SK, Ho, Cynthia S W, Soucie EL, Penn LZ: The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* 84 2002. S. 81-154.
- Pallis M, Russell N: Strategies for overcoming p-glycoprotein-mediated drug resistance in acute myeloblastic leukaemia. *Leukemia* 18 (12) 2004. S. 1927-1930.
- Payne GS, Bishop JM, Varmus HE: Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295 (5846) 1982. S. 209-214.
- Pelengaris S, Khan M, Evan G: c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2 (10) 2002. S. 764-776.
- Pinsky BA, Kung C, Shokat KM, Biggins S: The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* 8 (1) 2006. S. 78-83.
- Rassow, Joachim 2008: *Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl.* Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Real PJ, Sierra A, Juan A de, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL: Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21 (50) 2002. S. 7611-7618.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O: ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (3) 2009. S. 218-227.
- Renshaw JS, Patnaik A, Gordon M, Beerman M, Fischer D, Gianella-Borradori A, Lin C, Mendelson D: A phase I two arm trial of AS703569 (R763), an orally available aurora kinase inhibitor, in subjects with solid tumors: preliminary results. *J Clin Oncol* 25 2007.
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC: Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (10) 2007. S. 798-812.
- Rüdel S, Meister G: *RNA-Technologien: Von der Grundlagenforschung zum Medikament.* Biospektrum. 2007. S. 32-33.

- Sahin O, Wang Q, Brady SW, Ellis K, Wang H, Chang C, Zhang Q, Priya P, Zhu R, Wong ST, Landis MD, Muller WJ, Esteva FJ, Chang J, Yu D: Biomarker-guided sequential targeted therapies to overcome therapy resistance in rapidly evolving highly aggressive mammary tumors. *Cell research* 24 (5) 2014. S. 542-559.
- Sasai K, Katayama H, Stenoien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S: Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 59 (4) 2004. S. 249-263.
- Sawyers C: Targeted cancer therapy. *Nature* 432 (7015) 2004. S. 294-297.
- Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, Logani S, McDonald JF, Benigno BB, Moreno CS: Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *J Transl Med* 6 2008. S. 79.
- Schumacher JM, Golden A, Donovan PJ: AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* 143 (6) 1998. S. 1635-1646.
- Seamon JA, Rugg CA, Emanuel S, Calcagno AM, Ambudkar SV, Middleton SA, Butler J, Borowski V, Greenberger LM: Role of the ABCG2 drug transporter in the resistance and oral bioavailability of a potent cyclin-dependent kinase/Aurora kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* 5 (10) 2006. S. 2459-2467.
- Sehdev V, Katsha A, Ecsedy J, Zaika A, Belkhiri A, El-Rifai W: The combination of alisertib, an investigational Aurora kinase A inhibitor, and docetaxel promotes cell death and reduces tumor growth in preclinical cell models of upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer* 119 (4) 2013. S. 904-914.
- Sen S, Zhou H, White RA: A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14 (18) 1997. S. 2195-2200.
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL: Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2 (2) 2002. S. 117-125.
- Sherr CJ: Principles of tumor suppression. *Cell* 116 (2) 2004. S. 235-246.
- Shimomura T, Hasako S, Nakatsuru Y, Mita T, Ichikawa K, Kodera T, Sakai T, Nambu T, Miyamoto M, Takahashi I, Miki S, Kawanishi N, Ohkubo M, Kotani H, Iwasawa Y: MK-5108, a highly selective Aurora-A kinase inhibitor, shows antitumor activity

