

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

**Die Bedeutung der Bcr-Abl und Aurora Kinase Inhibition für die
biologische Aktivität der dualen Inhibitoren
PHA-739358 und AS-703569 in Bcr-Abl
transformierten Zellen**

Anna Katharina Seitz

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

2. Priv.-Doz. Dr. T. N. Dechow

Die Dissertation wurde am 27.07.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.06.2012 angenommen.

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Chronische myeloische Leukämie	1
1.1.1 Das Fusionsprotein Bcr-Abl	1
1.1.2 Die Rolle von Imatinib in der CML-Therapie	4
1.2 Aurora Kinasen	7
1.2.1 Struktur der Aurora Kinasen	8
1.2.2 Regulation der Aurora Kinasen	9
1.2.3 Funktion der Aurora Kinasen	12
1.2.4 Die Bedeutung der Aurora Kinasen in der Karzinogenese	15
1.3 Aufgabenstellung	17
2 Materialien und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen	19
2.1.2 Medien und Supplemente	21
2.1.3 Enzyme	22
2.1.4 Antikörper.....	22
2.1.5 Kinaseninhibitoren	23
2.1.6 Zelllinien.....	23
2.1.7 Bakterienstämme	24
2.1.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	24
2.1.9 Vektoren.....	25
2.1.10 Konstrukte	25
2.1.11 Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen in DNA-Konstrukte	26
2.1.12 Oligonukleotide zur Subklonierung in den p-Babe-Puro Vektor.....	26
2.1.13 Molekularbiologische Kitsysteme zur Bearbeitung von DNA/ Proteinen.....	27

2.1.14	Standard Geräte	28
2.1.15	Standard Lösungen und Puffer	29
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken	32
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.1.2	PCR-Mutagenese	33
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.2.1.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	37
2.2.1.6	Restriktionsverdau	38
2.2.1.7	5´- Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	38
2.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (Subklonierung)	39
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten mittels <i>TOPO® Cloning</i>	39
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	40
2.2.2.1	Kulturbedingungen	40
2.2.2.2	Kompetente Bakterien	40
2.2.2.3	Hitzeschock-Transformation von Bakterien	41
2.2.2.4	Kultivierung von transformierten Bakterien	41
2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (Mini- und Maxi-Präparation)	42
2.2.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	42
2.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	42
2.2.3.2	Kryokonservierung	43
2.2.3.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	43
2.2.3.4	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	44
2.2.3.5	Transfektion	44
2.2.3.6	Transiente Transfektion durch Lipofektion	45
2.2.3.7	Gewinnung von Retrovirus	45
2.2.3.8	Retrovirale Transduktion	46

2.2.3.9	Selektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E.....	46
2.2.3.10	G ₀ -Synchronisation von Zellen.....	47
2.2.4	Biologische Untersuchungen	48
2.2.4.1	Proliferationsmessungen	48
2.2.4.2	Statische Zellzyklusanalyse und Apoptosemessung.....	48
2.2.4.3	Dynamische Zellzyklusanalyse	50
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	52
2.2.5.1	Gewinnung von Zelllysaten	52
2.2.5.2	Proteinbestimmung	52
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
2.2.5.4	Transfer der Proteine auf eine PDVF-Membran (Western Blot)...	54
2.2.5.5	Immunchemische Detektion transferierter Proteine	55
2.2.5.6	Amidoschwarzfärbung transferierter Proteine	56
2.2.5.7	Entfernung gebundener Antikörper von der Membran	56
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Charakterisierung der Aurora Kinase Inhibitoren	59
3.1.1	Transformierende Aktivität von Bcr-Abl und seiner Mutanten in Ba/F3-Zellen.....	59
3.1.2	PHA-739358 und AS-703569 induzieren antiproliferative Effekte in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen.....	59
3.1.3	PHA-739358 und AS-703569 inhibieren die Aktivität von Bcr-Abl und Aurora Kinasen	62
3.1.4	Inhibition von Aurora Kinasen führt zu Zellteilungsdefekten	69
3.2	Entwicklung resistenter Aurora Kinase Mutanten	73
3.3	In-vitro Charakterisierung der verschiedenen Aurora Kinase Mutanten.....	80
3.3.1	Resistenzanalysen.....	80
3.3.2	Expression von Aurora B G160V reduziert die antiproliferative Wirkung von Aurora Kinase Inhibitoren	88

3.3.3	Expression der resistenten Aurora B G160V-Mutante führt zur Wiederherstellung Aurora B assoziierter Zellzyklus-Funktionen unter pharmakologischer Aurora Kinase Inhibition.....	89
4	Diskussion	95
4.1	PHA-739358 und AS-703569 zeigen Aktivität gegenüber Imatinib resistenten Bcr-Abl-Mutanten.....	96
4.2	Aurora Kinase B ist die entscheidene Zielstruktur von PHA-739358 und AS-703569 in Bcr-Abl positiven Zellen.....	99
4.3	Pharmakoresistente Aurora Kinase Mutanten als Hilfsmittel zur Targetvalidierung.....	102
4.4	Biomarker als Wegweiser in der Therapie mit Aurora Kinase Inhibitoren	104
4.5	Erfolgsaussichten von Kombinationstherapien und kritische Bewertung der Aurora Kinase Inhibitoren als Chemotherapeutika ..	105
6	Zusammenfassung.....	107
7	Literaturverzeichnis	109
8	Abbildungsverzeichnis	133
9	Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
λ	Wellenlänge
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μmol	10^{-6} Mol
μM ($\mu\text{mol/l}$)	10^{-6} Mol/Liter
Abb.	Abbildung
Abl-1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
A.d.	Aqua destillata
APC	Anaphase fördernden Komplex (<i>Cdh1-dependent anaphase-promoting complex</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	<i>Abl-related gene</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aur	Aurora Kinase
b	Base
BBMM	<i>Basal Bone Marrow Medium</i>
Bcr	<i>Breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
Cbl	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
Cdk	<i>Cylin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
ckit	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
CML	chronische myeloische Leukämie

CPC	<i>chromosomal passenger complex</i>
CRKL	<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian) like</i>
DAD	<i>D-box-activating domain (= A-Box)</i>
DISK-PAGE	diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Demethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DOK-1	<i>Downstream of kinase 1</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EG5	Synonym für KIF11 (<i>kinesin family member 11</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
et al.	et alii
EXTAH	Komplex aus Eg5, XMAP215, Tpx2, Aurora A und HURP
F	Phenylalanin
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Glycin
GADD45a	<i>growth arrest and DNA damage inducible gene 45a</i>
h	human / Stunde
H	Histidin
HEF	Oberflächen-Haemagglutinin-Esterase-Fusion-Protein
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
I	Isoleucin

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Imatinib
INCENP	<i>inner centromere protein</i>
Inh2	Inhibitor-2
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kDA	Kilodalton
KEN	Aminosäuresequenz aus Lysin (K), Glutaminsäure (E) und Asparagin (N)
L	Leucin
lin	linear
log	logarithmisch
M	Methionin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
min	Minute(n)
mM (mmol/l)	10^{-3} Mol/Liter
MPF	<i>Mitosis promoting factor</i> , CyclinB1-CDK1-Komplex
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
ng	10^{-9} Gramm, Nanogramm
nm	10^{-9} Meter, Nanometer
nM	10^{-9} Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
p	Phospho-
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PEST	Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) reiche Peptidsequenz

pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pY	Phosphotyrosin
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
SAC	Spindelkontrollpunkt (<i>spindle assembly checkpoint</i>)
sec	Sekunde(n)
SS	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T	Threonin
Tbl	Tablette
TD60	Synonym Rcc2 (<i>regulator of chromosome condensation 2</i>)
TEL	<i>translocated ets leukemia protein</i>
TPX-2	<i>targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor(en)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt / Valin
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) gehört zur Gruppe der chronischen myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 1,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr. Insgesamt wird der Anteil von CML-Fällen an allen Leukämieerkrankungen mit etwa 20% angegeben (Hochhaus et al. 2002). Betroffen sind in erster Linie ältere Menschen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose etwa 53 Jahre beträgt (Kurzrock et al. 1988; Sawyers 1999). Männer sind hierbei 1,4-mal häufiger betroffen als Frauen (Boring et al. 1993). Zu Grunde liegt dieser Erkrankung die klonale Proliferation einer maligne entarteten, pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks. Dabei steht vor allem das unkontrollierte Wachstum der myeloischen Reihe der Hämatopoese im Vordergrund (Nolte et al. 1995). In 95% aller CML-Fälle kann ein verkürztes Chromosom 22, das Philadelphia Chromosom, nachgewiesen werden (Nowell et al. 1960; Kurzrock et al. 1988; Faderl et al. 1999). Es resultiert aus einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 - der Philadelphia Translokation (t(9;22)(q34;q11) (Rowley 1973). Folge ist die Expression des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl (Bartram et al. 1983; Heisterkamp et al. 1985). In zahlreichen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Bcr-Abl Expression für die maligne Transformation myeloider Zellen verantwortlich ist (Daley et al. 1988; Young et al. 1988; Lugo et al. 1989) und im Tiermodell CML-ähnliche Krankheitsbilder hervorruft (Daley et al. 1990; Elefanty et al. 1990). Damit ist die CML eine der ersten Erkrankungen, bei denen eine definitive Ursache auf molekularer Ebene im Inneren der Zelle nachgewiesen werden konnte.

1.1.1 Das Fusionsprotein Bcr-Abl

Die zur Translokation notwendigen Bruchstellen sind auf Chromosom 9q34 sowie Chromosom 22q11 lokalisiert und liegen jeweils in codierenden Bereichen. Auf Chromosom 9 ist das Gen c-Abl (Heisterkamp et al. 1983), auf Chromosom 22 das Bcr-Gen betroffen (Groffen et al. 1984). Ersteres codiert für eine

Tyrosinkinase, welche sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist. Kinaseaktivität und Lokalisation von c-Abl unterliegen strikten Kontrollmechanismen, an denen intra- und intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen sowie posttranslationale Modifikationen beteiligt sind (Van Etten 1999). Die Verknüpfung des 5`-Ende des Bcr-Gens mit dem 3`-Ende des c-Abl-Gens lässt die Fusionsgene Bcr-Abl auf Chromosom 22 sowie c-Bcr-Abl auf Chromosom 9 entstehen. Während der Bruch im Chromosom 9 meistens im ersten Intron liegt (Shtivelman et al. 1985), können die Bruchpunkte im Chromosom 22 variieren. Bislang sind in der Bcr-Genregion drei Bruchpunkte beschrieben worden. Man unterscheidet zwischen M-Bcr (major), μ - Bcr (mikro) und m-Bcr (minor). Daraus ergeben sich drei verschiedene Bcr-Abl-Fusionsgene mit einer Masse von 190 kD, 210 kD bzw. 230kD (Abb. 1).

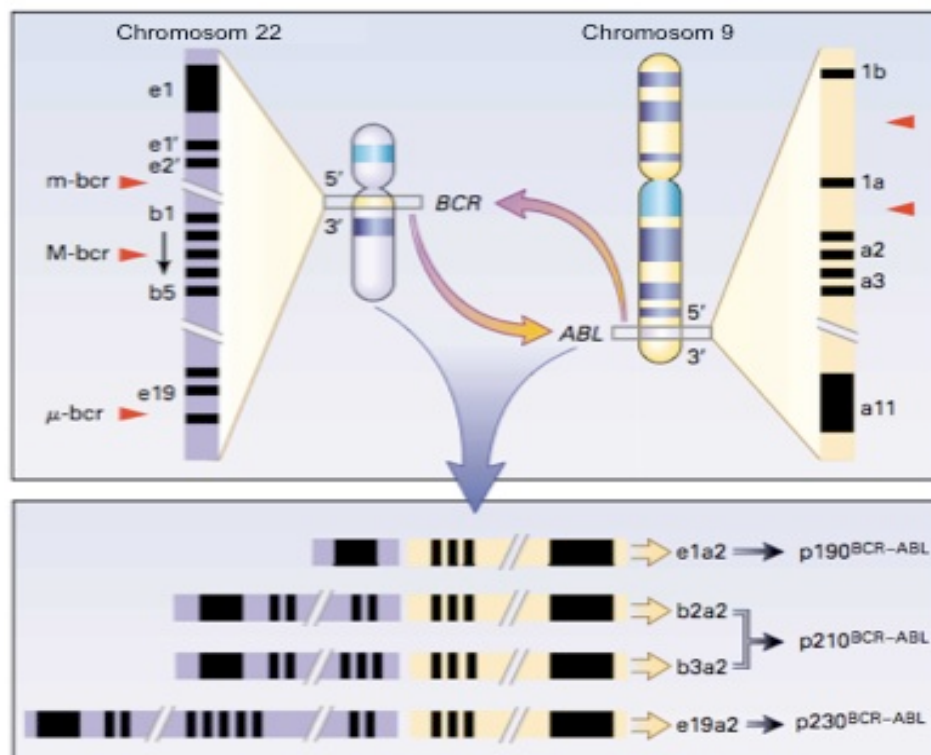


Abb. 1: Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) in CML (nach Faderl et al. 1999). Das Philadelphia-Chromosom resultiert aus der reziproken Translokation zwischen dem 3`c-Abl-Gensegment auf Chromosomen 9 und 5`Bcr-Gensegment auf Chromosom 22. In Abhängigkeit von der Bruchstelle im Bcr-Gen fusionieren unterschiedlich große Bcr-Gensegmente mit 3`c-Abl-Segmenten definierter Größe. Die Folge sind m-RNA Moleküle (e1a2, b2a2, b3a2, e19a2) unterschiedlicher Länge, die in Bcr-Abl-Fusionsproteine mit variablem Molekulargewicht transkribiert werden. c-Abl (*cellular Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*); Bcr (*breakpoint cluster region*); m-Bcr: minor Bcr-Region; M-Bcr: Major Bcr-Region; μ -Bcr: mikro Bcr-Region

Die resultierenden Genprodukte unterscheiden sich dementsprechend in ihrer Gesamtlänge, wobei der Anteil des Abl-Gens stets identisch ist, der Bcr-Anteil variiert. Bei der CML ist überwiegend die Major-Bcr-Region betroffen. Hier entsteht durch Integration des c-Abl-Gens in die Exons 10-13 des Bcr-Gens das Fusionsgen Bcr-Abl p210. Bei lediglich 20-30% der Patienten mit CML liegt die Integrationsstelle im Intron 1, der *minor breakpoint region*. Diese resultiert in der Bildung der kürzeren Genvariante Bcr-Abl p190. Nur selten tritt die Fusion zwischen dem Bcr-Exon 19 und dem c-Abl-Exon 2 auf und lässt damit das Fusionsgen Bcr-Abl p230 entstehen. Unabhängig von Bruchpunkten und der Größe des Fusions-Transkripts führt die Fusion von Bcr mit c-Abl zu einer konstitutiven Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase und einer veränderten Lokalisation selbiger in der Zelle (Konopka et al. 1984). Im Gegensatz zu c-Abl ist Bcr-Abl ausschließlich im Cytosol zu finden, wo es u.a. mit Bestandteilen des Aktinzytoskeletts interagiert (Van Etten et al. 1989). Beide Veränderungen in Kombination erlauben es dem Bcr-Abl-Fusionsprotein, mit Mediatoren verschiedenster interzellulärer Signalkaskaden zu interagieren und diese konstitutiv zu aktivieren (Abb. 2). Dazu gehören u.a. der Ras/MAPK-Signalweg, der PI3K/Akt- Signalweg sowie der Jak/STAT-Signalweg. Darüber hinaus phosphoryliert Bcr-Abl wichtige zelluläre Adaptorproteine, z.B. Crkl, Dok und Cbl, sowie etliche Proteine, z.B. Fak, Talin und Paxillin, die im Bereich des Zytoskeletts angesiedelt sind (Warmuth et al. 1999; Deininger et al. 2000a; Deininger et al. 2000b; Wong et al. 2004). Die biologischen Konsequenzen sind vielfältig, fördern letztlich aber alle die Transformation der Zelle und damit die Ausbildung einer malignen Erkrankung. So greift Bcr-Abl in die Abläufe der Apoptose (programmierter Zelltod) ein und verlängert damit das Überleben hämatopoetischer Zellen (Bedi et al. 1994; Cortez et al. 1995). Neben antiapoptotischen Effekten vermittelt Bcr-Abl auch proproliferative Wirkungen. Einerseits sensibilisiert es die hämatopoetische Zelle gegenüber Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Bhatia et al. 2000), andererseits greift es direkt in die Abläufe der Zellzyklusprogression ein (Cortez et al. 1997; Gesbert et al. 2000). Ferner nimmt Bcr-Abl Einfluss auf das Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Zellen an das Knochenmarkstroma, indem es die wachstumshemmenden Wirkungen der Zell-Stroma-Interaktion aufhebt (Gordon et al. 1989; Verfaillie et al. 1997; Bhatia et al. 1998). Hinsichtlich des Einflusses von Bcr-Abl auf die Differenzierung

hämatoetischer Zellen werden kontroverse Ansichten diskutiert. Demnach kann Bcr-Abl die Differenzierung der hämatoetischen Zelle sowohl antreiben (Era et al. 2000) als auch blockieren (Perrotti et al. 1998).

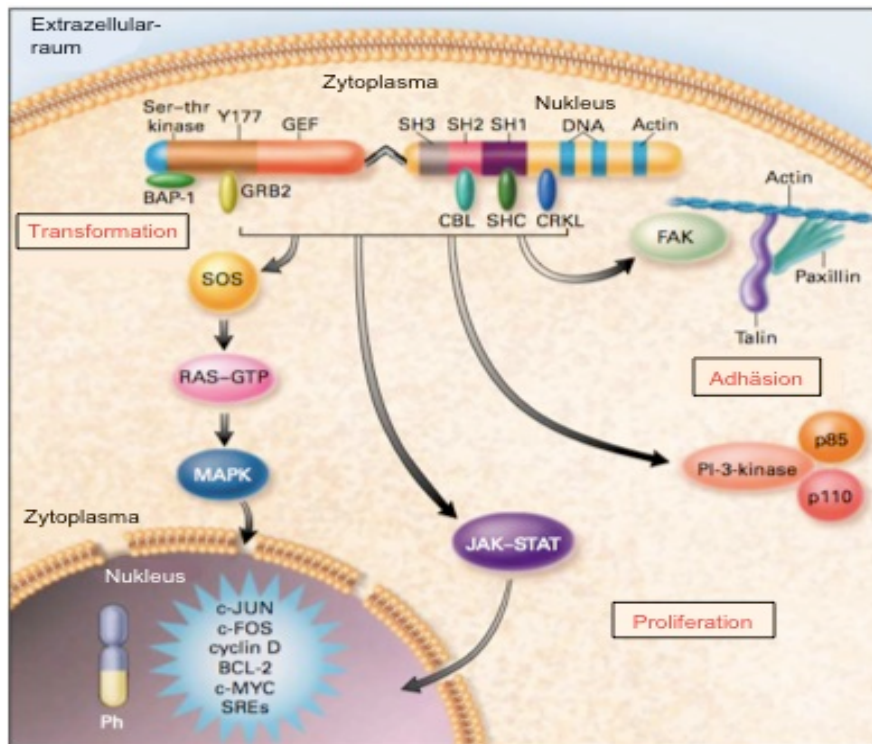


Abb. 2: Konstitutive Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Bcr-Abl p210 (Faderl et al. 1999). Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Bcr-Abl und seinem Interaktionspartner. Konstitutive Aktivierung und veränderte Lokalisation des Bcr-Abl p210 Fusionsproteins ermöglichen Interaktion mit Mediatoren verschiedenster interzellulärer Signalkaskaden, wodurch diese aktiviert werden.

1.1.2 Die Rolle von Imatinib in der CML-Therapie

Die therapeutischen Optionen im Zusammenhang mit CML haben in den letzten Jahren eine erhebliche Erweiterung erfahren. Dennoch ist die einzig bekannte kurative Maßnahme die allogene Knochenmarktransplantation. Sie stellt jedoch aufgrund der transplantationsassoziierten Mortalität nur eine Reserveoption dar. Hinzu kommt, dass viele Patienten wegen ihres hohen Alters oder mangels eines passenden HLA-kompatiblen Stammzellendonators für diese Therapie generell nicht in Frage kommen. Die Entdeckung des Onkoproteins Bcr-Abl als Auslöser der CML (Daley et al. 1990; Van Etten et al. 2004) sowie die Tatsache, dass die

Tyrosinkinase-Aktivität von Abl für die von Bcr-Abl vermittelte Transformationen unerlässlich ist (Lugo et al. 1990), machte die Abl-Kinase zu einem attraktiven Angriffspunkt für therapeutische Interventionen (Lugo et al. 1990; Deininger 2004). Wichtigster Schritt diesbezüglich war die Entwicklung neuer Medikamente auf dem Gebiet der *small molecule drugs*. Der zur Klasse der 2-Phenylaminopyrimidine gehörende Wirkstoff Imatinib (IM, STI 571, Glivec, CGP 57148) wurde dabei als potenter Inhibitor von vier Tyrosinkinasen identifiziert: PDGF-Rezeptor α und β (PDGF=*platelet-derived growth factor receptor*), Abl, das Abl verwandte Genprodukt Arg sowie cKIT (Buchdunger et al. 2000; Druker et al. 2000; Okuda et al. 2001). Darüber hinaus hemmt er spezifisch Fusionsproteine mit onkogener Potenz wie Bcr-Abl p210/p185, TEL (ETV6) und TEL-PDGF-R β (Druker et al. 1996; Carroll et al. 1997; Beran et al. 1998). Umfassende klinische Studien zeigen die Wirksamkeit von Imatinib in allen drei Krankheitsphasen der CML, wobei die höchsten Ansprechraten bei Patienten mit neu diagnostizierter, unbehandelter CML in der chronischen Phase verzeichnet werden konnten (Druker et al. 2001; Kantarjian et al. 2002a; Hughes et al. 2003; Druker et al. 2006; Hochhaus et al. 2008b; von Bubnoff et al. 2010). Eingesetzt zur Erstlinientherapie induziert Imatinib nach 18 Monaten in über 96% dieser Patienten eine komplette hämatologische und in über 76% eine komplette zytogenetische Remission (O'Brien et al. 2003). In der akzelerierten Phase sowie in der Blastenkrise sind die Remissionsraten unter Imatinib-Therapie zwar signifikant besser als unter konventioneller Chemotherapie, dennoch erwies sich der Wirkstoff als weniger effektiv im Vergleich zu den Ergebnissen bei Patienten in der chronischen Phase (Sawyers et al. 2002; Talpaz et al. 2002; Kantarjian et al. 2005; Palandri et al. 2008; Palandri et al. 2009). Ebenso steigt die Anzahl primärer und sekundärer Resistenzen gegenüber Imatinib bei fortgeschrittener CML signifikant an. Während primäre hämatologische Resistenz in der frühen Phase der CML in unter 5% der Fälle auftritt und damit ein seltenes Ereignis darstellt, steigt die Zahl bei fortgeschrittener CML nach vier Jahren auf 45 bis 70% in der akzelerierten Phase bzw. 90% in der Blastenkrise an (Daley et al. 1990; Druker et al. 2001; Kantarjian et al. 2002b; Kantarjian et al. 2002c; Ottmann et al. 2002). Verantwortlich dafür sind genetische Alterationen, die primär in einem einzigen malignen Klon auftreten. Unter Imatinib-Therapie wird dieser selektioniert und führt damit zur

Resistenz. Diese spezifischen molekularen Veränderungen entstehen vor allem durch die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen einerseits, andererseits durch die aufkommende genomische Instabilität (Ohyashiki et al. 2000; Blagosklonny 2002). In den letzten Jahren sind die Mechanismen der Imatinib-Resistenzen ausgiebig analysiert worden. In 42-90% der Fälle handelt es sich dabei um Punktmutationen im Bereich der Kinase-Domäne, einschließlich Aktivierungsschleife (*activation-loop*), Nukleotid-Bindungsschleife (*p-loop*) und ATP-Bindungstasche (*ATP-binding pocket*). Gewöhnlich führen diese zu einem Bcr-Abl-Protein mit funktionell intakter Abl-Tyrosinkinase-Domäne. Die Medikamentenbindung wird jedoch durch strukturelle Veränderungen behindert oder außer Kraft gesetzt (Weisberg et al. 2007). Seit der Entdeckung der ersten durch Punktmutation in Bcr-Abl verursachten Imatinib-Resistenz durch Sawyers und Kollegen (Gorre et al. 2001) sind bis heute mehr als 100 verschiedene beschrieben worden (Branford et al. 2002; Roche-Lestienne et al. 2002; Shah et al. 2002; von Bubnoff et al. 2002; Hochhaus et al. 2007; Agrawal et al. 2010). Mit einer Häufigkeit von fast 15% aller Bcr-Abl-Mutationen ist dabei die T315I-Mutation am stärksten vertreten, gefolgt von der P-Loop Mutation Y253F/H mit 11% (Apperley 2007b; Apperley 2007a). Darüber hinaus können auch außerhalb des Bcr-Abl-Gens Resistenzmechanismen auftreten und zur Resistenzentwicklung beitragen. Als Beispiele sind Amplifikation des Bcr-Abl-Gens mit daraus resultierender Bcr-Abl-Überexpression, Aktivierung alternativer Signalwege sowie die Pharmakokinetik von Imatinib negativ beeinflussende Veränderungen zu nennen (Gambacorti-Passerini et al. 2000; Gorre et al. 2001; Donato et al. 2003; Crossman et al. 2005). Zusammen stellen diese ein zunehmendes Problem in der CML-Therapie dar. Diese Tatsache macht die Entwicklung alternativer Therapieansätze notwendig. Eine mögliche Alternative bieten die Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation Nilotinib, Dasatinib und Bosutinib. Diese Substanzen haben sich bei einer Reihe von Imatinib-Resistenzmutationen als wirksam erwiesen, so dass in der Mehrheit der Fälle, v.a. in der chronischen Phase, eine erneute Remission erzielt werden konnte (Kantarjian et al. 2006; Puttini et al. 2006; Talpaz et al. 2006; Hochhaus et al. 2008a; Kantarjian et al. 2009; Redaelli et al. 2009; Cortes et al. 2010a). Aktuelle klinische Studien ließen insbesondere Nilotinib in den Vordergrund rücken. Es konnte gezeigt werden, dass Nilotinib nicht nur eine höhere Selektivität für Bcr-Abl als Imatinib aufweist,

sondern auch den Übergang der CML in ein fortgeschrittenes Stadium effektiver verhindert (Cortes et al. 2010b; Saglio et al. 2010). Dennoch wird auch die Wirksamkeit dieser Substanzen durch einige hoch resistente Mutationen wie die T315I-Mutation limitiert. Hier bieten neue Substanzklassen wie Aurora Kinase Inhibitoren eine viel versprechende Perspektive. Diese sollen deshalb im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.2 Aurora Kinasen

Aurora Kinasen gehören zur Familie der Serin-Threonin-Proteinkinasen. In Säugetierzellen werden drei überwiegend homologe Mitglieder exprimiert, die als Aurora Kinase A, B und C bezeichnet werden. 1995 wurde das ursprüngliche Aurora Allel während eines Screens von *Drosophila melanogaster*-Mutanten entdeckt, die durch Defekte im Spindelfaserapparat aufgefallen waren (Glover et al. 1995). Das Aurora A-Gen ist im menschlichen Genom auf Chromosom 20q13.2-q13.3, das Aurora B-Gen auf Chromosom 17p31.1 und das Aurora C-Gen auf Chromosom 19q13.43 lokalisiert. Für das murine Genom dagegen ist die Lage dieser Gene auf den Chromosom 2, 11 und 7 beschrieben worden. Da Aurora Kinasen seit ihrer Entdeckung meist unabhängig in den verschiedensten Model-Organismen untersucht worden sind und zudem speziesabhängig eine unterschiedliche Anzahl von ihnen exprimiert wird, existieren in der Literatur eine Vielzahl von unterschiedlichen Bezeichnungen. Tabelle 1 liefert eine detaillierte Übersicht der verschiedenen Nomenklaturen.

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Aurora Kinasen – Nomenklaturen (nach Keen und Tylor, 2004)

Organismus	Name	Alternative Bezeichnungen	Interaktions-Partner	Lokalisation
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ipl 1	-	Slit15, Bir1	Kinetochore
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ark 1	-	Pic1, Bir1	Kinetochore
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Aurora A Aurora B	AIR-1 AIR-2	CellINCENP	Centrosomen CPC
<i>Drosophila melanogaster</i>	Aurora A Aurora B	DmAurora IAL	DmINCENP, survivin	Centrosomen CPC
<i>Xenopus laevis</i>	Aurora A Aurora B	EG2 XAIRK2	TPX2	Centrosomen CPC
Säugetiere	Aurora A Aurora B Aurora C	Aurora 2; AIRK1; ARK1; BTAK; STK6; STK5; AYK1; IAK1 Aurora 1; AIRK2; ARK2; IAL1; AIK2; STK12; AIM1 Aurora 3, AIRK3; AIE2; STK13; AIE1; AIK3	TPX2; PPI; PKA; TACC1; Eg5; Ajuba; Bora; LATS; NDEL1; HURP; BRCA1; p53; Cdc25B; PKL1; INCENP; Borealin; Survivin; TACC1; PPI; PKA; MCAK; CUL3; Desmin; Vimentin; MKPL; MgcRacGap; Condensin1; Mps1, Chkl; <i>Tousled-like-Kinase-1</i> ; TD-60; Mad2, Mad3/BubR1, Bub3 und Cdc20 INCENP; Borealin; Survivin	Centrosomen CPC Spindel-Pole oder CPC

INCENP: *inner centromere protein*; TACC1: *transforming acidic coiled-coil containing protein*; CPC: *chromosomal passenger complex*

1.2.1 Struktur der Aurora Kinasen

Die drei in Säugetieren exprimierten Aurora Kinase Proteine bestehen aus 309-403 Aminosäuren. Jedes Protein setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer N-terminalen, einer zentralen Kinase-Domäne und einer kurzen C-terminalen Domäne (Abb. 3). Während sie im Bereich der carboxy-terminalen Domäne eine sehr hohe strukturelle Homologie aufweisen (Aurora B und A 53 %, Aurora B und C 73%), unterscheiden sie sich in Länge und Sequenz der amino-terminalen Domäne (Giet et al. 1999; Cheetham et al. 2002; Bolanos-Garcia 2005). Der niedrige Konservierungsgrad der Aminosäuren in diesem Bereich ermöglicht die notwendige Selektivität im Rahmen von Protein-Protein-Interaktionen und die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation (Carmena et al. 2003). In der katalytisch aktiven Kinasen-Domäne ist die Aktivierungsschleife (*t-loop*) lokalisiert, an deren Threonin 288-Rest aktivierende Autophosphorylierung stattfindet. Ferner weist die Proteinsequenz auch für den Abbau der Kinasen essentielle Degradationsmotive wie die carboxy-terminale D-Box (*destruction-box*) auf. Sie ist jedoch nur in Gegenwart einer A-Box (*D-box-activating domain* = DAD) im Bereich der amino-

terminalen Domäne aktiv. Dieses Zusammenspiel ist vor allem im Hinblick auf Aurora A-Degradation entscheidend (Castro et al. 2002b; Littlepage et al. 2002a). Eine weitere für die Degradation wichtige Sequenz findet sich in der N-terminalen Domäne von Aurora A und B, das aus 11-18 Aminosäuren bestehende *KEN*-Motiv, das als Erkennungsstruktur für den *Anaphase fördernden Komplex* (*Cdh1-dependent anaphase-promoting complex* = APC) fungiert (Bolanos-Garcia 2005). In Aurora C ist an ähnlicher Position das *PEST-like Motive* lokalisiert. Hier auftretende Mutationen führen zur Aufhebung der Aurora C Kinaseaktivität (Chen et al. 2002a).

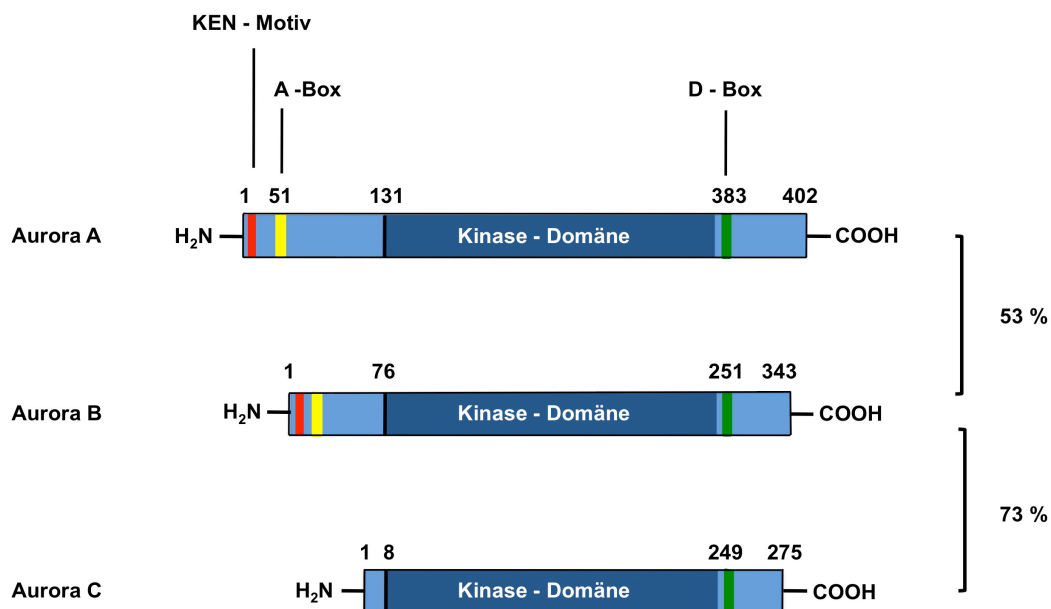


Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Aurora Kinase A-C (nach Bolanos-Garcia 2005). KEN-Motiv: Erkennungssequenz des Anaphase fördernden Komplex (*Cdh1-dependent anaphase-promoting complex* = APC); A-Box/DAD: D-Box aktivierende Domäne (*D-box-activating domain*) D-Box: Destruktions-Box (*destruction-box*)

1.2.2 Regulation der Aurora Kinasen

Die Regulation der Aurora Kinase Aktivität während des Zellzyklus unterliegt komplexen Kontrollmechanismen, bestehend aus einem engen Zusammenspiel von Proteinexpression und -degradation, Lokalisation sowie Interaktion und Phosphorylierung durch verschiedene Modulatoren.

Die Expression der Aurora Kinase-Gene erfolgt Zellzyklus-abhängig. Sie steigt während der G₂-Phase an und erreichen in der frühen Mitose ihren Höhepunkt (Kimura et al., 1997). Am Übergang von später Mitose zur G₁-Phase wird durch den *Anaphase fördernden Komplex/Cyclosom* (APC/C) die Ubiquitin-vermittelte Degradation der Aurora Kinasen eingeleitet (Castro et al. 2002a; Taguchi et al. 2002). Dabei handelt es sich um einen Multi-Enzymkomplex aus der Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen. Zielstruktur zur Polyubiquitinierung ist neben der A-Box auch die in der N-terminalen Domäne gelegene D-Box. Durch A-BOX/DAD-Interaktion erfolgt deren Aktivierung und ermöglicht so die Erkennung durch den APC/C (Castro et al. 2002b; Littlepage et al. 2002a). Dieser Abbauprozess kann durch Autophosphorylierung der A-Box an Serin 51 zumindest in Aurora A blockiert werden (Littlepage et al. 2002a; Littlepage et al. 2002b; Haydon et al. 2003). Inwieweit das ebenfalls in der N-terminalen Domäne gelegene KEN-Motiv in die Degradationsvorgängen involviert ist sowie die Frage danach, welche Strukturen in welcher Aurora Kinase für eine erfolgreiche Degradation essentiell sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Taguchi et al. 2002; Crane et al. 2004; Nguyen et al. 2005; Stewart et al. 2005).

Auch Lokalisation der Aurora Kinasen wird in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert. Die Position von Aurora A ist dabei eng mit den Centrosomen und den umgebenden Mikrotubuli assoziiert. Vom Ende der S-Phase bis zur frühen G₁-Phase besetzt Aurora A die duplizierten Centrosomen (Giet et al. 2001b). Mit Beginn der Mitose findet sich das Protein zusätzlich an den Spindelpolen, im weiteren Verlauf auch an der *Spindle midzone* (Ana- und Telophase) sowie im Bereich der *Midbodies* (späte Telophase). Die korrekte Anbindung an die Mikrotubuli erfolgt TPX2-abhängig (Gruss et al. 2002; Kufer et al. 2002). TPX2 (*targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2*) ist zurzeit der bestcharakterisierte Interaktionspartner von Aurora A. Als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist es darüberhinaus sowohl für Stabilität als auch bipolare Ausrichtung der mitotischen Spindel erforderlich (Wittmann et al. 2000).

Aurora B ist die katalytische Komponente des sogenannten *chromosomal passenger complex* (CPC). Initial formiert sich der CPC entlang der Chromosomenarmen, bevor er in der frühen Mitose am Centromer der Chromosomen zu liegen kommt. Von hier aus wandert der Komplex während der

Anaphase zur Zentralspindel und in den Zellkortexbereich, wo die Formation der Teilungsfurche stattfindet. Während der anschließenden Zytokinese konnte der CPC innerhalb der *Midbody*-Trennzone nachgewiesen werden (Cooke et al. 1987). Die verschiedenen Lokalisationspunkte des Protein-Komplexes im Rahmen des Zellzyklus lassen auf eine Koordination von chromosomalen und zytoskeletalen Abläufen schließen.

Für Aurora C konnte eine ähnliche Lokalisation wie für Aurora B während des Zellzyklus ermittelt werden (Bernard et al. 1998).

Neben der Proteinmenge und der Lokalisation unterliegt auch die enzymatische Aktivität einer Zellzyklus-abhängigen Regulation. Anhand von Massenspektrometrie konnten im Aurora Kinase Protein von *Xenopus laevis* Extrakten drei aktivierende Phosphorylierungsstellen identifiziert werden: Serin 53, Threonin 295 und Serin 349 (Littlepage et al. 2002b). Während Phosphorylierung von Serin 53 in der A-Box von Aurora A wie oben erwähnt die Degradationsvorgänge beeinflussen kann, ist Threonin 295 (entspricht Thr 288 in humanem Aurora A) in aktivierter Form maßgeblich für die Kinaseaktivität verantwortlich und damit wichtigste Phosphorylierungsstelle. Diese liegt innerhalb der Aktivierungsschleife und kann sowohl durch Protein-Kinase-A (PKA) als auch durch TPX2-vermittelte Autophosphorylierung aktiviert werden (Walter et al. 2000; Bayliss et al. 2003; Eyers et al. 2003). Die Proteinphosphatase PP1 fungiert an dieser Stelle durch Dephosphorylierung von Threonin 288 als Gegenspieler und kann die Kinaseaktivität von Aurora A inaktivieren (Walter et al. 2000; Katayama et al. 2001). Auch die dritte Phosphorylierungsstelle Serin 349 ist in der katalytischen Domäne lokalisiert. Versuche mit Aurora A-Mutanten ergaben, dass diese wahrscheinlich eine strukturelle oder regulatorische Rolle im Aktivierungsprozess spielt (Littlepage et al. 2002b). Weitere Aurora A-Aktivierungspartner sind Ajuba, Bora, Inh2 und HEF1, über deren Interaktionen jedoch noch nicht viel bekannt ist (Hirota et al. 2003; Satinover et al. 2004; Pugacheva et al. 2005; Hutterer et al. 2006).

Aurora B Kinaseaktivität basiert hauptsächlich auf Autophosphorylierung an Threonin 232 in der Aktivierungsschleife. Für eine maximale Kinaseaktivität ist zusätzlich die Bindung des Interaktionspartners INCENP (*inner centromer protein*) essentiell, wodurch allosterische Änderungen der Aktivierungsschleife und der

katalytischen Domäne induziert werden (Sessa et al. 2005). Des Weiteren sind verschiedene Kinasen wie Mps1, Chk1 und *Tousled-like-Kinase-1* sowie das Protein TD-60 direkt oder indirekt in den Aktivierungsprozess involviert (Han et al. 2005; Zachos et al. 2007; Jelluma et al. 2008; Rosasco-Nitcher et al. 2008).

Bezüglich Aurora Kinase C ist lediglich bekannt, dass, analog zu Aurora B, Interaktion mit INCEP zur Aktivierung der Kinase beiträgt (Li et al. 2004; Sasai et al. 2004).

1.2.3 Funktion der Aurora Kinasen

Aurora Kinasen sind in viele regulatorische Schritte der Mitose integriert (Abb. 4). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Centrosomenduplikation, bipolaren Spindelformation, Adaptation der Chromosomen an den mitotischen Spindelapparat, korrekte bi-orientierte Ausrichtung der Chromosomen und bei der Qualitätssicherung am Kontrollpunkt der Spindelbildung (Andrews et al. 2003; Carmena et al. 2003; Ducat et al. 2004; Fu et al. 2007; Vader et al. 2008).

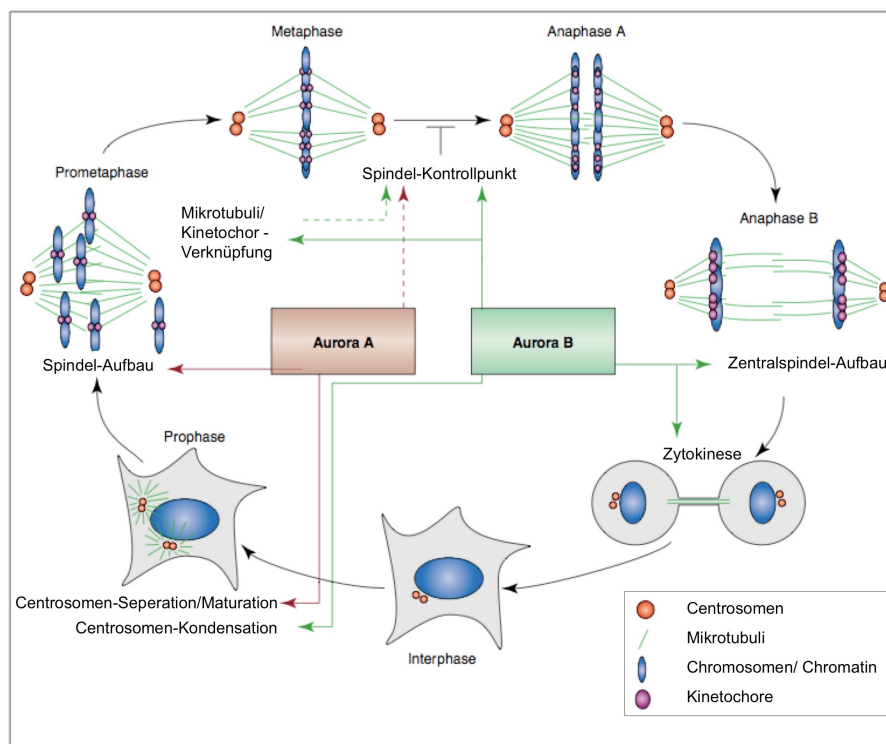


Abb. 4: Schematische Darstellung der Aurora Kinasen vermittelten Zellzyklus-Funktionen. Aurora Kinasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation mitotischer Prozesse (nach Meraldi et al. 2004)

Dieser Spindelkontrollpunkt sichert die korrekte Verteilung der Chromosomen auf Mutter- und Tochterzelle und verhindert somit somatische Chromosomenaberrationen als Folge unvollständiger Trennung.