- alone and in combination with docetaxel. *Molecular cancer therapeutics* 9 (1) 2010. S. 157-166.
- Smith BD: Imatinib for chronic myeloid leukemia: the impact of its effectiveness and long-term side effects. *Journal of the National Cancer Institute* 103 (7) 2011. S. 527-529.
- Sonet A, Graux C, Maertens J: 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. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 112 (abstr 2963) 2008.
- Sos ML, Dietlein F, Peifer M, Schottle J, Balke-Want H, Muller C, Koker M, Richters A, Heynck S, Malchers F, Heuckmann JM, Seidel D, Eyers PA, Ullrich RT, Antonchick AP, Vintonyak VV, Schneider PM, Ninomiya T, Waldmann H, Buttner R, Rauh D, Heukamp LC, Thomas RK: A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (42) 2012. S. 17034-17039.
- Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mitnacht S, Bartek J, Eilers M: Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J* 14 (19) 1995. S. 4814-4826.
- Sulic S, Panic L, Dikic I, Volarevic S: Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J* 46 (4) 2005. S. 622-638.
- System Biosciences: Lentivector Expression Systems: Guide to Packaging and Transduction of Target Cells User Manual. ver. 071510.
- Terada Y, Uetake Y, Kuriyama R: Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J Cell Biol* 162 (5) 2003. S. 757-763.
- Todd R, Wong DT: Oncogenes. *Anticancer Res* 19 (6A) 1999. S. 4729-4746.
- Tothova E, Fricova M, Stecova N, Kafkova A, Elbertova A: High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma* 49 (3) 2002. S. 141-144.
- Tsai M, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y: A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 5 (3) 2003. S. 242-248.
- Tsai M, Zheng Y: Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Curr Biol* 15 (23) 2005. S. 2156-2163.

- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 (4706) 1985. S. 1440-1443.
- Vader G, Lens, Susanne M A: The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1786 (1) 2008. S. 60-72.
- Vader G, Medema RH, Lens, Susanne M A: The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* 173 (6) 2006. S. 833-837.
- van der Holt, Bronno, Löwenberg B, Burnett AK, Knauf WU, Shepherd J, Piccaluga PP, Ossenkoppele GJ, Verhoef, Gregor E G, Ferrant A, Crump M, Selleslag D, Theobald M, Fey MF, Vellenga E, Dugan M, Sonneveld P: The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood* 106 (8) 2005. S. 2646-2654.
- Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM: Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42 (3) 1982. S. 773-779.
- Vermeulen K, Van Bockstaele, Dirk R, Berneman ZN: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36 (3) 2003. S. 131-149.
- Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe J, Castro A, Lorca T: Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* 15 (10) 2004. S. 4584-4596.
- Vlaming, Maria L H, Lagas JS, Schinkel AH: Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Advanced drug delivery reviews* 61 (1) 2009. S. 14-25.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810) 2000. S. 307-310.
- Wang XX, Liu R, Jin SQ, Fan FY, Zhan QM: Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Cell Res* 16 (4) 2006. S. 356-366.
- Wilkinson RW, Odedra R, Heaton SP, Wedge SR, Keen NJ, Crafter C, Foster JR, Brady MC, Bigley A, Brown E, Byth KF, Barrass NC, Mundt KE, Foote KM, Heron NM, Jung FH, Mortlock AA, Boyle FT, Green S: AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. *Clin Cancer Res* 13 (12) 2007. S. 3682-3688.