Einer der Hauptfunktion von Aurora A ist die Regulation des Eintritts in die Mitose. Sie nimmt dabei Einfluss auf den Cyclin B1-Cdk1-Komplex, auch *Mitosis promoting factor* (MPF) genannt. Er ist nur am G₂/M-Übergang aktiv und ist für einen kontrollierten Mitose-Eintritt von großer Bedeutung (Minshull et al. 1989; Ohi et al. 1999). Diese punktgenaue Aktivierung wird unter anderem durch regulierte CDK-1 Phosphorylierung erreicht. Während CDK-1 in der Interphase durch Phosphorylierung der Kinase Wee1 gehemmt wird, überwiegt am G₂/M-Übergang die Aktivität der Cdc25B-Phosphatase. Letztere überführt CDK-1 durch Entfernung der inhibierenden Phosphatreset in den aktiven Zustand (Heald et al. 1993; Borgne et al. 1996). Aurora A phosphoryliert und aktiviert Plk-1 (*Polo-like Kinase 1*) in der G₂-Phase des Zellzyklus (Macurek et al. 2008; Seki et al. 2008). Plk-1 ihrerseits induziert nun die Aktivierung der Cdc25B-Phosphatase und dadurch die Dephosphorylierung von Cdk-1. Zusätzlich vermittelt sie die Degradation der Cdk-1-Inhibitor-Kinase Wee1 (van Vugt et al. 2004). Beide Vorgänge münden in der Aktivierung des MPF. Darüber hinaus ist auch die direkte Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25B durch Aurora A beschrieben worden (Dutertre et al. 2004; Cazales et al. 2005). Somit ist Aurora A an dem zeitlichen Ablauf der Mitose sowohl direkt als auch indirekt beteiligt. Ferner unterstützt Aurora A die Centrosomenmaturation durch Rekrutierung verschiedener Proteine des peritubulären Materials (Toji et al. 2004; Abe et al. 2006; Barr et al. 2007; Mori et al. 2007) sowie die Centrosomen-Separation durch Phosphorylierung von EG5, ein kinesinähnliches Motorprotein (Giet et al. 1999). Als Bestandteil des EXTAK-Multiprotein-Komplex ist für Aurora A zudem die Partizipation an Aufbau und Stabilität der mitotischen Spindel beschrieben worden (Pollard et al. 2009). Fehlfunktion bzw. Verlust einer Komplexkomponente bedingt die Ausbildung multi- bzw. monopolarer Spindeln (Glover et al. 1995; Liu et al. 2006). In Aurora A knockout-Mäusen führten diese gravierenden Störungen der Mitose bereits in der frühen Phase der Embryogenese zum Tode (Lu et al. 2008).

Aurora B ist katalytische Komponente des *chromosomal passenger complex* (CPC), dem zentralen Regulator der Chromosomensegregation. Darüber hinaus

ist der CPC nicht nur an der Chromosomenkondensation und der anschließenden chromosomalen Bi-Orientierung sondern auch am Spindelkontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint* = SAC) sowie am Abschluss der Zytokinese beteiligt. (Honda et al. 2003; Vader et al. 2006; Ruchaud et al. 2007a). Er ist damit für korrektes Durchlaufen und vollständiger Beendigung der Mitose essentiell (Pollard et al. 2009). Dieser „Wächter der Zellteilung“ setzt sich insgesamt aus vier Komponenten zusammen: Aurora B, Survivin, INCENP (*inner centromer protein*) und Borealin (Adams et al. 2000; Bolton et al. 2002; Honda et al. 2003; Gassmann et al. 2004; Ruchaud et al. 2007b). Die nicht katalytischen Komponenten regulieren hierbei Aktivität und Lokalisation von Aurora B (Vader et al. 2006). Dieses Zusammenspiel ist für die Funktion des Komplexes essentiell. Verlust einer dieser Komponente resultiert in Fehllokalisierung der anderen und Unterbrechung des Mitose-Durchlaufs (Ruchaud et al. 2007b). Außerdem ist Aurora B durch Phosphorylierung von Histon 3 für eine klassische Chromatinmodifikation in der Mitose verantwortlich und trägt damit zur Kondensation der Chromosomen bei. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für Segregation und Duplikation der DNA. Aurora B phosphoryliert Histon 3 an Serin 10 und Serin 28 (Giet et al. 2001a; Goto et al. 2002). Erstere wird dabei als Biomarker für Aurora B Aktivität in-vitro und in-vivo eingesetzt (Carpinelli et al. 2008; Foran et al. 2008). Im Rahmen der Chromosomensegregation unterstützt der CPC und damit Aurora B die Zelle sowohl bei der Stabilisierung von korrekten, amphitelischen Verknüpfungen zwischen Kinetocher und Spindelfasern als auch bei der Destabilisierung abnormer synthetischer oder merotelischer Verbindungen. Unbesetzte Kinetochere aktivieren den Spindelkontrollpunkt, der ein Fortsetzen der Mitose so lange blockiert (Mitose-Arrest), bis alle Kinetochere korrekt amphithelisch mit Mikrotubuli-Spindeln besetzt sind (Rieder et al. 1995; Bharadwaj et al. 2004; Musacchio et al. 2007). Darüber hinaus konnten zahlreiche Versuche zeigen, dass Aurora B Aktivität für einen effizienten Austritt aus der Anaphase und eine erfolgreiche Zytokinese unerlässlich ist (Terada et al. 1998; Severson et al. 2000; Adams et al. 2001; Giet et al. 2001a; Ditchfield et al. 2003). Verlust der Aurora B Aktivität resultiert in einem Mitose-Austritt der Zelle ohne stattgefundene Teilung. Dies führt zu Zellen mit großen, polyploiden Nuklei aufgrund multiplen DNA-Kopien (Kawasaki et al. 2001).

Über Aurora Kinase C ist wenig bekannt. In somatischem Gewebe finden sich eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu Aurora A und B. Eine Ausnahme stellt der Hoden dar. Hier finden sich deutlich höhere Spiegel (Bernard et al. 1998; Kimura et al. 1999). Während der Mitose zeigt sich für Aurora C ein ähnlicher dynamischer Lokalisationsprozess wie für Aurora B. Es wird deshalb angenommen, dass auch Aurora C ein CPC-Protein ist, das mit Aurora B colokalisiert und mit INCENP, Survivin und Borealin interagiert (Li et al. 2004; Sasai et al. 2004). Demnach überschneiden sich die Funktionsbereiche von Aurora B und C.

1.2.4 Die Bedeutung der Aurora Kinasen in der Karzinogenese

Seit 1998 Überexpression von Aurora A in verschiedenen humanen Tumorgeweben nachgewiesen werden konnte, sind diese Kinasen in den Fokus der Krebstherapie gerückt (Bischoff et al. 1998). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Überexpression von Aurora A mit Zentrosomen-Amplifikationen, Defekten in der mitotischen Spindelausbildung sowie fehlerhafter Chromosomentrennung vergesellschaftet ist und damit im direktem Zusammenhang mit erhöhter chromosomaler Instabilität, Aneuploidie und schlechter Prognose steht (Zhou et al. 1998; Miyoshi et al. 2001). In-vitro führte Aurora A-Überexpression zur neoplastischen Transformation von NIH3T3-Fibroblasten, wodurch deren onkogenes Potential bestätigt werden konnten (Bischoff et al. 1998). In humanen Zellen scheint dagegen neben Aurora A-Überexpression auch eine Kollaboration mit dem Onkogen Ras für die Transformation der Zellen notwendig zu sein (Tatsuka et al. 2005). Ferner ist ein enger funktioneller Zusammenhang zwischen Aurora A und dem Tumorsuppressor p53 beschrieben worden, der vor allem im Hinblick auf Zellviabilität und Tumorgenese interessant ist. Einerseites kann p53 sowohl über sein Zielprotein GADD45a (*growth arrest and DNA damage inducible gene 45a*) als auch über direkte Interaktion mit der katalytischen Domäne von Aurora A deren onkologische Aktivität supprimieren (Chen et al. 2002b; Shao et al. 2006). Andererseits phosphoryliert Aurora A p53 an Serin 315, fördert dadurch dessen MDM2-vermittelte Degradation in transformierten Zelllinien und inaktiviert darüber hinaus durch Phosphorylierung an Serin 215 dessen transkriptionelle Aktivität (Katayama et al. 2004; Liu et al. 2004). Entsprechende Untersuchungen

haben gezeigt, dass funktionale Dysbalancen zwischen Aurora A und p53 chromosomale Instabilität und Karzinogenese begünstigen (Meraldi et al. 2002; Katayama et al. 2004; Mao et al. 2007). So konnte Hochregulation von Aurora A in Tumoren von p53-defizienten Mäusen beobachtet werden, vermittelt durch reduzierte Expression des p53-abhängigen Tumorsuppressorgens FBXW7 (Meraldi et al. 2002; Mao et al. 2004; Perez-Losada et al. 2005). Weiterführende Versuche zeigten sogar, dass in diesem Kontext durch Inhibition von Aurora A ein Wachstumsvorteil ausgelöst werden kann (Mao et al. 2007). Eine Berücksichtigung des p53-Status scheint damit beim Einsatz von Chemotherapeutika mit Angriffspunkt an den Aurora Kinasen unabdingbar zu sein. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass neben Aurora A auch Aurora B in Prozesse der Karzinogenese integriert ist. So gelang bei einer Vielzahl aggressiver Tumoren der Nachweis von Aurora B-Überexpression (Tatsuka et al. 1998; Ota et al. 2002). Aurora B vermag es jedoch nicht Zellen direkt zu transformieren, sondern induziert Transformationsvorgänge über das Onkogen Ras (Kanda et al. 2005).

1.3 Aufgabenstellung

Durch den Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib ist die Therapie der Bcr-Abl positiven chronischen myeloischen Leukämie revolutioniert worden. Seitdem wird jedoch auch zunehmend Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib beobachtet, insbesondere in den fortgeschrittenen Krankheitsphasen. Während ein Teil dieser Resistenzmutationen durch Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation überwunden werden können, wird deren Einsatz durch einige hoch resistente Mutationen wie die Bcr-Abl/T315I Mutation limitiert. Auf der Suche nach neuen potenten Wirkstoffen gegen TKI-resistente Zellen konnten Substanzen identifiziert werden, deren Aktivität sich nicht nur gegen Bcr-Abl sondern auch gegen die Zellzykluskinasen Aurora A, B und C richtet. Präklinische Daten mit verschiedenen dieser Aurora Kinase Inhibitoren zeigten eine profunde Hemmung des Tumorwachstums in einer großen Auswahl von Modellsystemen (Harrington et al. 2004; Wilkinson et al. 2007; Benten et al. 2009; McLaughlin et al. 2009). Anhand im Anschluß durchgeführter Phase I-Studien konnte dies größtenteils auf zytostatische Effekte der Aurora Kinase Inhibitoren zurückgeführt werden. Während in soliden Tumoren das Erreichen einer Krankheitsstabilisierung das beste Ergebnis darstellte, konnte in Bcr-Abl positiven, vorbehandelten Leukämiepatienten mit Nachweis der hoch resistenten T315I-Mutation mit Hilfe des Aurora Kinase Inhibitors MK-0457 (VX-680) zum ersten Mal eine klinische Remission erzielt werden (De Jonge et al. 2006; Rubin et al. 2006; Giles et al. 2007; Jones et al. 2007). Dies ließ Aurora Kinase Inhibitoren in den Fokus der CML-Therapie rücken (Gautschi et al. 2008; Keen et al. 2009; Kitzen et al. 2009; Pollard et al. 2009; Dar et al. 2010). Nicht vollkommen geklärt werden konnte allerdings, ob die selektive Inhibition von Aurora Kinasen, die Multi-Kinase Inhibition oder beides in Kombination für die therapeutische Aktivität dieser Wirkstoffklasse bei Leukämie verantwortlich ist. Diese Frage soll anhand eines murinen Zellmodells für die Bcr-Abl positive CML unter Verwendung zweier neuer, bereits in klinischen Phase I bzw. II-Studien angewendeten Substanzen dieser Wirkstoffklasse, PHA-739358 und AS-703569, beantwortet werden.

Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Im ersten Teil der Arbeit sollten die Multi-Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber Aurora Kinasen und Bcr-Abl im murinen Zellmodell charakterisiert und verglichen werden. Dies erfolgte unter der Verwendung IM-sensitiver Bcr-Abl positiver Zelllinien (Bcr-Abl/wt) sowie ausgewählter IM-resistenter Bcr-Abl-Mutanten: T315I, Y253H, Y253F und F317L. Auswahlkriterium waren sowohl Häufigkeit der Mutation als auch Panresistenz gegenüber mehreren TKIs (Apperley 2007b; Apperley 2007a). Zur Bestimmung der Aktivität dieser Substanzen in Bcr-Abl transformierten Zellen wurden Untersuchungen von Proliferation, Bcr-Abl- und Aurora Kinasen-vermittelter Phosphorylierungen, Induktion von Apoptose sowie durch Zellzyklusanalysen durchgeführt.

2. In einem nächsten Schritt wurde zur verlässlichen Targetvalidierung ein Zellsystem entwickelt, in dem durch gezieltes Einbringen von Resistenzmutationen die Bindung der hier verwendeten Inhibitoren an Aurora A, Aurora B oder Bcr-Abl selektiv blockiert werden konnte. Anschließend wurde anhand von Proliferationsassays, Änderungen der IC_{50} -Werte und kinasenspezifischer Phosphorylierungsniveaus sowie Zellzyklusanalysen die Auswirkungen dieser Mutanten auf die in-vitro Effekte der Multi-Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 analysiert. Auf diese Weise sollte die Relevanz der Aurora Kinase sowie der Bcr-Abl Inhibition im Hinblick auf die biologischen Effekte differenziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bromdesoxyuridin (BrdU)	BD-Pharmingen, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Lysozym	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Naphthol Blauschwarz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ribonuklease (RNase)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt

SuperSignal West Pico, Dura und Femto	Perbio Science, Berlin
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

2.1.2 Medien und Supplemente

2-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Amaya® Nucleofector® Kits	Lonza Cologne, Köln
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
DMEM, Zellkulturmedium	PAA Laboratories, Cölbe
FCS Gold	PAA Laboratories, Cölbe
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
L-Glutamin, 200 mM	PAA Laboratories, Cölbe
Lipofectamine™ 2000, Transfektions- reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Murines, rekombinantes Interleukin (mIL)-3	R&D Systems, Wiesbaden
Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Adrich Chemie, Deisenhofen
Puromycin Dihydrochlorid	Calbiochem, Darmstadt
RPMI 1640, Zellkulturmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	PAA Laboratories, Cölbe

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme

<i>FastDigest® BamHI</i> , 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>FastDigest® EcoRI</i> , 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>FastDigest® Sall</i> , 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>FastDigest® XhoI</i> , 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot

Polymerase

<i>Pfu DNA- Polymerase</i> 2,5 U/ μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA- Polymerase</i> 2 U/ μl	Finnzymes Oy, Espoo
Taq DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Topoisomerase I	Invitrogen, Karlsruhe

Alkalische Phosphatase

<i>CIAP</i> , 20-30 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
--------------------------	-----------------------

Ligase

T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
---------------	-------------------------

2.1.4 Antikörper

E, <u>E</u> sel	K, <u>K</u> aninchen	M, <u>M</u> aus	Z, <u>Z</u> iege
Anti-Abl (8E9)	M	BD Pharmingen, Heidelberg	
Anti-Aurora A Kinase	M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Anti-Auora B	K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Anti-β-Aktin (AC-15)	M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Anti-BrdU, FITC-konjugiert	M	BD-Pharmingen, Heidelberg	
Anti-Flag (M2)	M	Stratagene, Heidelberg	
Anti-Kanninchen IgG, HRP-konjugiert	E	Amersham, Braunschweig	
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	E	Amersham, Braunschweig	

Anti-Phospho-Histon H3 (Ser10)	K	Cell Signaling, Frankfurt/ Main
Anti-Phospho-STAT5 A/B (18E5),	M	Wheeler, Hamilton, New Zealand (Wheeler et al. 2001)
Anti-Phospho-Tyrosin (4G10)	M	Upstate Biotechnology, New York
Anti-Phospho-Tyrosin (pY20)	M	PharMingen, San Diego, USA
Anti-Phospho-STAT5 A/B (18E5),	M	Wheeler, Hamilton, New Zealand (Wheeler et al. 2001)
Anti-STAT5 (C-17)	K	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.5 Kinaseninhibitoren

AS-703569	(1R,2R,3S,4S)-N4-(3- aminocarbonylbicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-yl)-5-fluoro-N2-[(3-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)]phenyl-2,4-pyrimidinediamin Benzoate (EMD Serono, Inc. Rockland, MA, USA)
PHA-739358	N-[5-(2-Methoxy-2-phenyl-acetyl)-1,4,5,6tetrahydro-pyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4- methylpiperazin -1-yl)-benzamide (Nerviano Medical Sciences, Mailand, Italien)

2.1.6 Zelllinien

Adhärente Zellen:

ΦNX-Eco (Phoenix E)	(Helfervirus-frei); 293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil transfiziert mit Moloney <i>GagPol-IRES-Lyt2</i> Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promoters (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney <i>ecotropic envelope</i> Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promoters (Selektion mit Diphtherietoxin)
---------------------	--

Suspensionszellen:

Ba/F3 murine, IL-3-abhängige Pre-B-Zelllinie, gewonnen aus Balb/C-Mäusen

Die Zelllinie Ba/F3 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Virusverpackungs-Zelllinie Phoenix E bezog unserem Labor von Gary P. Nolan, Stanford, USA.

2.1.7 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM Invitrogen, Karlsruhe

Φ F80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_k^- , m_k^+), phoA, supE44, λ -thi-1, gyrA96, relA1

Epicurian ColiTM XL-1 Blue Supercompetent Cells Statagene, Heidelberg
recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F⁺proAB, lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

One Shot [®]TOP10 Chemically Competent cells Invitrogen, Karlsruhe
F⁺{lacI^q Tn10 (TetR)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)
 Φ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)
7697 galU galK rpsL endA1 nupG

2.1.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM 1kb Plus Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM 1kb Plus Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Vektoren

<u>Name</u>	<u>Resistenzen</u>	<u>Firma</u>
p-Babe-Puro	Ampicillin, Puromycin	Addagene Cambridge, MA, USA
pcDNA 3.1/Zeo (-)	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
pCR®-Blunt II-Topo®	Kanamycin, Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
pCR®2.1-TOPO-Vektor	Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
MSCV MigR1	Ampicillin	J. Miller/ W. Pear, Philadelphia, USA (Pear et al. 1998)

2.1.10 Konstrukte

hAurora-A L210F in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-A L210M in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-A L210Y in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-A G216V in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-B L154M in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-B G160V in pBabe-Puro	diese Arbeit
hAurora-A wt in pEGFP-C1	E. Nigg, Martinsried
hAurora-B wt in pEGFP-C1	E. Nigg, Martinsried
mp185 wt in Mig EGFP	AG Duyster
mp185 F317L in pcDNA3.1/Zeo(-)	AG Duyster
mp185 T315I in pcDNA3.1/Zeo(-)	AG Duyster
mp185 Y253H in pcDNA3.1/Zeo(-)	AG Duyster
mp185 Y253F in pcDNA3.1/Zeo(-)	AG Duyster

2.1.11 Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen in DNA-Konstrukte

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
Aurora A L210F 3'	5'GCTACCAGAGTCTACCTAATTTTCGAATATGCACC-3'
Aurora A L210F 5'	5'GGTGCATATTCGAAAATTAGGTAGACTCTGGTAGC-3'
Aurora A L210M 3'	5'GCTACCAGAGTCTACCTAATTATGGAATATGCACC-3'
Aurora A L210M 5'	5'-GGTGCATATTCATAATTAGGTAGACTCTGGTAGC-3'
Aurora A L210Y 3'	5'-GCTACCAGAGTCTACCTAATTTACGAATATGCACC-3'
Aurora A L210Y 5'	5'-GGTGCATATTCGTAAATTAGGTAGACTCTGGTAGC-3'
Aurora A G216V 3'	5'-GCACCACTTGTAACAGTTTATAGAGAACTTCAG-3'
Aurora A G216V 5'	5'-CTGAAGTTCTCTATAAACTGTTACAAGTGGTGC-3'
Aurora B L154M 3'	5'-CGGAGGAGGATCTACTTGATTATGGAGTATGCC CCC-3'
Aurora B L154M 5'	5'-GGGGGCATACTCCATAATCAAGTAGATCCTCCT CCG-3'
Aurora B G160V 3'	5'-CTAGAGTATGCCCCCGCGTGGAGCTCTACAAG-3'
Aurora B G160V 5'	5'-CTTGTAGAGCTCCACGCGGGGGGCATACTCTAG-3'

2.1.12 Oligonukleotide zur Subklonierung in den p-Babe-Puro Vektor

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
Aurora A 3'	5'-ATATAT GGATCC GCCACC ATG GATTACAAGGAT Überhang BamHI Kozak AurA Flag GACGACGATAAG GACCGATCTAAAGAAAAGTGC Aurora A-Insert ATT TCAGGA-3'

Aurora A 5'	5'-TATATA GTCGAC CTAAGACTGTTTGCTAGCTAG
	Überhang Sall Aurora A-Insert
	TTCTTTGTT-3'
Aurora B 3'	5'-ATATAT GGATCC GCCACC ATG GATTACAAGGAT
	Überhang BamHI Kozak AurB Flag
	GACGACGATAAG GCCCAGAAGGAGAACTCCTAC
	Aurora B-Insert
	CCCTGGCCCC-3'
Aurora B 5'	5'-TATATA GAATTC TCAGGCGACAGATTGAAGGGC
	Überhang EcoRI Aurora B-Insert
	AGAGGGAGG-3

Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon, Ebersberg* synthetisiert.

2.1.13 Molekularbiologische Kitsysteme zur Bearbeitung von DNA/Proteinen

BioRad Protein Assay	BioRad, München
CellTiter® AQueous Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
NucleoBond® Plasmid Maxi Kit	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid Kit	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
QuickChange® Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Topo TA-Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.14 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Entwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inkubator-Schüttler Certomat® BS-1	Braun, Melsungen
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät CB162	Carl Stuart Limited, Dublin, Irland
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi- Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab®	WTW, Weilheim
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydewang, Dänemark
Stromgenerator, PowerPac 200	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Megafuge R 1.0	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.1.15 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach)	50 mg/ml in A.d.
Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% Naphtol Blauschwarz 25 % Isopropanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	10% Essigsäure 10% Methanol in A.d.
Aprotinin (100-fach)	0,2 mg/ml in Isopropanol
DNA-Probenpuffer (10-fach)	50% Glycerol 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer	0,1% BSA in PBS
Kanamycin-Stammlösung (500-fach)	30 mg/ml in A.d.
Luria-Bertani (LB)-Medium (flüssig)	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
LB-Medium (fest)	1,5% Bactoagar in LB-Medium (flüssig)

Lysis-Puffer	10 mM Tris/ HCL (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tbl. ad 10 ml A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach)	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Gelelektrophorese-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach)	1 M Tris/ HCL (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
Stripping-Puffer	0,2 M NaOH
TAE-Puffer (10-fach)	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8,0) in A.d

Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach)	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der von Karl Mullis 1986 beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente in-vitro selektiv und in großen Mengen vervielfältigt werden (Mullis et al. 1986). Grundlage dafür ist die Fähigkeit von thermostabilen DNA-Polymerasen, DNA-Stränge durch semikonservative Replikation zu verdoppeln. Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die zu vervielfältigende DNA-Matrize (*Template*) auf über 90°C erhitzt, um die zu diesem Zeitpunkt als Doppelstrang vorliegende DNA durch Öffnen der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Anschließendes Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 40°C bis 65°C ermöglicht es den eingesetzten Startermolekülen spezifisch an ihre festgelegte Zielregion zu hybridisieren (*annealing*). Als Startermoleküle dienen synthetische DNA-Oligonukleotide (*Primer*), welche die zu amplifizierende Region kontingentieren. Die richtige Anlagerungstemperatur ist ein kritischer Parameter der Reaktion und hängt von Länge und Sequenz der eingesetzten Primer ab. Unter Verwendung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) synthetisiert die DNA-Polymerase in einem nächsten Schritt entlang der DNA-Matrize einen neuen, an die gebundenen Primer anknüpfenden DNA-Doppelstrang. Dazu wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms (72°C) angehoben. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird eine exponentielle Amplifikation der Matrize erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit kommt eine thermostabile, aus dem marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* stammende *Pfu*-Polymerase zum Einsatz. Ihr Vorteil gegenüber der *Taq*-Polymerase besteht darin, dass sie neben der 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 3'→5'-Exonuclease-*Proofreading*-Funktion aufweist. Dadurch können am 3'-Ende falsch eingebaute Nukleotide entfernt und stattdessen das richtige Nukleotid eingebaut werden. Folge ist eine zwölfmal höhere Genauigkeit der DNA-Synthese verglichen mit der *Taq*-Polymerase.

Die Durchführung der PCR erfolgt in einem Thermozykler, der durch ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm automatisch gesteuert wird.


Neben der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente können mittels PCR auch Mutationen in Form von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen an doppelsträngiger DNA vorgenommen werden.

2.2.1.2 PCR-Mutagenese

Zur gerichteten Mutagenese wurde das „*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*“ verwendet. Es handelt sich dabei um ein PCR-System, das aus zwei komplementäre Oligonukleotid-Sequenzen besteht, welche in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen und von unmodifizierten Nukleotidsequenzen beidseits flankiert werden. Optimale Primer weisen meist eine Länge von 25 bis 40 Basenpaaren, einen GC-Anteil von mindestens 40% sowie eine Schmelztemperatur von 78°C auf. Da sich die gegensätzlich orientierten Mutations-Primer an der gleichen Stelle im Plasmid anlagern, werden folglich nur ringförmige Matrizen effizient amplifiziert.

PCR-Ansatz:	34,0 µl	A.d.
	10,0 µl	10x Reaktionspuffer
	1,0 µl	dNTP-Mix
	1,0 µl	3'-Primer (1:10)
	1,0 µl	5'-Primer (1:10)
	1,0 µl	ds DNA-Template
	1,5 µl	DMSO
	0,5 µl	<i>Pfu</i> - DNA-Polymerase

Im ersten Zyklus erfolgt die Denaturierung über eine längere Zeit im Vergleich zu den restlichen Zyklen (Initialisierung) um sicherzustellen, dass sich sowohl alle Matrizenmoleküle als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Zum Schluss folgt ein drei- bis fünfminütiger Polymerisationsschritt um der Polymerase die Vervollständigung der synthetisierten DNA-Stränge zu ermöglichen. Die Anzahl der Zyklen ist abhängig von der einzuführenden Mutationsart.

PCR-Programm:	1x	95 - 98° C	2 min	
	18x		95 - 98° C	30 sec (Denaturierung)
			58 - 61° C	1 min (Hybridisierung)
			72° C	3-5 min (Polymerisation)
	1x	72° C	6 min	

Alternativ dazu wird eine *2-Step-Mutagenesis* durchgeführt. Dazu wird die erste PCR-Reaktion analog zu den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Einzig die Primer unterscheiden sich. Statt zwei komplementär zueinander gestaltete Mutations-Primer zu verwenden, die an der gleichen Vektorstelle binden, werden Primer eingesetzt, die sich an unterschiedlichen Positionen im Vektor anlagern. Der erste Primer bindet im Anfangsbereich des zu amplifizierenden Gens, der zweite im Bereich der einzuführenden Mutation. Dadurch wird der eingegrenzte Bereich inklusiv der eingebrachten Mutation vervielfältigt. In einer zweiten PCR-Reaktion wird anschließend das 1.PCR-Produkt als Mutations-Primer eingesetzt. Durch Verwendung eines dazu gegensätzlichen Mutations-Primers wird der gesamte Plasmid amplifiziert.

1.PCR-Ansatz: siehe oben

2.PCR-Ansatz:

5,0 µl	A.d.
10,0 µl	10x Reaktionspuffer
1,0 µl	dNTP-Mix
30,0 µl	3'-Primer (Produkt der 1.PCR-Reaktion)
1,0 µl	5'-Primer (1:10)
1,0 µl	ds DNA-Template
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	<i>Pfu</i> - DNA-Polymerase

1.PCR-Programm:	1x		95° C	2 min	
	18x	}	95° C	30 sec	(Denaturierung)
			61° C	1 min	(Hybridisierung)
			72° C	1 min	(Polymerisation)
	1x		72° C	4 min	
2.PCR-Programm:	1x		98° C	2 min	
(≙ PCR-Pro-	42x	}	98° C	20-30 sec	(Denaturierung)
ogramm für die			61° C	1 min	(Hybridisierung)
Klonierung)			72° C	20-30 sec	(Polymerisation)
	1x		72° C	3 min	

Nach Ablauf der gesamten Reaktion sollten alle Amplifikate die durch die eingesetzten Primer vorgegebene Mutation aufweisen. Mittels PCR vervielfältigte DNA-Moleküle liegen im Gegensatz zu in-vivo amplifizierten DNA-Plasmiden nicht-methyliert vor. Um die methylierte, unmutierte Matrizen-DNA aus dem Gemisch zu entfernen, wird dieses mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Enzym schneidet spezifisch methylierte DNA und trägt dadurch zu deren Elimination bei. Im Anschluss erfolgt die Aufreinigung der mutierten Plasmid-DNA mit Hilfe des „QuickChange® Spin Purification Kit“. Für die Transformation des PCR-Ansatzes werden die hitzekompetenten Bakterien *Epicurian Coli™ XL1-Blue Supercompetent Cells* eingesetzt. Dieser Bakterienstamm zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, den in den amplifizierten Plasmiden im Bereich der ehemaligen Polymerase-Anheftungstelle vorliegenden kurzen Einzelstrangabschnitt (*nick*) zu reparieren. Darüber hinaus ist dieser Stamm nicht mit den Restriktionsenzymen ausgestattet, die für den Abbau nicht-methylierter DNA notwendig wären. Zur Überprüfung der korrekt abgelaufenen Mutagenese wird von der Firma *GATC-Biotech, Konstanz* eine Sequenzanalyse durchgeführt.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (10-fach): 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA (pH 8,0) in A.d.

DNA-Probenpuffer (10-fach): 50% Glycerol, 0,5% Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Identifizierung, Aufreinigung sowie zur analytischen und präparativen Auftrennung linearer DNA-Fragmente. Die unter gelelektrophoretischen Bedingungen negativ geladenen Phosphatreste in den DNA-Molekülen ermöglichen bei Anlage eines elektrischen Feldes deren Wanderung zur Anode und damit deren Auftrennung. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur angelegten Spannung. Die Beweglichkeit der DNA-Fragmente ist weitgehend abhängig von der Molekülgröße bzw. -länge. Zur Gel-Herstellung wird Agarose verwendet, ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid. Nach Aufkochen in Pufferlösung bildet es eine Matrix aus, die kleine DNA-Fragmente schneller und leichter durch sie hindurch wandern lässt als größere. Durch Variation der Agarosekonzentration können unterschiedliche Trennbereiche hergestellt werden. Während hochprozentige Gele (1,5-2%) zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (<500 bp) herangezogen werden, eignen sich niedrigprozentige Gele (0,5-1%) besser zur Separation größerer DNA-Fragmente (>1000 bp). Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wird das Gel mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise Ethidiumbromid versetzt. Dieser lagert sich zwischen die Basenpaare der DNA ein. Ferner besitzt er die Eigenschaft nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm zu fluoreszieren. Auf diese Weise können die DNA-Fragmente als Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, ist der gleichzeitige Einsatz eines Größenstandards (DNA-Molekulargewichtsmarker) bei der gelelektrophoretischen Trennung erforderlich.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird TAE-Puffer mit Agarose versetzt und das Gemisch anschließend vorsichtig so lange erhitzt bis die Lösung sich klar und schlierenfrei darstellt. Nach Abkühlung auf 50°C erfolgt die Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Anschließend wird die Masse auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen und polymerisiert innerhalb von 45 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur aus. Das ausgehärtete Gel

wird in eine mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt und die DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung von 20 bis 120 V aufgetrennt.

2.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel wird die korrelierende DNA-Bande zunächst unter UV-Licht identifiziert und anschließend mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten. Um Veränderungen der DNA wie Strangbrüche und Dimerbildung zu vermeiden, wird eine UV-Lichtquelle mit geringer Bestrahlungsstärke gewählt und zuzüglich die Expositionszeit der DNA unter dem UV-Licht möglichst gering gehalten. Nach Anleitung des „*NucleoSpin® Extract II Kit*“ erfolgt die Extraktion der DNA aus der Agarose. Für die Elution der DNA von der Säule werden 30 µl A.d. verwendet. Gleiche DNA-Proben werden dabei über eine Säule eluiert, um die Konzentration zu erhöhen. Die DNA wird bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann photometrisch durch Messung der Extinktion (E) bei 260 nm bestimmt werden (Sambrook et al., 1989). Die optische Dicke ist bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter und einer Wellenlänge von 260 nm dann gleich eins, wenn doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 µg/ml vorliegt. Wird zusätzlich das bei 280 nm liegende Absorptionsmaximum von Proteinen bestimmt, kann Auskunft über die Reinheit der DNA gegeben werden. Das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm gilt als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure. Je größer der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem (E_{280}) Signal ist, desto reiner und dementsprechend hochwertiger ist die DNA-Probe. Liegt der Wert zwischen 1,7 und 2, ist von einer reinen Nukleinsäurelösung auszugehen. Werte unter 1,7 weisen auf eine Verunreinigung der Probe durch Pufferkomponenten oder Proteine hin. Qualitätsprüfung und Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben erfolgten mit dieser Methode.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Bakterielle Endonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und spalten den DNA-Doppelstrang an spezifischen Stellen innerhalb oder in der Nähe dieser Erkennungssequenzen. Sie ermöglichen somit die sequenzspezifische Fragmentierung doppelsträngiger DNA (Sambrook et al. 1989). In Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym können stumpfe Fragmentenden (*blunt ends*) oder homologe kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in *Units* (U) angegeben. Eine *Unit* entspricht dabei der Menge an Restriktionsenzym, die für die vollständige Fragmentierung von 1 µg Lambda-DNA innerhalb einer Stunde benötigt wird. Zur Sicherstellung eines quantitativen Ablaufs des Restriktionsverdaus sollten die Endonukleasen im Überschuss zugesetzt werden. Zur Spaltung der DNA wird diese zusammen mit dem entsprechenden Restriktionsendonukleasen und dem dazugehörigen Reaktionspuffer bei optimaler Reaktionstemperatur nach Herstellerangaben inkubiert. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich *FastDigest®*-Restriktioneenzyme verwendet worden sind, erfolgt die Inkubation bei 37°C für 15 min.

Anschließend werden die Enzyme durch Aufreinigung im Agarosegel aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

2.2.1.7 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Wird ein Plasmid nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten, finden sich am linearisierten Vektor identische Restriktionserkennungssequenzen am 5'- und 3'-Ende der DNA. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert, ohne den Einbau des Restriktionsfragmentes vorzunehmen. Durch Dephosphorylierung am 5'-Ende der Vektor-DNA wird die alleinige Zirkularisierung des Vektors unterbunden. Folglich ist nur noch eine Ligation zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen der Fremd-DNA in dem 3'-OH-Ende des Vektors möglich, was in einer deutlichen Effizienzsteigerung des Klonierungsprozesses resultiert. Durchgeführt wird die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe von der aus Schrimps gewonnenen alkalischen Phosphatase CIAP. In der Regel wird diese Reaktion direkt im

Reaktionsansatz vollstreckt, indem dieser mit 10x Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (Subklonierung)

DNA-Ligasen katalysieren bezüglich DNA-Fragmenten die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Endes und der 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Endes. Dadurch kann die linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA zu einem rekombinanten DNA-Molekül kovalent verknüpft werden (Sambrook et al. 1989). Bei der hier verwendeten T4-Ligase handelt es sich um eine ATP-abhängige Ligase. Das molare Verhältnis von Insert und Vektor sollte idealer Weise 3:1 betragen. Die Konzentration der eingesetzten DNA wurde daher zuvor entweder photometrisch oder durch Agarosegelelektrophorese mit Mengenstandards bekannter Konzentration bestimmt. Die Ligation wurde gemäß des Standard-Protokolls des „*Rapid DNA Ligation Kits*“ durchgeführt. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor, jedoch ohne einzuführende Fremd-DNA. Die rekombinante DNA kann anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien herangezogen (siehe Kapitel 2.2.2.3) oder bei -20°C gelagert werden.

Zur Berechnung des Ligation-Ansatzes wurde folgende Formel verwendet:

$$ng\ Insert = \frac{ng\ Vektor \times kb\ Insert}{kb\ Vektor} \times \frac{3}{1}$$

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten mittels TOPO® Cloning

PCR-Produkte können mit Hilfe von „*TOPO® Cloning Kits*“ kloniert werden. Die im Kit enthaltenen Vektoren liegen bereits in linearisierter Form vor. Darüber hinaus weisen sie 3'-Thymidin-Überhänge auf, an welchen eine Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Dadurch wird die Selbstligation des Vektors verhindert. Bei der Topoisomerase I handelt es sich um ein aus dem *Vaccinia Virus* stammendes Enzym, das neben Restriktionsendonukleaseaktivität auch eine Ligaseaktivität besitzt. Bei Anwesenheit kompatibler Taq-amplifizierter PCR-Produkte können

diese aufgrund ihres Adenosin-Überhanges direkt in den offenen Vektor hinein ligiert werden. Die Ligationsreaktion wird dabei durch die Topoisomerase I vermittelt (Shuman 1994). Folglich ist keine zusätzliche Ligase erforderlich. Die Ligationsreaktion wird entsprechend dem Protokoll des „*Topo TA-Cloning® Kit*“ bzw. des „*Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit*“ bei Raumtemperatur innerhalb von 5 min durchgeführt. Nach erfolgter Ligation diffundiert die Topoisomerase I vom Molekül ab. Die rekombinante DNA kann nun für die Transformation von *Top10F' One Shot™ Chemically Competent cells* eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kulturbedingungen

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach): 50 mg/ml in A.d.; sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung (500-fach): 50 µg/ml in A.d.; sterilfiltriert

Zur Kultivierung von Bakterien wurden sowohl LB-Agarplatten als auch flüssiges LB-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Flüssigkulturen wurden während dessen mit 250 Upm geschüttelt. Die Anzucht einer Bakterienkultur findet in Gegenwart eines Antibiotikums statt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass nur Bakterienzellen wachsen, die ein Resistenzvermittelndes Plasmid aufgenommen haben.

2.2.2.2 Kompetente Bakterien

Unter kompetenten Bakterien versteht man Bakterienzellen, deren Zellwand durch chemische oder physikalische Behandlung durchlässiger gemacht worden ist. Dadurch können sie zirkuläre Fremd-DNA effizienter aufnehmen als herkömmliche Bakterienzellen. Um diese Fähigkeit zu erhalten, müssen diese Bakterien bei -80°C gelagert und schonend auf Eis aufgetaut werden. Die hier verwendeten Bakterienstämme *DH5α™*, *Epicurian Coli™ XL-1 Blue* und *Top10F* sind bereits kompetent erworben worden.

2.2.2.3 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,55% Bacto-Hefeextrakt; 0,5% 1 M NaCl; 0,5% 1 M KCL in A.d.
mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt; autoklaviert
1% 2 M Glucose (frisch zugegeben); 1% 2 M MgCl₂ (frisch zugegeben); sterilfiltriert

Transformation durch kurzzeitige Hitzebehandlung bezeichnet einen Vorgang, bei dem Vektor-DNA gezielt in chemisch kompetente Zellen eingebracht wird. Dazu werden 50 µl eines kompetenten Bakterienstammes auf Eis vorsichtig aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz oder 2 µl Plasmid-DNA (Retransformation) versetzt, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien je nach Art für 30-45 sec bei 37°C-42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die plötzliche Erwärmung ermöglicht das Aufnehmen der Plasmide in die Zellen. Danach folgt eine weitere Inkubationsperiode von 2 min auf Eis bevor die transformierten Bakterien auf LB-Platten mit Ampicillin bzw. Kanamycin ausgestrichen werden können. Erfolgt die Transformation im Rahmen des „*TOPO® Cloning*“ mit *Top10F' One Shot™ Chemically Competent cells*, werden diese zunächst für 1h bei 225 Upm und 37°C in SOC-Medium kultiviert. Nach Zentrifugation bei 3000 Upm wird bis auf 50 µl verworfen. Nach Resuspension des Sediments wird dieses auf LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen. Auf diesem Medium können nur Bakterien wachsen, die als Zeichen einer erfolgreichen Transformation das im Plasmid lokalisierte β-Lactamasegen (vermittelt Ampicillin-Resistenz) oder NptII-Gen (vermittelt Kanamycin-Resistenz) exprimieren. Um die Ausbildung von Satelliten-Kolonien zu vermeiden, sollte die Inkubationszeit bei 37°C 12-16 h nicht überschreiten.

2.2.2.4 Kultivierung von transformierten Bakterien

Zur Anreicherung der durch Transformation gewonnenen Bakterienkolonien werden diese in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz vermehrt. Dazu werden 5 ml Medium mit einem von der Agarplatte stammenden Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (Mini- und Maxi-Präparation)

Von der Firma Machery-Nagel stehen je nach Fragestellung zwei Kits zur Verfügung, die innerhalb kurzer Zeit die einfache Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer flüssigen Bakterienkultur ermöglichen. Zu analytischen Zwecken benötigte kleine Mengen ($< 20 \mu\text{g}$) können mit Hilfe des „*NucleoSpin® Plasmid Kit*“ isoliert werden. Dazu wird ein Klon in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Sediment nach Abnahme des Überstandes entsprechend des Hersteller-Protokolls aufbereitet. Um für eine Transfektion ausreichende Plasmid-DNA-Mengen (bis zu $500 \mu\text{g}$) zu gewinnen, wird das „*NucleoBond® Plasmid Maxi Kit*“ verwendet. Nach Herstellung einer Vorkultur durch Animpfen eines Klons mit 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika und anschließender 1-4 stündiger Inkubation, wird diese zur Expansion zu 200 ml frischen LB-Medium mit Selektionsantibiotika dazu gegeben und wie oben beschrieben über Nacht kultiviert. Die Aufbereitung erfolgt auch hier nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2 nM Glutamin; 2% Penicillin/streptomycin-Lösung; 10% FCS

Zytokin: murines IL-3

Alle verwendeten Zelllinien werden im Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und relativer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Kulturmedien werden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zellkultur betreffende Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt.

Adhärente Phoenix E-Zellen werden mittels DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen oder -platten kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz ist ein Umsetzen der Zellen erforderlich. Da Phoenix E-Zellen erheblich auf eine zu hohe oder zu niedrige Zelldichte reagieren, müssen diese täglich im Verhältnis 1:2 passagiert werden. Dazu wird zunächst das Medium entfernt und die Zellen einmal mit

sterilem PBS gewaschen. Nach Verwerfen des verwendeten PBS wird den Zellen geringe Mengen einer Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt. Es folgt eine Inkubation von 1-5 min bei 37°C. In dieser Zeit werden die Zellen durch enzymatische Aktivität der Trypsin-Protease vom Boden gelöst. Eine genaue Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationszeit ist empfehlenswert, da sonst die Zellen durch Anverdau der Zellmembran geschädigt werden können. Ist mit bloßem Auge ein deutlicher Lösungsprozess sichtbar, werden diese ins Medium aufgenommen und bei 1500 rpm 3 min zentrifugiert. Etwaige Trypsin-EDTA-Überreste werden durch Zugabe des FCS haltigen Mediums direkt inaktiviert. Anschließend werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in der entsprechenden Verdünnung auf neue Kulturflaschen oder -platten verteilt.

Die Suspensionszellen Ba/F3 werden in stehenden Zellkulturflaschen unter Verwendung von RPMI 1640-Kulturmedium und Zusatz von murinem Interleukin 3 (IL-3) in einer Konzentration von 0,2 ng/ml kultiviert. Eine Passagierung der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:10.

2.2.3.2 Kryokonservierung

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zur dauerhaften Lagerung sollten die Zellen vital tiefgefroren werden. Dazu wird etwa 1 ml aus einer dichten Zellsuspension entnommen und in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen an Einfriermedium vermischt. Um sie den Empfehlungen entsprechend annähernd kontinuierlich in einer Rate von 1°C/min abkühlen zu lassen, werden sie zunächst für 12-24 h in einer Ethanolammer bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen werden diese sofort im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Sobald eine Zellsuspension vorliegt, wird diese in Kulturmedium aufgenommen und zur Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Zellsediment in frischem

Kulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in Zellkulturflaschen oder -platten überführt.

2.2.3.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür werden 50 µl einer Zellsuspension mit einer 0,5%-igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt und ein kleiner Tropfen davon in die Zählkammer gegeben. Anhand von Trypanblau lässt sich eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen vornehmen, da ausschließlich letztere den Farbstoff aufnehmen und somit tiefblau erscheinen. Vitale, ungefärbte Zellen zeichnen sich durch eine helle Farbe aus. Ausgezählt werden vier Großquadrate unter dem Mikroskop, wobei nur vitale Zellen berücksichtigt werden. Durch Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Kammerfaktor 10^4 kann die absolute Zellzahl (Zellzahl pro ml Zellsuspension) errechnet werden.

2.2.3.5 Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Man unterscheidet zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transformation) und der dauerhaften Integration in das Genom (stabile Transformation). Durch letzteres werden die gegen Fremd-DNA gerichteten Abbauprozesse umgangen.