- Wu R, Lin L, Beer DG, Ellenson LH, Lamb BJ, Rouillard J, Kuick R, Hanash S, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR: Amplification and overexpression of the L-MYC proto-oncogene in ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 162 (5) 2003. S. 1603-1610.
- Yan X, Cao L, Li Q, Wu Y, Zhang H, Saiyin H, Liu X, Zhang X, Shi Q, Yu L: Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes Cells* 10 (6) 2005. S. 617-626.
- Yang D, Liu H, Goga A, Kim S, Yuneva M, Bishop JM: Therapeutic potential of a synthetic lethal interaction between the MYC proto-oncogene and inhibition of aurora-B kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (31) 2010. S. 13836-13841.
- Yip KW, Reed JC: Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27 (50) 2008. S. 6398-6406.
- Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF: CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* 155 (7) 2001. S. 1147-1157.
- Zhang X, Park JS, Park KH, Kim KH, Jung M, Chung HC, Rha SY, Kim HS: PTEN Deficiency as a Predictive Biomarker of Resistance to HER2-Targeted Therapy in Advanced Gastric Cancer. *Oncology* 88 (2) 2014. S. 76-85.
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20 (2) 1998. S. 189-193.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellzyklusstadien. ....	2
Abbildung 2: Zellzyklusregulation.....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aurora Kinasen A, B und C. ....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Aurora Kinasen A und B im Zellzyklus sowie ihrer Substrate.....	11
Abbildung 5: Ermittlung einer geeigneten Konzentration R763/AS703569. ....	37
Abbildung 6: PI-FACS, Zelllinie 580 mit 10, 25 und 100nM R763/AS703569. ....	38
Abbildung 7: Expression der <i>AURKA/B</i> -Mutation in Lymphomzellen der Linie 580 und 665; real-time-PCR, semiquantitative Auswertung.....	39
Abbildung 8: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Aurka (A) und Aurkb (B) in Lymphomzelllinien 580 und 665 nach Transduktion. ....	40
Abbildung 9: Vermehrte Expression von pHH3 als Effekt von AurkaA/B- Überexpression; Western Blot.....	40
Abbildung 10: Zellen mit mutierter Aurora Kinase B sind resistenter gegenüber dem AKI im Vergleich zur Kontrolle.....	42
Abbildung 11: Ermittlung einer Standardkurve zur Titerbestimmung als Kontrolle der Infektion.....	45
Abbildung 12: Keine erfolgreiche Infektion der Lymphomzellen.....	46
Abbildung 13: NIH Myc-Zellen sind empfindlicher gegenüber dem Aurora Kinase Inhibitor als entsprechende Zellen mit MIG-Leervektor.....	48
Abbildung 14: Erfolgreiche Transduktion der siRNA library in die NIH Myc-Zellen. ....	49
Abbildung 15: Kein Wachstum der mit der siRNA- bzw. cDNA library infizierten NIH Myc-Zellen in Gegenwart des AKI. ....	52
Abbildung 16: Bcl-2-überexprimierende Lymphomzellen sind weniger empfindlich gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren. ....	54

Abbildung 17: Bcl-2 Überexpression in NIH Myc-Zellen..... 55

Abbildung 18: Bcl-2-überexprimierende NIH Myc-Zellen zeigen Wachstum trotz  
Zugabe des AKI..... 56

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	17
Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	18
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien .....	19
Tabelle 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Kits .....	21
Tabelle 5: Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden .....	21
Tabelle 6: Verwendete Puffer .....	22
Tabelle 7: Verwendete Primer.....	24
Tabelle 8: Verwendete Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide.....	24
Tabelle 9: Zellmedien.....	25
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	26
Tabelle 11: Softwareprogramme.....	26
Tabelle 12: Pipettierschema real-time PCR .....	29
Tabelle 13: Pipettierschema Titerkontrolle mittels RT-PCR.....	30

## 7.4 Danksagung

Herrn Professor Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion im gut ausgestatteten hämatologischen Forschungslabor der III. Medizinischen Klinik durchzuführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Ulrich Keller für die Überlassung dieses interessanten Themas und die fortwährend gute Betreuung und Unterstützung bei allen Fragestellungen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Vielen Dank auch an die AG Keller, besonders an Stephanie Schöffmann für die geduldige Einarbeitung in die Labortechniken sowie ihre stete Unterstützung und Hilfe bei allen Problemen. Herrn Dr. Alexander Höllein danke ich für die ständige Motivation und die vielen Ratschläge während der Anfertigung dieser Arbeit. Danke auch an Viktoriya Tomiatti und Susanne Daemgen für ihre Hilfe und an Zhoulei Li für die gute Zusammenarbeit.

Besonders danke ich meiner Familie und meinem Freund für die immerwährende Unterstützung und das Verständnis während meines Studiums und der Promotion.