Es gibt verschiedene Methoden der Transfektion, die sich nach der Art der zu transfizierenden Zelllinie und der weiteren Verwendung richtet. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Verfahren der Lipofektion und der retroviralen Transduktion angewendet.

2.2.3.6 Transiente Transfektion durch Lipofektion

Lipofectamine™ 2000

Opti-MEM® I

Für die transiente Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E hat sich die Lipofektion bewährt. Dabei wird genetisches Material mittels Liposomen in die Zellen eingebracht. Anhand der verwendeten kationischen Lipide werden die negativ geladenen DNA-Moleküle durch elektrostatische Anziehung in eine kompaktere Struktur überführt. Die Komplexe interagieren aufgrund ihrer äußeren kationischen Ladung und lipophilen Struktur mit der negativ geladen, hydrophoben Membrandoppelschicht der Zellen, verschmelzen mit dieser und werden durch Phagozytose in das Zellinnere aufgenommen. Das gleichzeitige Einschleusen mehrerer Plasmid-Konstrukte wird als Cotransfektion bezeichnet.

Dazu werden am Vortag der Transfektion 2×10^6 Phoenix E-Zellen in 3 ml Kulturmedium auf einer 6 cm Kulturplatte ausplattiert. Am nächsten Morgen werden zur Transfektion in einem ersten Ansatz 500 µl Opti-MEM® I mit 10 µg Plasmid-DNA und in einem anderen Reaktionsgefäß 500 µl Opti-MEM® I mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 vermischt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden beide Ansätze in einem vereinigt und erneut für 20 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Bereits nach einer Inkubationsdauer von 24-48 h im Brutschrank können die Zellen proteinbiochemischen Analysen zugeführt werden. Dazu können sie nach der Ernte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C tiefgefroren werden. Für die Gewinnung von Retrovirus wird das Transfektionsmedium nach 24h gegen ein Kulturmedium ausgewechselt und die Zellen weiter kultiviert.

2.2.3.7 Gewinnung von Retrovirus

Die im Rahmen der Transfektion eingesetzte Virusverpackungszelllinie Phoenix E besitzt die Fähigkeit, auf ein Verpackungssignal im retroviralen, zu transduzierenden Vektor hin retrovirale Partikel zu produzieren und in das Kulturmedium zu sezernieren. Dafür tragen sie ein retrovirales Provirus, das mit den für virale Proteine codierenden Genen ausgestattet ist. Aufgrund des Verpackungssignals kann die in komplementäre RNA umgeschriebene DNA mit

den viralen Proteinen zu vollständigen Viruspartikeln zusammengefügt werden. Durch das ecotrope Oberflächenprotein wird die Spezifität des Virus für ausschließlich murine Zellen bestimmt. Zur Generierung des Retrovirus wird der retrovirale Überstand im Kulturmedium der durch Lipofektion transient transfizierten Phoenix E-Zellen nach 36, 48, 60, und 72 h geerntet und gesammelt. Nach Sterilfiltration mit einem 0,45 µm Zellsieb wird dieser bei 4°C gelagert. Einfrieren und Erwärmen des Virus sollte vermieden werden, da die Hüllproteine empfindlich auf mechanische und thermische Reize reagieren.

2.2.3.8 Retrovirale Transduktion

Retrovirale Transduktion beschreibt die Infektion von Zielzellen mit DNA-Konstrukten unter Verwendung von Retroviren. Charakteristisch für Retroviren ist das Enzym Reverse Transkriptase. Dadurch sind sie in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom in der Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und in das Wirtsgenom stabil und dauerhaft zu integrieren. Die Herstellung der Retroviren erfolgt wie in Kapitel 2.2.3.7 beschrieben. Für die Transduktion muriner Zellen werden etwa 500.000 Zellen in 500 Kulturmedien aufgenommen, mit retroviralem Überstand versetzt und nach Zufügen von 4 µg/ml Polybren 90 min bei 2400 rpm und 32°C zentrifugiert. Das Polykation Polybren erhöht dabei die Transduktionseffizienz durch Verbesserung der Interaktion zwischen zellulärem Virusrezeptor und viralem Oberflächenprotein. Dieser Vorgang wird im Abstand von 12 h dreimal wiederholt. Nach Kultivierung und Expansion der Zellzahl kann der Erfolg der Transduktion durch Western Blot-Analysen überprüft werden.

2.2.3.9 Selektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E

Werden Phoenix E-Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert, besteht die Gefahr, das Provirus und damit die genetische Information für virale Strukturproteine und Enzyme zu verlieren. Um dies zu verhindern, müssen die Zellen regelmäßig alle 4-6 Wochen selektioniert werden. Als Selektionsmarker dienen Resistenz vermittelnde Gene für Hygromycin und Diphtherietoxin in den

proviralen Genen. Dazu wird DMEM-Kulturmedium mit 300 µg/ml Hygromycin und 2 µg/ml Diphtherietoxin versetzt und die Zellen damit eine Woche kultiviert.

2.2.3.10 G₀-Synchronisation von Zellen

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2 nM Glutamin; 2% Penicillin/streptomycin-Lösung; 0,5% FCS

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2nM Glutamin; 2% Penicillin/streptomycin-Lösung; 20% FCS

Um auf den Zellzyklus Einfluss nehmende Prozesse besser analysieren zu können, ist es notwendig, Zellen in spezifischen Phasen des Zellzyklus zu synchronisieren. Dies umfasst einen nahezu vollständigen, aber reversiblen Arrest der Zellen an einem definierten Punkt des Zellzyklus, sowie die vollständige Erholung und das gleichmäßige Durchlaufen des Zellzyklus nach Arrest-Entlassung.

Um die Zellen synchron in die G₁-Phase eintreten zu lassen, werden diese mittels Serumentzugs in der G₀-Phase arretiert. Zellen sind zur Proliferation auf Wachstumsfaktoren angewiesen. Diese sind vor allem im Serum enthalten, das dem Kulturmedium zugesetzt wird. Durch Reduktion der Serummenge von 10% auf 0,5% treten die Zellen nach Beendigung der Mitose in die Ruhe-Phase (G₀-Phase) ein. Sie ist durch eine geringe metabolische Aktivität gekennzeichnet. Da das Vorhandensein der Wachstumsfaktoren nur in den ersten Stunden der G₁-Phase entscheidend ist, werden die Zellen einer Population unabhängig davon, in welcher Phase des Zellzyklus sie sich befinden, diesen zunächst beenden, bevor sie in die G₀-Phase eintreten. Durch Zugabe von Kulturmedium mit 20%-Serum werden die Zellen reaktiviert und der synchrone Wiedereintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus induziert.

Zu diesem Zweck werden 15×10^6 Zellen zweimal mit PBS steril gewaschen, in 10 ml Kulturmedium mit nur 0,5% Serumzusatz aufgenommen und für 72 h kultiviert. Durch die hohe Zelldichte wird das Zellwachstum aufgrund von Kontaktinhibition zusätzlich eingeschränkt. Anschließend werden die Zellen für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen durch Zugabe von Kulturmedium mit 20% Serumgehalt reaktiviert. Der Erfolg der Synchronisation kann mittels statischer oder dynamischer Zellzyklusanalyse durchflusszytometrisch kontrolliert werden.

2.2.4 Biologische Untersuchungen

2.2.4.1 Proliferationsmessungen

Ein Maß für die Proliferation von Zellen ist die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase. Diese kann mit Hilfe des „*CellTiter® AQ_{ueosus} Cell Proliferation Assay*“-Systems unter Verwendung des Substrates MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) quantitativ bestimmt werden. Viable Zellen sind in der Lage, dieses gelbe Substrat zu braunem Formazan zu reduzieren. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 490 nm. Die Menge des Produktes ist bei Absorbtionsmessungen in diesem Wellenlängenbereich direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Für die Proliferationsmessung werden 1×10^4 Zellen in 100 μ l Kulturmedium in einer Flachboden-96-Loch-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Der Leerwert wird in Kavitäten ermittelt, die mit Medium ohne Zellen befüllt sind. Anschließend werden 20 μ l MTS (10mg/ml) pro Loch hinzugefügt und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Absorptionsmessung bei 490 nm.

2.2.4.2 Statische Zellzyklusanalyse und Apoptosemessung

Fixationslösung: 70% Ethanol; 30% PBS

PI-Färbelösung: 25 mg/ml PI; 100 μ g/ml RNase in PBS

Anhand des DNA-Gehaltes von Zellen können Rückschlüsse auf deren Zellzyklusphasen-Verteilung gezogen werden. Während sich Zellen mit einfachem Chromosomensatz (2n) in der G₁-Phase des Zellzyklus befinden, haben proliferierende Zellen in der S-Phase ihren DNA-Gehalt verdoppelt (4n Chromosomensatz) und liegen nun in G₂-Phase oder am G₂/M-Übergang vor (Abb. 5). Die nukleäre DNA kann mittels spezieller, mit der DNA-interkalierender Substanzen wie beispielweise Propidiumiodid (PI) angefärbt und damit quantifiziert werden. Dieser Farbstoff ist fluoreszierend und kann mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Da sich die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt verhält, kann aufgrund der Fluoreszenzintensität der DNA-Gehalt und somit die Zellzyklusphasen-Verteilung

der Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden. Auf diese Weise lässt sich auch Aneuploidie und Apoptose in Zellen identifizieren. Letzteres ist charakterisiert durch Fragmentierung chromosomaler DNA in Bruchstücke von 180 bp oder ein mehrfaches davon. Diese resultieren aus enzymatischer Verdauung der DNA zwischen Histon-Proteinen. Häufig wird auch der Zellkern zerlegt. Durch die Freisetzung dieser Bruchstücke aus der Zelle wird bei DNA-Färbung apoptotischer Zellen ein DNA-Gehalt beobachtet, der kleiner ist als der einer Zelle in G₁-Phase. Man spricht deshalb von Sub-G₁-Zellen. Dem zufolge kann DNA-Färbung auch zur Quantifizierung von Apoptose in einer Zellpopulation eingesetzt werden (Vermees et al. 2000) (Abb. 5).

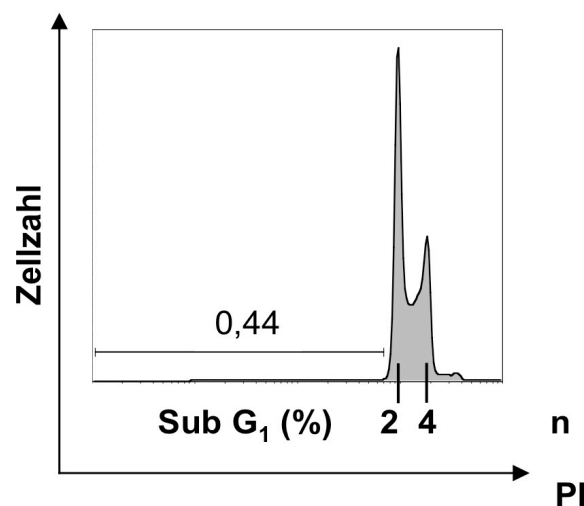


Abb. 5: Statische Zellzyklusanalyse. Durchflusszytometrische Messung nach PI-Färbung. Der erste Gipfel entspricht Zellen mit einfachem Chromosomensatz (2n), die sich in G₁-Phase befinden. Zellen in G₂-Phase oder am G₂/M-Übergang tragen einen verdoppelten Chromosomensatz (4n) und erscheinen im zweiten Gipfel. Quantifizierung von Apoptose erfolgt durch Messung des Sub-G₁-Anteils in der Zellpopulation. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

Anfärben der DNA mittels PI setzt Fixation und Permeabilisierung der Zellen voraus. Erst dann ist der Farbstoff in der Lage, die Zellmembran vitaler Zellen zu überwinden. Dazu werden die geernteten Zellen in eine -20°C kalte, 70%-ige Ethanolösung getropft und über Nacht bei -20°C gelagert. Für die eigentliche Färbung muss zunächst das Ethanol durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200 rpm und anschließendem Absaugen von den Zellen entfernt werden. Ein

Waschschritt mit eisgekühltem PBS stellt die Beseitigung etwaiger Ethanol-Reste sicher. Anschließend werden die Zellen für 30 min bei 37°C und unter Lichtausschluss in PI-Färbelösung inkubiert. Zuzüglich zu 25 mg/ml PI ist in der Lösung auch 100 µg/ml RNase enthalten. Diese verdaut die in den Zellen enthaltene RNA und verhindert dadurch mögliche RNA/PI-Interferenzen. Anhand von Durchflusszytometrie wird der DNA-Gehalt der Zellen über die Fluoreszenzintensität des eingelagerten PI analysiert.

2.2.4.3 Dynamische Zellzyklusanalyse

10 µM BrdU

Fixationslösung

2N HCL-0,5% Triton X-100- Lösung

0,1 M Natriumborat, pH 8,5

1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung

Anti-BrdU-FITC-Antikörper

PI-Färbelösung

DNA-Synthese, Zellproliferation sowie das damit verbundene Voranschreiten von Zellpopulationen im Zellzyklus kann durch den Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA sich teilender Zellen während der S-Phase gemessen werden. Zellen, die BrdU in ihre DNA inkorporiert haben, können durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU und eines Enzym- oder Fluorochrom-gekoppelten Zweit-Antikörper im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Erfolgt zeitgleich eine Färbung mittels PI zur dynamischen Zellzyklusanalyse, kann das Voranschreiten BrdU-markierter und BrdU-negativer Zellen im Zellzyklus untersucht werden (Abb. 6). Zur Durchführung dieser dynamischen Zellzyklusanalyse werden die Zellen zunächst mit BrdU in einer Konzentration von 10 µM für 1 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wird die BrdU-Lösung entfernt und die in eiskaltem PBS resuspendierten Zellen in -20°C kalter, 70%-iger Ethanol-Lösung fixiert. Am nachfolgenden Tag wird die Markierung des eingebauten BrdU durch einen Farbstoff-gekoppelten Antikörper sowie die synchrone PI-Färbung der Zellen durchgeführt. Dazu werden die fixierten Zellen 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und die Ethanol-Lösung abgesaugt. Im weiteren Verlauf wird das Zellsediment unter Vortexen in 1 ml einer frisch angesetzten 2 N HCL-0,5% Triton X-100-Lösung gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Einwirkdauer der zur DNA-Denaturierung eingesetzten Salzsäure nicht überschritten wird. Das Detergenz Triton X-100 bewirkt indessen ein Auflösen der zytoplasmatischen Zellmembran bei gleichzeitiger Unversehrtheit von Zellkern und der übrigen Zellkompartimente. Diese können durch anschließendes Zentrifugieren für 5 min bei 1400 rpm abgetrennt werden. Das gewonnene Zellsediment wird unter Vortexen in 1 ml 0,1 M Natriumborat mit pH-Wert 8,5 resuspendiert, wodurch eine vollständige Neutralisation hergestellt wird. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird der Natriumborat-haltige Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml einer 1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 25 μ l einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten, BrdU-spezifischen Antikörperlösung wird der Ansatz 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige Antikörper wieder zu entfernen, werden die Zellen erneut zentrifugiert und mittels 1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung gewaschen. Anschließend wird die in Kapitel 2.2.4.2 beschriebene PI-Färbung durchgeführt.

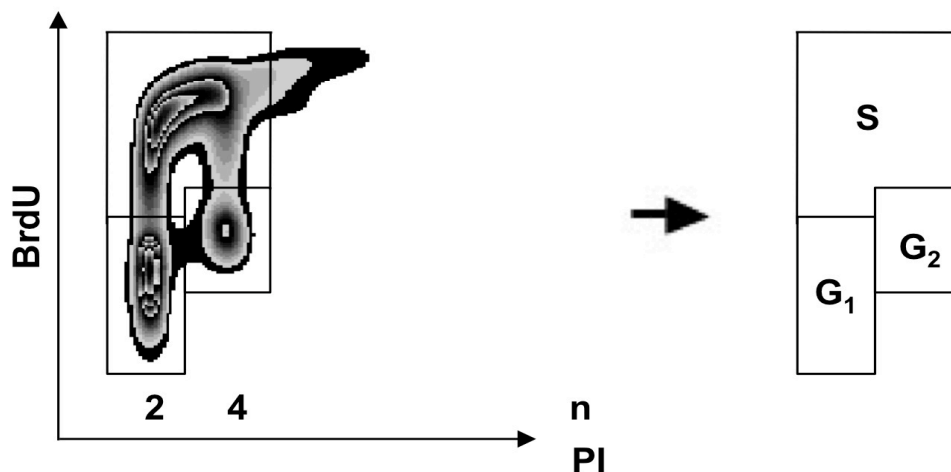


Abb. 6: Dynamische Zellzyklusanalyse. Durchflusszytometrische Messung nach Markierung des in die DNA eingebauten BrdU und PI-Färbung. Die als Zebrablott dargestellten Zellen können wie gezeigt den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; BrdU (Bromdesoxyuridin)-Aufnahme: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Gewinnung von Zelllysaten

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/ HCL, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml A.d.

Aprotinin (100×) 10 mg in 50 ml Isopropanol; sterilfiltriert

PMSF (100×) 10 mg in 50 ml Isopropanol; sterilfiltriert

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1 M Tris/ HCL, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Zu Beginn werden die geernteten Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und das Kulturmedium im Überstand abgenommen. Anschließend werden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In dieser Form können sie sowohl bei -80°C gelagert als auch direkt weiterverarbeitet werden. Zunächst wird das Zellsediment in frischem, eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Sollen die Lysate zur Analyse von Kernproteinen herangezogen werden, wird dem Lysis-Puffer zusätzlich die Proteaseinhibitoren Aprotinin (20 µl/ml) und PMSF (10 µl/ml) zur Vermeidung von Proteindegradation zugesetzt. Nach Zentrifugation der Proben für 20 min bei 14000 rpm und 4°C wird der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt sowie ggf. einer Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.2.5.2) unterzogen. Durch entsprechende Verdünnung mittels Lysis-Puffer können so die Konzentrationen verschiedener Proben aneinander angeglichen werden. Danach werden die Ansätze mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Es folgt ein Aufkochen der Lösung für 10 min bei 95°C zur Denaturierung der Proteine. Nach einem abschließenden kurzen Zentrifugationsschritt erfolgt das Auftrennen des Proteingemisches durch SDS-Gelelektrophorese.

2.2.5.2 Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Proteinen erfolgt durch die sehr empfindliche photometrische Methode nach Bradford (Bradford et al., 1976). Sie basiert auf der Fähigkeit des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant Blau G250 in saurer Lösung mit den kationischen Seitenketten von Proteinen zu interagieren. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Dadurch verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf

595 nm. Misst man photometrisch die komplex-bedingte Zunahme der Absorption bei 595 nm gegen das freie Farbreagens, ist das Ergebnis ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Kalibrierung eines Standards wird bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Es muss darauf geachtet werden, dass die erhaltenen Proteinkonzentrationen innerhalb des Messbereiches von 1- 20 $\mu\text{g/ml}$ liegen, da oberhalb des Messbereiches keine lineare Korrelation zwischen Extinktion und Proteinkonzentration mehr vorhanden ist. Die Proteinbestimmung erfolgt nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des „*BioRad Protein Assays*“.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/ HCL, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/ HCL, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Gelelektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen. Normalerweise wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld durch die Faktoren Molekulargewicht, Struktur und Ladung bestimmt. Die Besonderheit der hier verwendeten diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese liegt in der alleinigen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Verantwortlich dafür ist das stark negativ geladene Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat). Es lagert sich an die im Rahmen der Probenvorbereitung bereits denaturierten Proteine an und komplexiert diese unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur. Zusätzlich zum Aufkochen der Proteine ist am Denaturierungsprozess auch das im SDS-Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) beteiligt. Durch Reduktion intra- und intermolekularer Disulfidbrücken begünstigt es den Abbau von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine. Die Interaktion mit SDS führt zu einer Überlagerung der Polypeptid-Eigenladung und es entstehen anionische, ellipsoide Mizellen mit konstantem Ladung/Masse-Verhältnis. Sie erfahren folglich im elektrischen Feld alle die gleiche Beschleunigung, werden aber vom Gel größenabhängig gebremst und somit nach Molekülmasse bzw. Molekülradius aufgetrennt. Elektrophoresegele entstehen durch radikale Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid im Rahmen einer Kettenreaktion. Diese

wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und durch Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Im diskontinuierlichen System folgt auf das Sammelgel, charakterisiert durch einen niedrigen pH-Wert und eine große Polyacrylamid-Porenweite, ein sich durch einen höheren pH-Wert auszeichnendes, engporiges Trenngel. Das Sammelgel bedingt zusammen mit der Beschaffenheit des Elektrophoresepuffers die Fokussierung des Proteingemisches im Bereich der Sammelgel-Trenngel-Grenze. Im Trenngel erfolgt die Molmassen-gesteuerte Proteinauftrennung. Variation der Polyacrylamid-Konzentrationen (5-15%) im Trenngel resultiert in unterschiedlichen Trennporengrößen. Somit kann gezielt auf den Auftrennungsbereich der Proteine Einfluss genommen werden. Zur Herstellung der Polyacrylamidgels wird das Trenngel entsprechend der gewünschten Proteinauftrennung aus 5-15% Polyacrylamid-Lösung angefertigt und in eine aus zwei sauberen Glasplatten bestehende Gelgieß-Vorrichtung gegossen. Um einen geraden, lücken- und blasenfreien Gelabschluss zu erhalten, wird das frisch gegossene Gel mit Ethanol beschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wird das Ethanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Sofort im Anschluss wird ein Kamm in das flüssige Gel eingesteckt, der durch Aussparungen im polymerisierten Gel die Geltaschen für die Proteinproben formt. Dieser wird nach vollständiger Aushärtung des Gels wieder entnommen. Danach wird das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingeführt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die vorbereiteten Proteinproben werden in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 25-150V aufgetrennt. Zum Massevergleich wird zusätzlich ein farbstoffmarkierter Protein-Molekulargewichts-Marker mit aufgetrennt.

2.2.5.4 Transfer der Proteine auf eine PDVF-Membran (Western Blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Als Western Blot wird der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf ein geeignetes, solides Trägermaterial bezeichnet (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). Die dort fixierten Proteine können anschließend durch antigen-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dazu wird eine aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehende proteinbindende Trägermembran kurz in

Methanol getränkt und in eine mit Transferpuffer befüllte Schale gegeben. Nachdem das Trenngel luftblasenfrei auf die Membran gelegt worden ist, wird es in einer Plastikkassette beidseits von je einem Cellulosefilterkarton (Whatman-Paper) und einer Schaumstoffschicht umschlossen. Die Schichten werden in eine mit Transferpuffer befüllte Transferkammer eingehängt, wobei das SDS-Gel in Richtung Kathode, die PVDF-Membran zur Anode zeigen muss. Bei konstantem Stromfluss (1000 mA) und unter ständiger Kühlung wandern die Proteine in Richtung der Anode und bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften. Das Muster der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bleibt dabei erhalten. Die Transferdauer richtet sich nach der molaren Masse der zu transferierenden Proteine.

2.2.5.5 Immunchemische Detektion transferierter Proteine

Blockier-Puffer: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS- Tween-Puffer

PBS-Tween-Puffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Die elektrophoretisch aufgetrennten und auf PVDF- Membran übertragen Proteine können durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert und mittels Chemolumineszenz-System sichtbar gemacht werden. Unmittelbar nach dem Transfer wird die PVDF-Membran kurz mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und anschließend in Blockier-Puffer für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Dieser Schritt dient zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wodurch Hintergrundfärbungen vermieden werden sollen. Es ist darauf zu achten, dass zur Detektion phosphorylierter Proteine ausschließlich mit 5%-iger BSA-Lösung als Blockier-Puffer gearbeitet wird. Milchproteine können in phosphorylierter Form vorliegen und sind deshalb in der Lage, durch Reaktion mit phosphospezifischen Antikörpern das Ergebnis zu verfälschen. Hiernach wird der spezifisch gegen ein Epitop des zu analysierenden Proteins gerichteten Primär-Antikörper auf die Trägermembran gegen und zur Inkubation über Nacht bei 4°C schüttelnd auf dieser belassen. Das Ansetzen des Primär-Antikörpers richtet sich nach den Herstellerangaben und erfolgt entweder in Blockier-Puffer oder 5%-iger BSA-Lösung.

Nach stattgefundenener Antigen-Antikörper-Reaktion wird die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu beseitigen. Im Anschluss daran wird diese für 30 min mit einem in Blockier-Puffer angesetztem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert und richtet sich gegen den F_c-Teil des Erstantikörpers. Abschließend wird die Membran zweimal mit PBS-Tween-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und zur Detektion der Immunkomplexe kurz mit Chemolumineszenz-Lösung bedeckt. Das darin enthaltene Substrat Luminol wird durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase in seine oxidierte Form umgesetzt, bei welcher eine Lumineszenz detektiert werden kann. Durch Verwendung eines Hyperfilms kann das erzeugte Signal dokumentiert werden.

2.2.5.6 Amidoschwarzfärbung transferierter Proteine

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2% Naphtolblauschwarz, 25% Isopropanol, 10% Essigsäure

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 10% Essigsäure; 10% Methanol in A.d.

Die elektrophoretisch aufgetrennten und auf PVDF transferierten Proteine können mit Hilfe des Farbstoffes Amidoschwarz angefärbt werden, um beispielsweise den Transfererfolg zu überprüfen. Dazu wird die Membran für 15 min bei Raumtemperatur in Amidoschwarz-Lösung inkubiert und anschließend mittels Entfärbelösung bis zur gewünschten Bandenintensität gewaschen. Eine Verwendung der Membran zur immunchemischen Detektion ist auch nach der Färbung noch möglich.

2.2.5.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Membran

Stripping-Puffer; 0,2 M NaOH

Um bereits entwickelte Membranen mehrmals für Antikörperreaktionen und nachfolgende Detektion verwenden zu können, muss der gebundene Antikörper von der Membran entfernt und diese anschließend neu blockiert werden. Hierzu wird die Membran für 10 min bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer oder Amidoschwarz-Entfärbelösung schüttelnd inkubiert. Nach mehreren kurzen

Waschschritten mit PBS und 30-minütiger Inkubation bei 37°C in Blockier-Puffer bzw. 5%-iger BSA-Lösung kann die Membran erneut einem immunchemischen Proteinnachweis unterzogen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Aurora Kinase Inhibitoren

3.1.1 Transformierende Aktivität von Bcr-Abl und seiner Mutanten in Ba/F3-Zellen

Bei Ba/F3-Zellen handelt es sich um murine Pre-B-Zelllinien. Sie gelten als Modellzelllinien für den Nachweis transformierender Eigenschaften von Onkogenen. Überleben und Wachstum dieser Zelllinien erfolgt IL-3 abhängig. Wird den Zellen dieses Zytokin entzogen, gehen sie in Apoptose (Rodriguez-Tarduchy et al. 1990). Durch Expression des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl werden diese Zellen zur Faktorunabhängigkeit transformiert. Neben der Ba/F3 MIG EGFP p185 Wildtypform (wt) werden im Rahmen dieser Arbeit die Imatinib-resistenten Bcr-Abl-Mutanten T315I, Y253H, Y253F und F317L verwendet. T315I kommt als *Gatekeeper*-Mutation die wohl größte klinische Bedeutung zu. Sie erzeugt eine Pan-Resistenz gegenüber den gängigen Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib. Ferner stellt sie mit mehr als 15% auch eine der häufigsten Resistenzmutationen dar. Patienten, die diese Mutation tragen, haben sowohl bezüglich der Krankheitsprogression als auch dem Gesamtüberleben eine schlechte Prognose (Soverini et al. 2005). Bei Y253H und Y253F handelt es sich um Vertreter von Punktmutationen innerhalb der Nukleotid-Bindungsstelle (P-Loop) der Abl-Kinase-Domäne. P-Loop-Mutationen machen mehr als 11% aller Mutationen aus und weisen Resistenzen gegenüber Imatinib und Nilotinib auf. F317L ist etwas seltener und tritt bevorzugt unter Dasatinib-Therapie auf.

3.1.2 PHA-739358 und AS-703569 induzieren antiproliferative Effekte in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen

PHA-739358 (Abb. 6) ist ein klein-molekularer Pan-Aurora Kinase Inhibitor (Abb. 6). Er gehört zur Klasse der 1,4,5,6-Tetrahydropyrrolo(3,4-c)pyrazole (Fancelli et al. 2006). Als ATP-kompetitive Substanz bindet PHA-739358 in der ATP-Bindungstasche von Proteinkinasen. Durch die höhere Affinität zur Kinase wird so die Anlagerung von ATP verhindert und die Kinase ist nicht mehr aktivierbar. Zu

den Angriffspunkten gehören neben Aurora Kinasen und Bcr-Abl auch RET, TRK-A und FGFR-1 (*fibroblast growth factor receptor-1*) (Carpinelli et al. 2007).

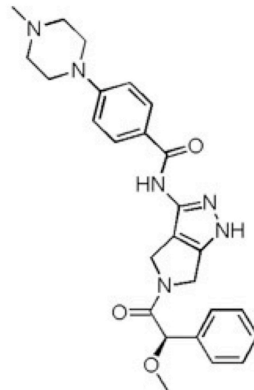


Abb. 7: Strukturformel von PHA-739358 (1,4,5,6-Tetrahydropyrrolo(3,4-c)pyrazol)

Das Pyrimidin-2,4-Diamin-derivat AS-703569 (Abb. 8) agiert wie PHA-739358 als ATP-Kompetitor. Es wurde ursprünglich als klein-molekularer Pan-Aurora Kinase Inhibitor entwickelt. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Substanz auch zur Inhibition anderer Kinasen wie Bcr-Abl, FLT3, FGF-R3 und JAK2 eingesetzt werden kann (Merk Serono International S.A. et al. 2008; McLaughlin et al. 2009).

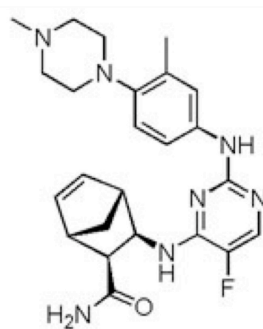


Abb. 8: Strukturformel von AS-703569 (Pyrimidin-2,4-Diamin-derivat)

Um die inhibitorische Wirkung beider Substanzen auf die wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation zu untersuchen, wurden die durch Bcr-Abl/wt, Bcr-Abl/T315I, Bcr-Abl/Y253H, Bcr-Abl/Y253F oder Bcr-Abl/F317L transformierten Ba/F3-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors kultiviert.

Nach 48-stündiger Inkubation wurde die proliferative Aktivität der Zellen bestimmt (Abb. 9). Zur Evaluation der Medikamentenwirkung auf nicht transformierte Zellen wurden zusätzlich auch IL-3-abhängige parentale Ba/F3-Zellen verwendet. Unbehandelte DMSO und mit DMSO versetzte Zellen dienten als Kontrollen.

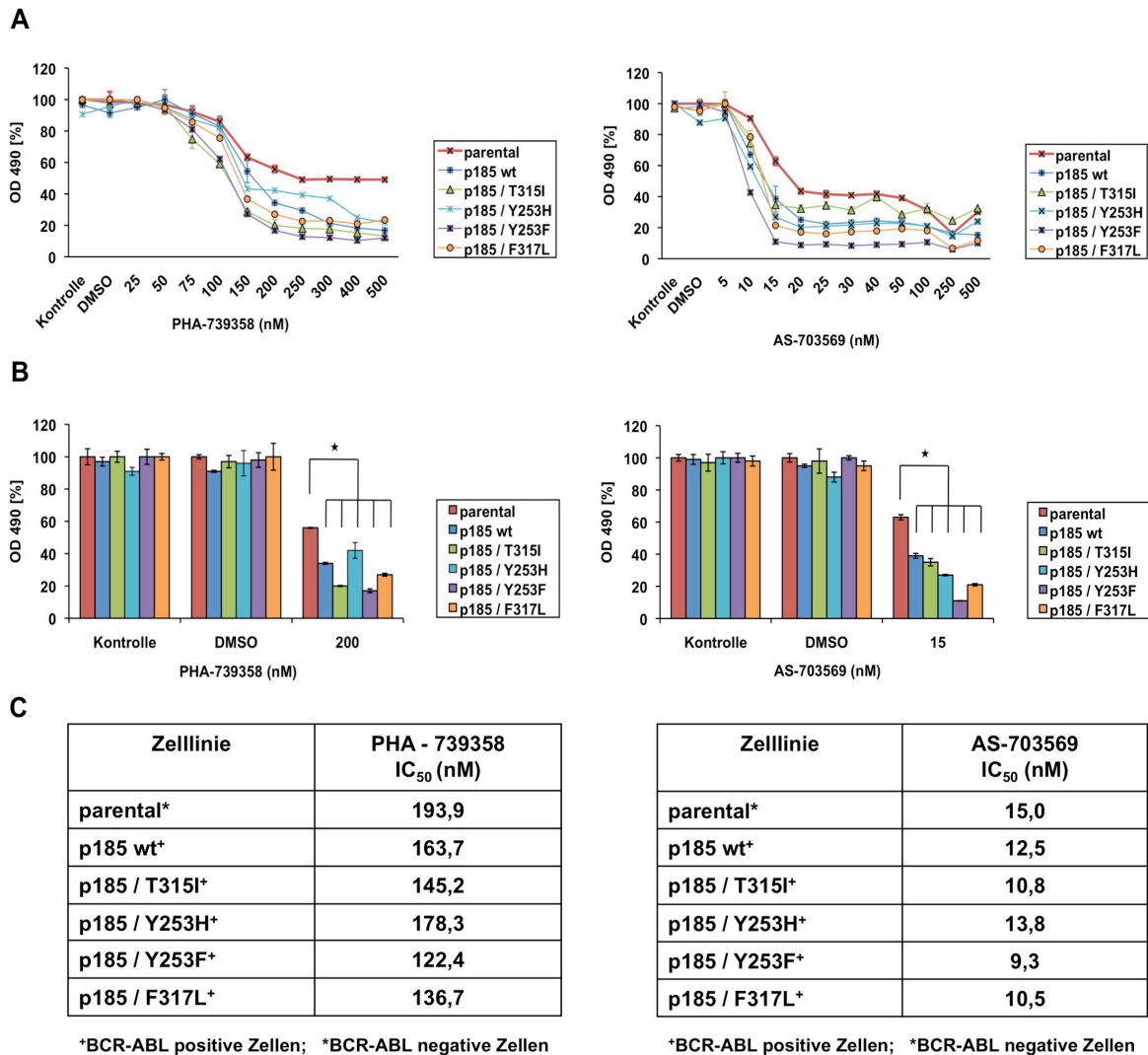


Abb. 9: PHA-739358 und AS-703569 beeinträchtigen Zellproliferation und Viabilität. Ba/F3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von PHA-739358 bzw. AS703569 kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Messung der proliferativen Aktivität mittels MTS-Methode. Die Darstellung des inhibitorischen Potentials von PHA-739358 bzw. AS-703569 wurde in Korrelation zu unbehandelten Kontrollzellen durchgeführt. IC₅₀-Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven mittels graphischer Extrapolation ermittelt. Statistische Analysen erfolgten unter Verwendung des *Student's t tests*, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0.05$ festgesetzt wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen (\pm Standardabweichung).

IC₅₀-Wert: Inhibitorische Konzentration 50%

A: Dosis-Wirkungs-Kurven für PHA-739358 (links) und AS-703569 (rechts)

B: Darstellung der größten Zelllinien-abhängigen Ansprechdifferenz unter Behandlung mit PHA-739358 (links) und AS-703569 (rechts)

C: Übersicht der IC₅₀-Werte für PHA-739358 (links) und AS-703569 (rechts)

Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von PHA-739358 (Abb. 9A, linke Graphik) bzw. AS-703569 (Abb. 9A, rechte Graphik) führt zu einer dosisabhängigen Reduktion des Zellwachstums in Bcr-Abl negativen (parentale Ba/F3) gleichermaßen wie in Bcr-Abl positiven Ba/F3-Zellen (Bcr-Abl wt, Bcr-Abl/T315I, Bcr-Abl/Y253H, Bcr-Abl/Y253F, Bcr-Abl/F317L). Der Bcr-Abl-Mutationsstatus hat hierbei keinen Einfluss auf die antiproliferativen Effekte des entsprechenden Inhibitors. Es besteht somit keine Korrelation zwischen der Sensitivität der Bcr-Abl-Mutanten gegenüber den hier getesteten Wirkstoffen und dem Grad der Resistenz gegenüber Imatinib. Allerdings unterscheiden sich beide Inhibitoren deutlich hinsichtlich der zur 50%-igen Wachstumsinhibition benötigten Konzentrationshöhe. So liegt der IC₅₀-Wert von PHA-739358 sowohl für die hoch resistenten Bcr-Abl/T315I-Mutante als auch die übrigen transformierten Zellen bei durchschnittlich 150 nM (122-178 nM) (Abb. 9C, linke Tabelle), während im Schnitt IC₅₀-Werte von AS-703569 im Bereich von 10 nM für Bcr-Abl positive Zellen zur halbmaximalen Wachstumsinhibition ausreichen (Abb. 9C, rechte Tabelle). Darüber hinaus ist auffallend, dass beide Inhibitoren einen signifikant geringeren antiproliferativen Effekt auf parentale Ba/F3-Zellen ausüben. Demnach reagieren onkogen transformierte Zellen sowohl auf PHA-739358 als auch auf AS-703569 deutlich sensitiver als Bcr-Abl negative Zellen. Daraus ergibt sich ein therapeutisches Fenster, das bei Konzentrationen um 200 nM PHA-739358 bzw. 15 nM AS-703569 am größten ist (Abb. 9B).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass beide Inhibitoren zur effektiven Proliferationsinhibition von Bcr-Abl positiven Zellen eingesetzt werden können und zwar unabhängig von deren Mutationsstatus und unter gleichzeitiger Teilprotektion nicht transformierter Zellen. Diese Beobachtung macht beide Substanzen im Hinblick auf die Behandlung TKI-resistenter CML, insbesondere bei Nachweis der hoch resistenten T315I-Mutation, klinisch interessant.

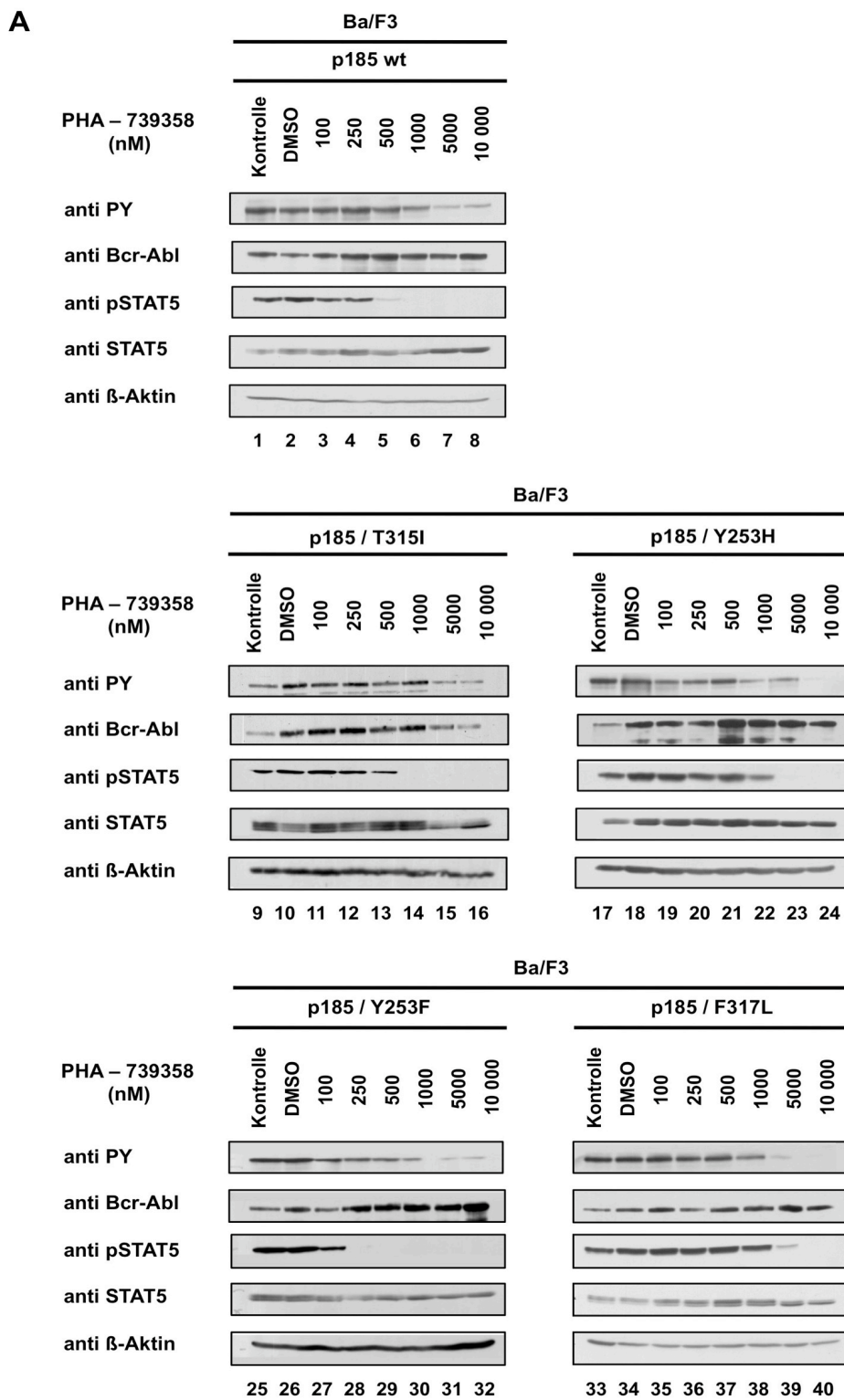
3.1.3 PHA-739358 und AS-703569 inhibieren die Aktivität von Bcr-Abl und Aurora Kinasen

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass Bcr-Abl positive Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber PHA-739358 und AS-703569 als nicht transformierte Zellen aufweisen. Somit könnte neben den Aurora Kinasen auch

Bcr-Abl in die Vermittlung der antiproliferativen Inhibitoreffekte involviert sein. Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Proliferationshemmung auf Bcr-Abl oder Aurora Kinase Inhibition zurückzuführen ist, wurden Bcr-Abl positive Linien mit ansteigenden Konzentrationen des entsprechenden Inhibitors behandelt. Anschließend wurde anhand von Western-Blot Analyse die Aktivität der Bcr-Abl Kinase (Abb. 10) sowie der Aurora Kinasen (Abb. 11) untersucht. Bezugnehmend auf Bcr-Abl wurde dafür mit einem phosphospezifischen Antikörper die Abnahme der Bcr-Abl Autophosphorylierung detektiert. Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von STAT5 bestimmt. Dabei handelt es sich um ein bekanntes *downstream target* von Bcr-Abl. Änderungen seines Phosphorylierungsstatus weisen auf Aktivierung oder Hemmung der Bcr-Abl-Signalkaskade hin. Aktivität der Aurora Kinasen wurde anhand des Phosphorylierungsstatus von Histon 3 an Serin 10 gemessen - ein Protein innerhalb der Aurora B-Signalkaskade, das sich als verlässlicher Biomarker *in vitro* und *in vivo* etabliert hat (Carpinelli et al. 2008; Foran et al. 2008).

Wie Abb. 10A zeigt, lässt sich durch Konzentrationen von PHA-739358 im Bereich von 1000 nM in allen Bcr-Abl positiven Zellen die Bcr-Abl Autophosphorylierung um mehr als die Hälfte herabsetzen (Abb. 10A, anti PY-Blot, Spur 6, 14, 22, 30, 38), verglichen mit den unbeeinflussten Phosphorylierungsniveaus (Abb. 10A, anti PY-Blot, Spur 1, 9, 17, 25, 33). Eine Blockade der nachgeschalteten Signalkaskade, repräsentiert durch eine deutliche Reduktion der STAT5-Phosphorylierung, ist teils sogar bei niedrigen Konzentrationen detektierbar (Abb. 10A, anti pSTAT5-Blot).

Ähnliches findet sich bezüglich des Inhibitors AS-703569 (Abb. 10B). Hier werden mit AS-703569-Konzentrationen im Bereich von 500 nM geringgradig niedrigere Dosierungen zur deutlichen Blockierung der Bcr-Abl Aktivität bzw. dessen *downstream target* STAT5 benötigt (Abb. 10B, anti PY-Blot und anti pSTAT5-Blot, Spur 5, 13, 21, 29 und 39). Als Vergleich dienen die Phosphorylierungsniveaus unbehandelter Kontrollzellen (Abb. 10B, anti PY-Blot, Spur 1, 9, 17, 25 und 33). Damit konnte der fehlende Einfluss des Bcr-Abl-Mutationsstatus auf die Effektivität beider Inhibitoren erneut bestätigt werden. Zur Kontrolle von Ladung und Gesamtproteinmenge wurde in beiden Experimenten Abl, STAT5 und β -Aktin detektiert.



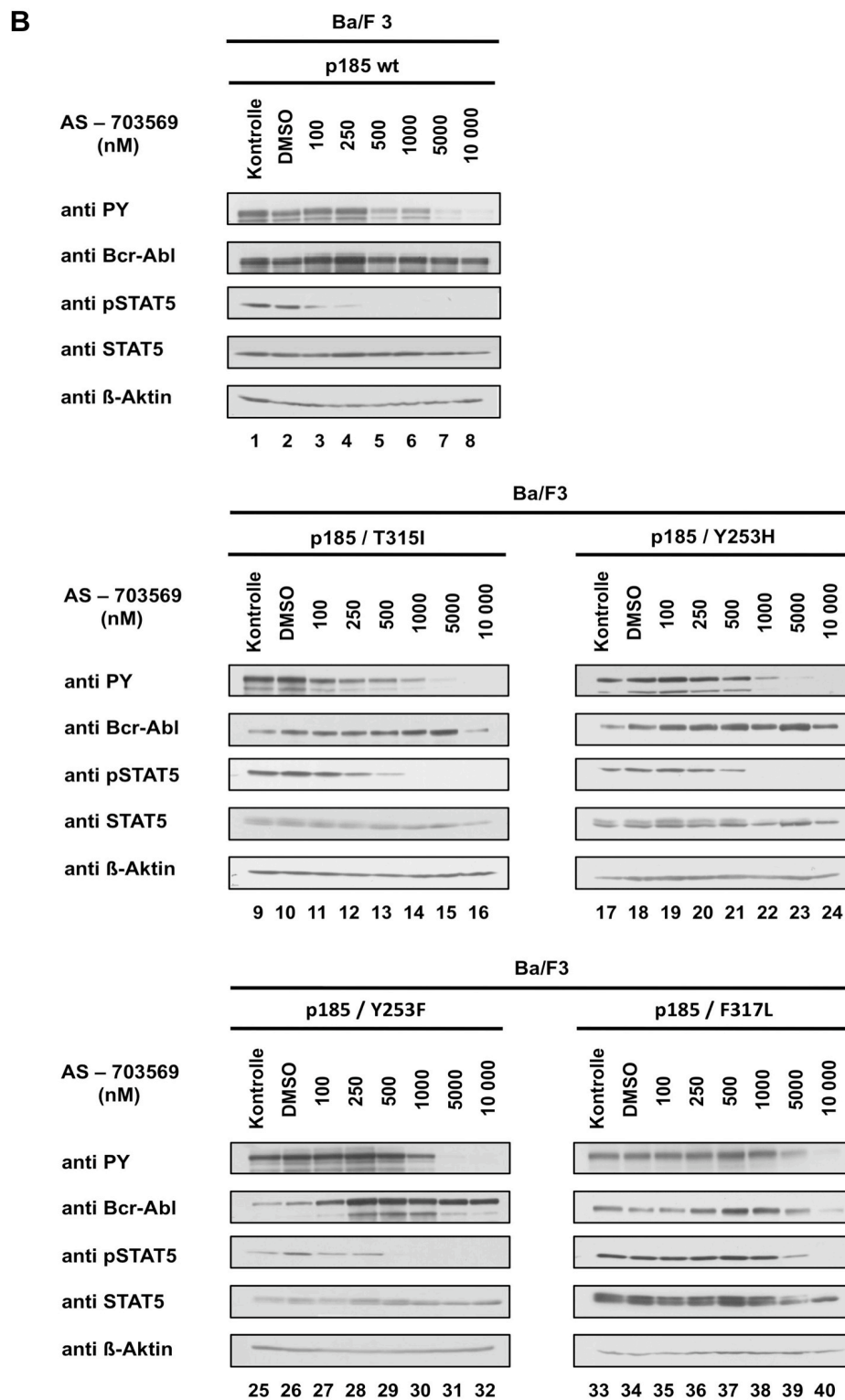


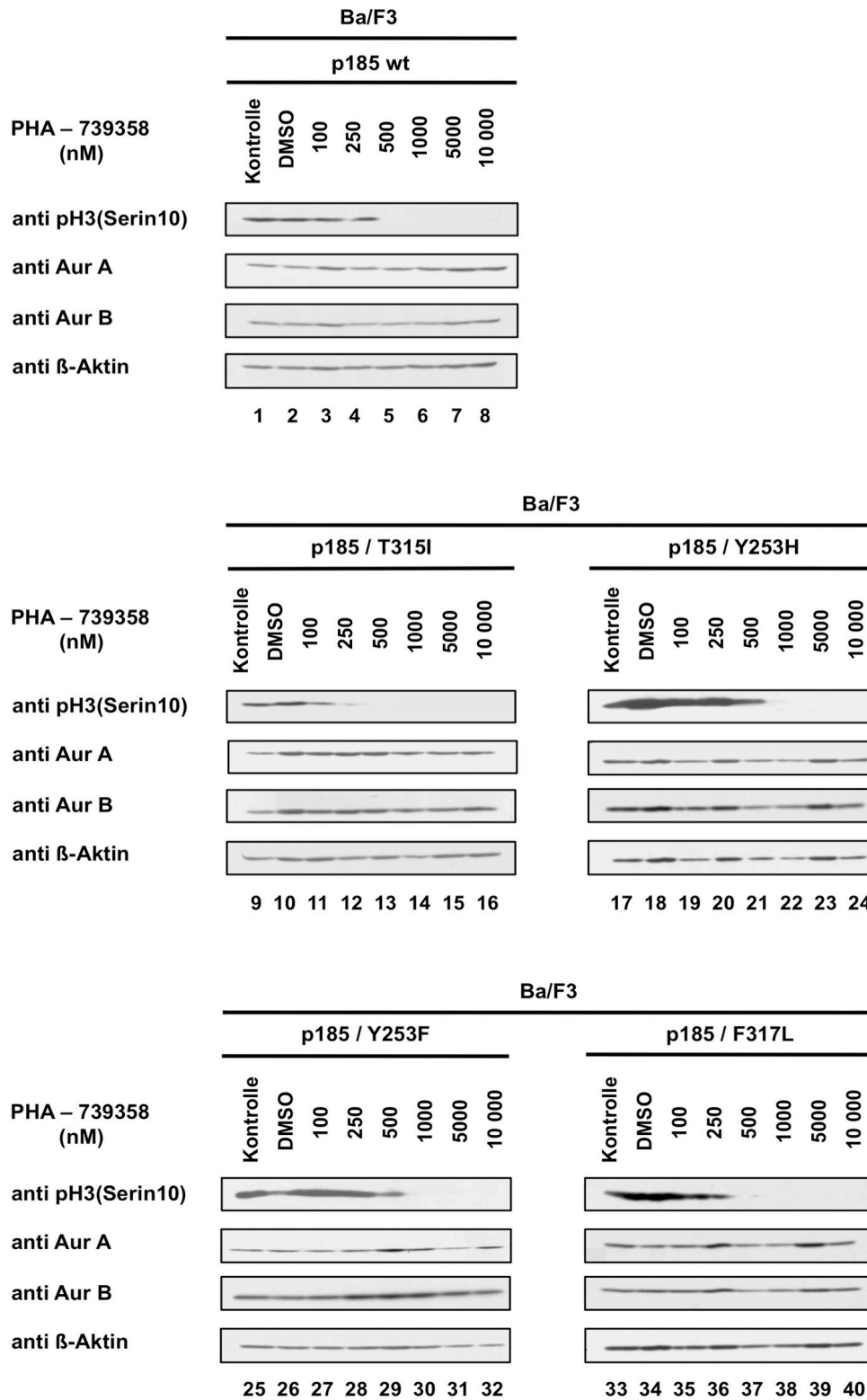
Abb. 10: PHA-739358 und AS-703569 reduzieren Bcr-Abl Autophosphorylierung und Aktivierung von STAT5 unabhängig vom Bcr-Abl-Mutationsstatus. Bcr-Abl wt (p185 wt) bzw. T315I, Y253H, Y253F und F317L exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 2.30 h mit steigenden Konzentrationen PHA-739358 (A) bzw. AS-703569 (B) inkubiert. Als Negativkontrollen wurden sowohl unbehandelte als auch mit DMSO versetzte Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung gibt den immunchemischen Nachweis von phosphoryliertem (anti PY) und nicht phosphoryliertem (anti Bcr-Abl) Bcr-Abl phosphoryliertem STAT5 (anti pSTAT5), STAT5 (anti STAT5) und β -Aktin (anti β -Aktin) im Western-Blot wieder.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen des Zellproliferationsassays (siehe Kapitel 3.1.2), fällt auf, dass zur Reduktion der Bcr-Abl Aktivität PHA-739358-Konzentrationen ähnlicher Größenordnung notwendig sind wie für eine maximale Inhibition der Zellproliferation von Bcr-Abl positiven Zellen: Beginnende Deposphorylierung von STAT5 bei 250 nM und max. Zellproliferationshemmung bei 200 nM (entspricht dem IC_{90} -Wert). Demnach kann Bcr-Abl Inhibition für die beobachteten antiproliferativen Effekte in Bcr-Abl positiven Ba/F3-Zellen in Frage kommen.

Im Gegensatz dazu sind zur effektiven Reduktion der Bcr-Abl Aktivität durch AS-703569 mindestens 25-fach höhere Konzentrationen als zur maximalen zellulären Proliferationsinhibition notwendig (Bcr-Abl Inhibition im Schnitt bei 500 nM; max. Proliferationshemmung / IC_{90} -Wert bei 20 nM). Folglich ist Inhibition von Bcr-Abl als primärer Mediator der anti-proliferativen Wirkung unwahrscheinlich.

Abb. 11A demonstriert die Auswirkung von PHA-739358 auf die Phosphorylierung des Histon 3-Proteins. Durch Inkubation mit 500 nM des Wirkstoffes wird Aurora Kinasen vermittelte Histon 3-Phosphorylierung nahezu vollständig gehemmt, unabhängig davon, ob bzw. welche Bcr-Abl-Mutante exprimiert wird (Abb. 11A, anti pH3(Serin10)-Blot, Spur 5, 13, 21, 29, 37). Diese Konzentrationen korrelieren mit denen, die zur Inhibition von Bcr-Abl und zum Erreichen der maximalen Proliferationshemmung in Bcr-Abl positiven Zellen ermittelt worden sind. In Anbetracht dessen kann sowohl Bcr-Abl als auch Aurora Kinase Inhibition für den antiproliferativen Effekt von PHA-739358 in-vitro verantwortlich sein. Abb. 11B zeigt die entsprechenden Ergebnisse für AS-703569. Konzentrationen im Bereich von 25 nM reichen aus, um eine deutliche Inhibition der Aurora Kinasen zu erzielen (Abb. 11B, anti pH3(Serin10)-Blot, Spur 4, 12, 20, 28, 36). Diese stimmen in etwa mit den ermittelten zellulären IC_{90} -Konzentrationen überein. Infolgedessen könnte der antiproliferative Effekt von AS-703569 in Bcr-Abl positiven Ba/F3 Zellen durch eine spezifische Inhibition der Aurora Kinasen bedingt sein. Die Aurora A/B-Gesamtproteinmenge wird durch beide Inhibitoren nicht beeinflusst (Abb. 11A/B, Blot: anti AurA / anti AurB). Der β -Aktin-Nachweis zeigt eine gleichmäßige Ladung der Spuren an.

A



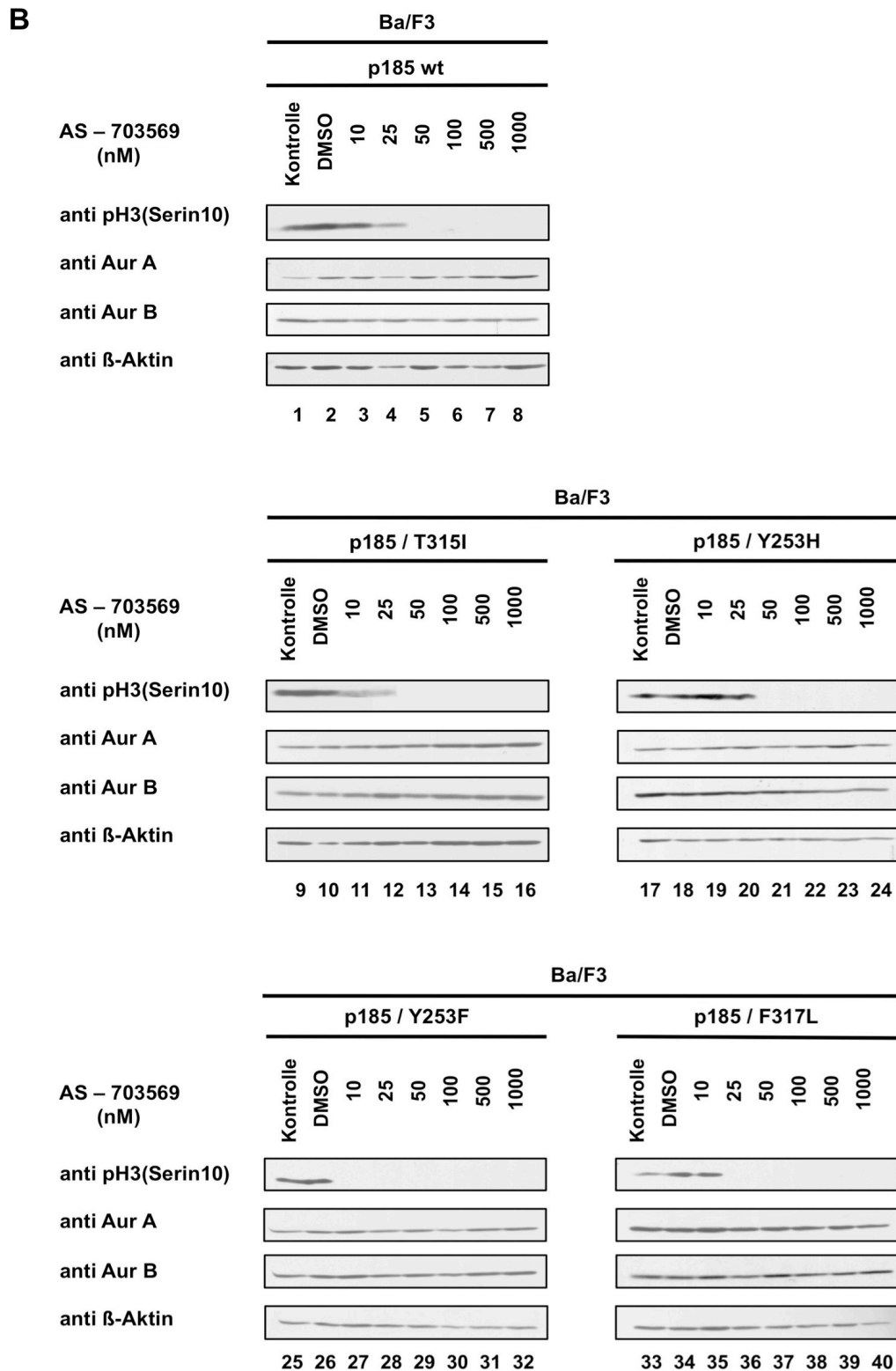
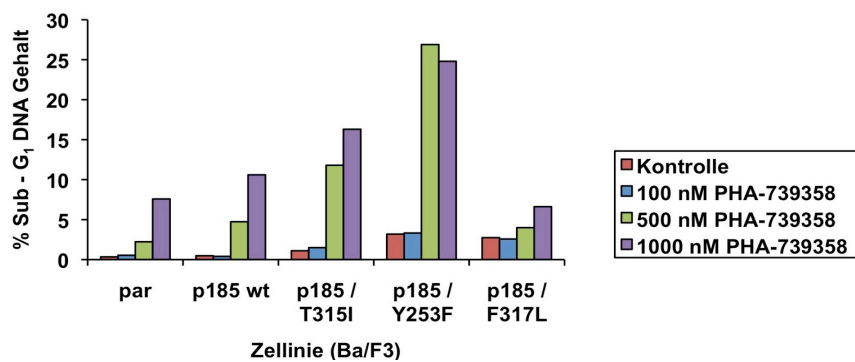
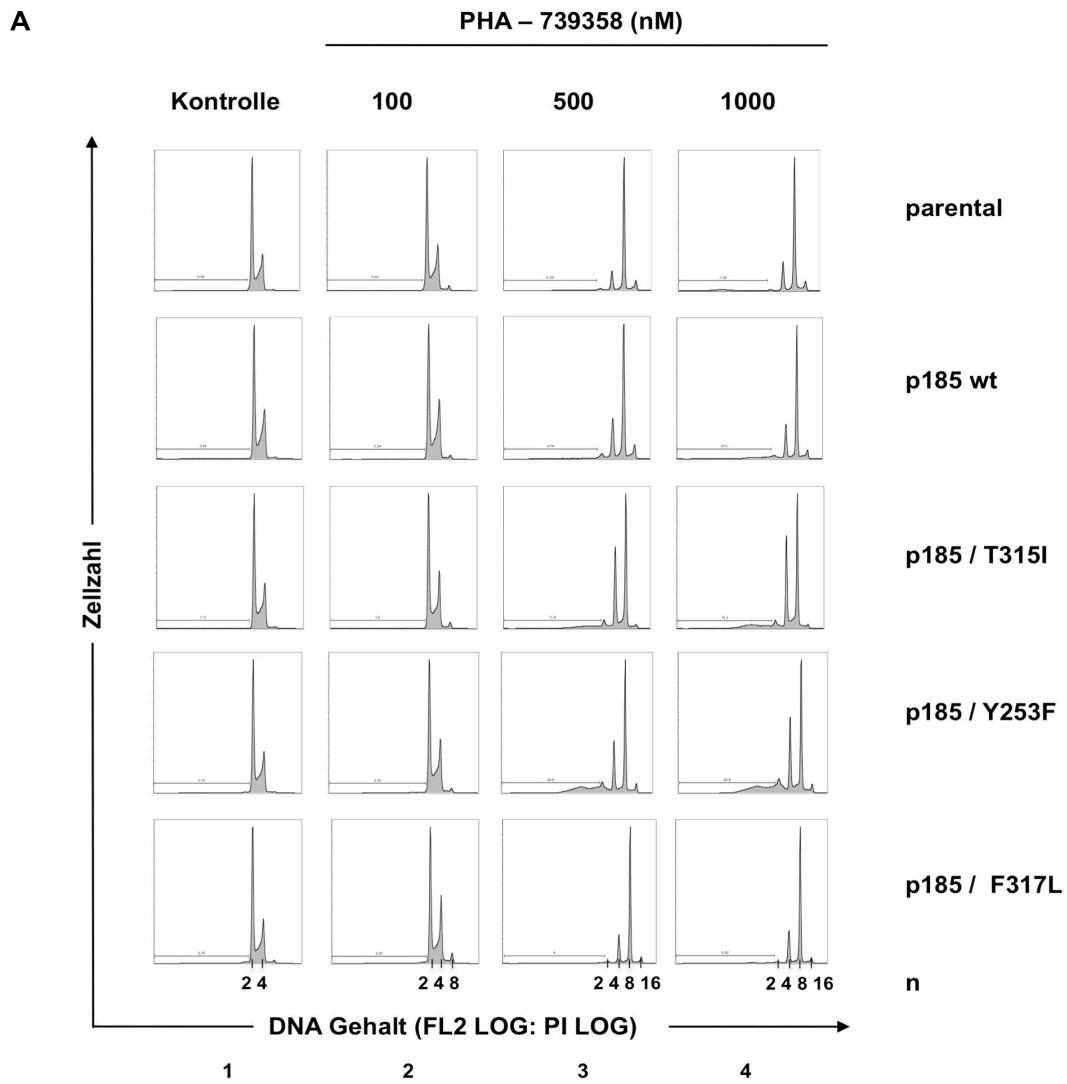


Abb. 11: Inhibition der Aurora Kinase Aktivität erfolgt bei unterschiedlichen Konzentrationen von PHA-739358 und AS-703569 und führt zur verminderten Phosphorylierung von Histon H3 an Serin10. Bcr-Abl wt (p185 wt) bzw. T315I, Y253H, Y253F und F317L exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 2.30 h mit steigenden Konzentrationen PHA-739358 (A) bzw. AS-703569 (B) inkubiert und anschließend zu Lysaten verarbeitet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Proteinmengen von phosphoryliertem Histon H3 (Serin 10) [anti pH3(Serin10)], Aurora A (anti AurA), Aurora B (anti AurB) und β -Aktin (anti β -Aktin) mittels spezifischer Antikörper auf der Western Blot-Membran detektiert.

3.1.4 Inhibition von Aurora Kinasen führt zu Zellteilungsdefekten

Die drei in Säugetierzellen exprimierten Aurora Kinasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation mitotischer Prozesse (Andrews et al. 2003; Carmena et al. 2003; Ducat et al. 2004; Keen et al. 2004; Fu et al. 2007; Vader et al. 2008). Aurora A ist maßgeblich an Centrosomen-Maturation und -Separation sowie am Spindelkontrollpunkt (SAC) beteiligt (Marumoto et al. 2005). Aurora B steuert als Bestandteil des *Chrosomenpassenger-Komplex* Chromosomenkondenstation, bi-orientierte Ausrichtung der Chromosomen, SAC und die Zytokinese (Carmena et al. 2003). Die Funktionen von Aurora C, auch ein *Chromosomenpassenger*-Protein, scheinen eher in der Regulation der männlichen Meiose zu liegen (Tang et al. 2006). Aufgrund der tragenden Rolle der Aurora Kinasen im Ablauf mitotischer Prozesse ist es wahrscheinlich, dass PHA-739358 und AS-703569 durch deren Inhibition den Verlauf des Zellzyklus nachhaltig beeinflussen können. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden daher statische Zellzyklusanalysen durchgeführt. Bcr-Abl positiven Ba/F3-Zellen (wt sowie die Bcr-Abl-Mutanten T315I, Y253F, F317L) wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors kultiviert. Diese wurden gemäß der bisherigen Ergebnisse so gewählt, dass die verantwortlichen Kinasen zunächst nicht, dann teilweise und schließlich komplett inhibiert werden. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Auf die gleiche Weise wurden parentale Ba/F3-Zellen unter Zusatz von IL-3 einer Inhibitor-Behandlung unterzogen. Im Anschluss wurden die Zellen PI-gefärbt und einer durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt (Abb. 12)

Bei den unbehandelten Kulturen in Abb. 12 A (oberes Bild, Spalte 1) liegen die meisten Zellen in G₁-Phase vor, nur ein geringer Anteil befindet sich in S-Phase, G₂-Phase oder in Mitose. Sie geben damit den physiologischen Zellzyklusverlauf wieder. Während Behandlung mit 100 nM PHA-739358 keine wesentlichen Zellzyklus-Veränderungen in parentalen Ba/F3-Zellen hervorruft, führen 500 nM zur Reduktion der G₁-Population bei gleichzeitiger G₂/M-Akkumulation von Zellen mit 4n-DNA-Gehalt. Dieses Phänomen ist als Folge von Aurora Kinase Inhibition beschrieben worden (Kawasaki et al. 2001; Girdler et al. 2006). Dadurch werden Zellteilungsdefekte induziert, welche dazu führen, dass der verdoppelte Chromosomensatz am Ende der Mitose in einer einzigen Zelle verbleibt.



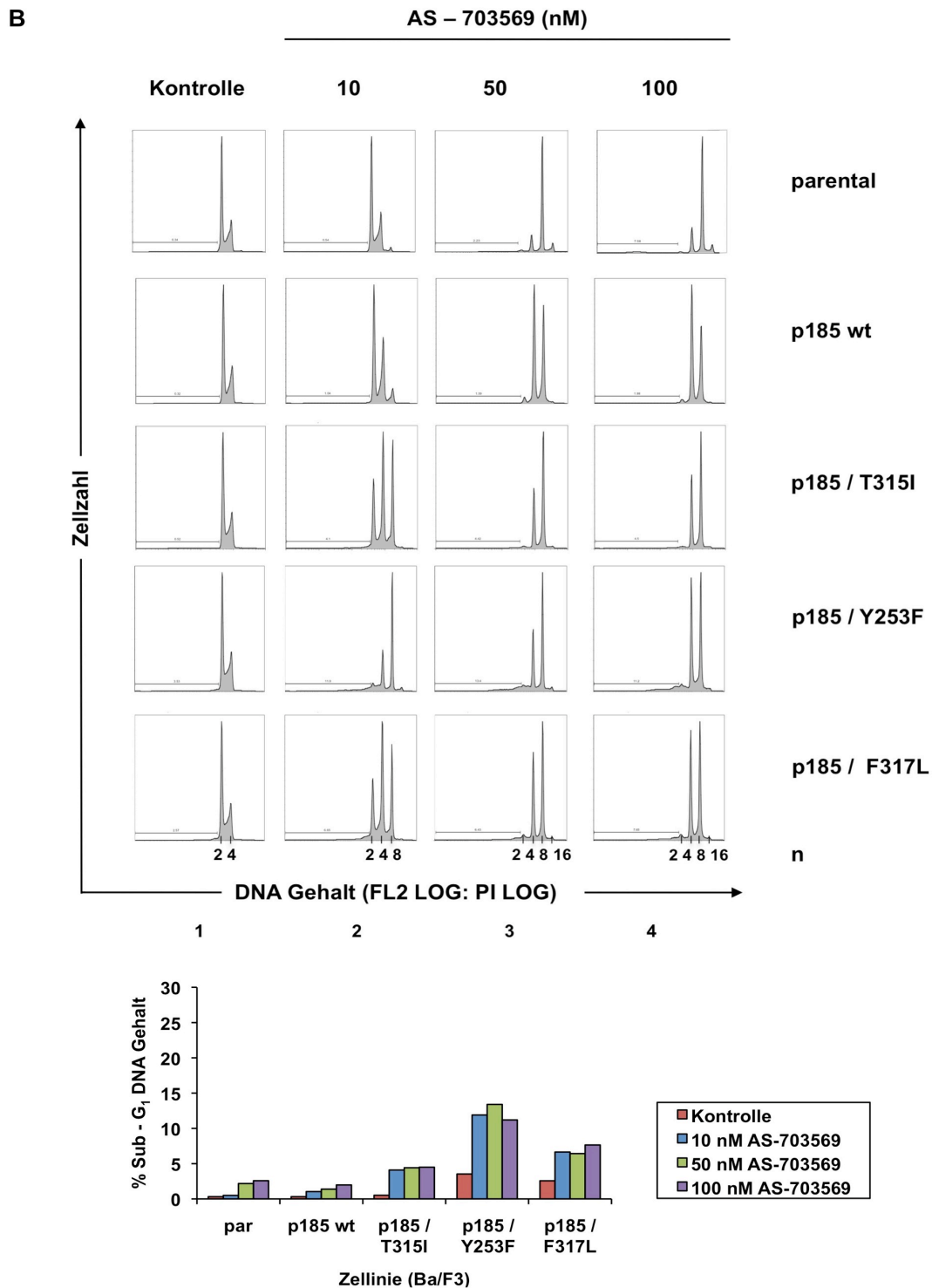


Abb. 12: Inhibition der Aurora B Kinase Aktivität durch PHA-739358 oder AS-703569 führt zu Zellteilungsdefekten und induziert Apoptose in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen. Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von PHA-739358 (100, 500, 1000 nM) bzw. AS-703569 (10, 50, 100 nM) inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nach Fixation der Zellen in Ethanol wurden diese mit PI-Färbelösung inkubiert. In der Abbildung ist die durchflusszytometrische Analyse der PI-gefärbten Zellen dargestellt.

PI: Propidiumiodid; Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers
 Statische Zellzyklusanalysen für PHA-739358 (A) und AS-703569 (B). Apoptose-Messung erfolgte durch Bestimmung des Sub-G₁-DNA-Gehaltes. Die untere Graphik gibt die Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen mit Sub-G₁-DNA-Gehalt wieder.

Da diese Zelle den Zellzyklus ganz normal durchlaufen kann, wird der 4n Chromosomensatz bei jedem Durchgang ordnungsgemäß dupliziert. Das Ergebnis dieser Endoreduplikationsvorgänge sind polyploide Zellen. So sind bei 1000 nM bereits mehrheitlich Zellen mit einem DNA-Gehalt von 8n und sogar 16n detektierbar (Abb. 12A, oberes Bild, Spalte 4). Ursache dafür, dass sich Polyploidie erst bei Konzentrationen ab 500 nM findet, beruht darauf, dass erst Konzentrationen dieser Größenordnung, wie in den vorherigen Versuchen ermittelt, zur effektiven Inhibition dieser Kinasen und damit zu Zellteilungsdefekten führen. Ähnliche Zellzyklusprofile unter PHA-739358-Behandlung beobachtet man auch für die Bcr-Abl transformierten Zelllinien. Auch hier können unter Behandlung mit 100 nM keine relevanten Zellzyklus-Veränderungen festgestellt werden, da weder die Aktivität von Bcr-Abl noch die der Aurora Kinasen wesentlich eingeschränkt wird. Die Zellen können nahezu ohne Beeinträchtigung der Zellteilung den Zellzyklus durchlaufen. Repräsentiert wird dies durch eine 2n-Population (Abb. 12A, oberes Bild, G₁-Gipfel in Spalte 2), die bezüglich der Größe der 2n-Population in unbehandelten Zellen entspricht (Abb. 12A, oberes Bild, Spalte 1). Auffallend ist jedoch, dass im Vergleich zu den parental Ba/F3-Zellen bereits bei einer Konzentration von 500 nM PHA-739358 ein signifikanter Anstieg der Sub-G₁-Population und damit von apoptotischen Zellen verzeichnet wird. Die Quantifizierung des apoptotischen Zellanteils der hier eingesetzten Zelllinien verdeutlicht diesen Aspekt (Abb. 12A, untere Graphik). Interessanterweise zeigen sich hier auch Unterschiede im Sub-G₁-Anteil zwischen p185 wt-Zellen und den Bcr-Abl-Mutanten. So scheint die p185/F317L-Mutante weniger sensitiv gegenüber PHA-739358 zu sein. Diese Beobachtung korreliert mit der Kinaseaktivität im Western-Bot (siehe Kapitel 3.1.3), wo eine maximale Inhibition des nachgeschalteten Bcr-Abl-Signalweges erst bei vergleichsweise leicht erhöhten Konzentrationen nachzuweisen war. Warum jedoch zusätzlich ein verstärkter proapoptotischer Effekt auf die Bcr-Abl/Y253F-Mutante ausgeübt wird, ist unklar.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieses Experimentes darauf schließen, dass Bcr-Abl transformierte Zellen einschließlich der Bcr-Abl-Mutanten eine größere Sensitivität gegenüber PHA-739358 aufweisen als nicht transformierte Zellen. Demnach scheinen neben Aurora Kinase auch Bcr-Abl Inhibitionseffekte eine Rolle zu spielen.

Bei Durchführung des entsprechenden Versuchs mit dem Inhibitor AS-703569 konnten nahezu identische Zellzyklus-Profile nachgewiesen werden, jedoch bei niedrigeren Konzentrationen. Bereits 10 nM des Wirkstoffes (durchschnittlicher Bereich der IC_{50} -Werte und beginnende Aurora Kinase Inhibitionsdosis) reichen aus, um eine Akkumulation von polyploiden Zellen mit einem DNA-Gehalt größer $4n$ zu induzieren (Abb.12B, oberes Bild, Spalte 2). Besonders deutlich wird dieses Phänomen bei höheren Konzentrationen (50 nM/100 nM), bei denen Zellen mit normalem $2n$ -Chromosomensatz fast nicht mehr zu detektieren sind (Abb. 12B, oberes Bild, Spalte 3, 4). Die Aktivität der Aurora Kinasen wird bei diesen Konzentrationen komplett inhibiert. Erwartungsgemäß unterscheiden sich die Zellzyklus-Profile von parentalen Ba/F3 und Bcr-Abl positiven Zellen nicht wesentlich, da die hier verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Bcr-Abl Aktivität haben. Dies erklärt auch den geringeren Sub- G_1 -Anteil unter AS-703569-Behandlung, der lediglich auf Aurora Kinase Inhibition zurückgeführt werden kann (Abb. 12B, untere Graphik). Es ist eine interessante Beobachtung, dass reproduzierbar die Bcr-Abl/Y253F-Mutante sensitiver ist. Zusammenfassend sind AS-703569 assoziierte Zellzyklus-Phänomene in Bcr-Abl positiven und negativen Ba/F3-Zellen überwiegend als Aurora Kinase vermittelte Effekte anzusehen.

3.2 Entwicklung resistenter Aurora Kinase Mutanten

Anhand der bisherigen Experimente war es möglich, die in-vitro Effekte von AS-703569 über die Ermittlung der IC_{90} -Werte in Aurora Kinase und Bcr-Abl Kinase abhängige Effekte aufzutrennen. Hierbei zeigte sich, dass der überwiegende Anteil der antiproliferativen und proapoptotische Effekte über Aurora Kinase Inhibition vermittelt wird und Bcr-Abl diesbezüglich eine untergeordnete Rolle spielt. Hinsichtlich PHA-739358 konnte über die IC_{90} -Werte jedoch keine Differenzierung in Bcr-Abl und Aurora Kinase assoziierte Effekte erfolgen. Aus diesem Grund sollten im folgenden Experiment Zellen generiert werden, in denen durch Mutation im Aurora Kinase-Gen die Bindung des Inhibitors unterbunden wird. Führt dies zum signifikanten Anstieg der zur Inhibition benötigten Konzentrationen, kann dadurch die vermutete höhere Relevanz der Aurora Kinasen gegenüber Bcr-Abl bei der Vermittlung der in-vitro Effekte von PHA-739358 und AS-703569 in Bcr-Abl

transformierten Zellen bestätigt werden. In Bezug auf andere Kinasen wie z.B. Bcr-Abl ist das Einführen von Punktmutationen zur Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Kinaseninhibitoren bereits erfolgreich von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden (von Bubnoff et al. 2002). Darüber hinaus konnten Girdler und Kollegen zeigen, dass unter Behandlung mit selektiven Protein-Kinasen-Inhibitoren Resistenzen in Zellzyklus-Kinasen auftreten können, die selbst keine Onkogene sind (Girdler et al., 2008). In einem ersten Schritt wurden anhand der Kristallstruktur des entsprechenden Inhibitor-Aurora Kinase-Komplexes jeweils zwei Aminosäuren in Schlüsselpositionen im Aurora A und B Gen identifiziert, deren gezielte Mutation zur Resistenz führen könnte (Abb.13).

Leucin 210 in Aurora A bzw. entsprechend Leucin 154 in Aurora B ist an der Rückseite der ATP-Bindungsstelle lokalisiert. Es ist dort Teil einer kleinen hydrophoben Tasche, die zwar von klein-molekularen Inhibitoren, nicht aber von ATP besetzt werden kann (Noble et al. 2004). Protein-Kinasen wie CK2 und PKA weisen an dieser Position eine Aminosäure mit raumfordernder Seitenkette auf (Phenylalanin bzw. Methionin) und blockieren dadurch den Inhibitoren den Zugang zu dieser Tasche (Meggio et al. 1995; Mazzorana et al. 2008; Cozza et al. 2009). In Aurora Kinasen findet sich in dieser *gatekeeper*-Position die Aminosäure Leucin mit einer vergleichsweise kleinen Seitenkette, wodurch eine Inhibitorbindung ermöglicht wird. Aus funktioneller Sichtweise (*Gatekeeper*) ist Leucin 210 in Aurora Kinasen somit vergleichbar mit T315 in Bcr-Abl (Modugno et al. 2007). In Homologie zur T315I-Mutation sollte daher die Mutation von Leucin zu Aminosäuren mit großer Seitenkette wie Phenylalanin, Methionin oder auch Tyrosin zur Resistenz führen.

Glycin an Position 216 in Aurora A bzw. an Position 160 in Aurora B sitzt am Boden der sogenannten Scharnierregion (*kinase hinge*) der Kinase. Diese verbindet die N- und C-terminale Domäne miteinander. Mutation zu einer Aminosäure mit ausgedehnter Seitenkette, hier Valin, bewirkt insoweit eine Änderung der sterischen Konformation, dass diese Seitenkette nun zur gegenüberliegenden Seite des Liganden zeigt. Dadurch wird die Inhibitorbindung auf sterischer Ebene direkt verhindert. Die ATP-Bindung bleibt dadurch unbeeinflusst.

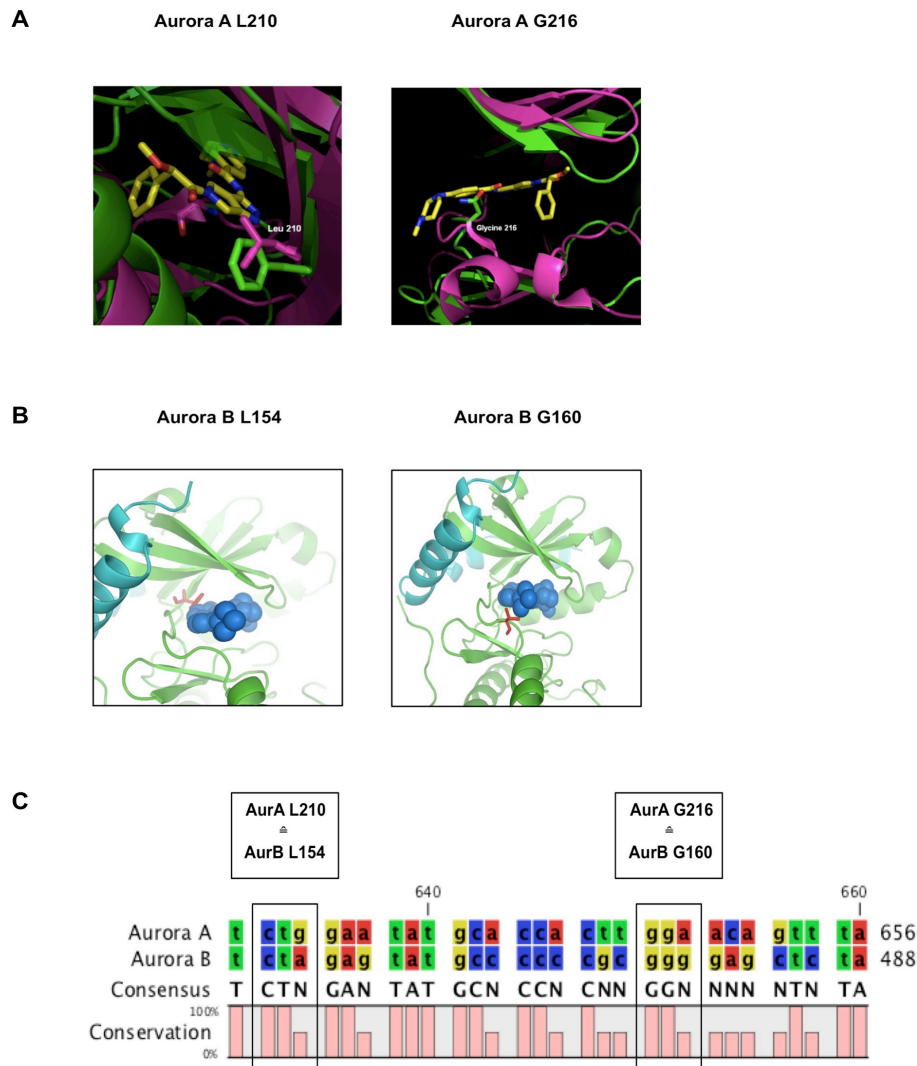


Abb. 13: Kristallstruktur-Analysen von Inhibitor-Aurora Kinase-Komplexen (zur Verfügung gestellt von Richard A. Engh [A] und EMD Serono [B]). Zur Validierung von Aminosäuren im Aurora Kinase-Protein, deren gezielte Mutation zur Resistenz gegen PHA-739358 oder AS-703569 führen sollte, wurden computerbasierende Kristallstruktur-Analysen durchgeführt. Mögliches, auf entsprechenden Punktmutationen basierendes Resistenzpotential konnte für Leucin an Position 210 sowie für Glycin in Position 216 ermittelt werden.

A: Aurora A (pink) im Komplex mit PHA-739358 (gelb), überlagert mit der Kristallstruktur von CK2 (grün). Darstellung der Mutationsstellen L210M und G216V

B: *Xenopus laevis* Aurora B (grün) und INCENP (= *inner centromer protein*; regulatorische Komponente von Aurora B im *chromosomal passenger complex*; türkis) im Komplex mit EMD-Serono Wirkstoff (AS-703569). Darstellung der Mutationsstellen L210M und G216V.

C: Aminosäuresequenz von humanem Aurora A und Aurora B. Die Punktmutationen L210M und G216V in Aurora A entsprechen L154M und G160V in Aurora B.

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Aurora Kinase Mutanten diente als Matrize eine für den Wildtyp codierende c-DNA im pEGFP-C1-Vektor (Abb. 14). Es handelt sich dabei um die humane Wildtyp-Sequenz. Während Aurora A eine Größe von 1212 kDa aufweist, ist Aurora B mit 1035 kDa etwas kleiner.

Dies erfolgte entweder direkt oder auf zwei Schritte aufgeteilt (*2-Step-Mutagenesis*). In Bezug auf Ersteres wurden hierzu entsprechend konstruierte PCR-Primer (Mutations-Primer) verwendet, welche die entsprechenden einzuführenden Sequenzen enthielten. So konnte der gesamte Vektor, inklusive mutiertem Aurora wt-Gen, amplifiziert werden. Bei der *2-step-Mutagenesis* wurde unter Verwendung eines Primers, dessen Sequenz komplementär zur Anfangssequenz des Aurora wt-Gens war und des entsprechenden Mutations-Primers zunächst nur der ausgewählte, zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert. Im 2. PCR-Schritt wurde das Produkt der 1. PCR als *forward*-Primer eingesetzt. Als *reverse*-Primer diente ein Primer, dessen Sequenz komplementär zur Aurora wt-Schlusssequenz war. Dadurch wurde der gesamte Vektor amplifiziert. Anhand definierter Restriktionsendonuklease-Schnittstellen im pEGFP-C1-Vektor (Aurora A: XhoI/BamHI; Aurora B: EcoRI/BamHI) war es möglich, die Mutagenese durch einen Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen und anschließender Gelelektrophorese zu überprüfen. Zur Bestätigung der korrekt mutierten Sequenz wurden diese einer Sequenzanalyse unterzogen.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Subklonierung der mutierten Aurora A/B-Sequenzen in den pBabe-Puro Vektor. Die hierzu entwickelten Klonierungs-Primer wiesen zusätzliche, von der Originalsequenz abweichende, Oligonucleotidesequenzen auf, welche die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen BamHI und SALI in Aurora A sowie BamHI und EcoRI in Aurora B darstellen. Zusätzlich enthielten die *forward*-Klonierungs-Primer neben einer Kozak-Sequenz, die eine höhere Translation und Transkription bei geringerer Hintergrundaktivität bewirkt, auch eine Flag-Sequenz. Diese dient zur Markierung des rekombinanten Aurora-Konstrukts bzw. seines Expressionsproduktes und ermöglicht dadurch die Unterscheidung zum endogenen Aurora-Protein. Da die direkte Umklonierung nur teilweise erfolgreich war, wurde alternativ die mittels PCR amplifizierte mutierte Aurora-Sequenz zunächst entweder in den pCRBlunt[®]-II-TOPO[®] Vektor oder den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor eingefügt. Durch die mit Hilfe der Klonierungs-Primer eingebrachten Schnittstellen für Restriktionsenzyme war eine erneute Isolation des gewünschten Fragments und eine Subklonierung in den pBabe-Puro-Vektor möglich. Folgende Konstrukte wurden auf diese Weise entwickelt und in den weiteren Versuchen

verwendet: pBabe-Puro AurAL210M, pBabe-Puro AurAL210F; pBabe-Puro AurAL210Y, pBabe-Puro AurAG216V, pBabe-Puro AurBL154M, pBabe-Puro AurBG160V. Im Folgenden wurden Phoenix-Zellen zum einen mit den einzelnen Konstrukten, zum anderen mit dem p-Babe-Puro Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die gewonnenen retroviralen Partikel wurden zur Infektion von Ba/F3 p185 wt-Zellen eingesetzt und die Zellen mit Hilfe der Puromycin-Resistenzkassette selektioniert. Ziel war dabei, Zelllinien zu regenerieren, die die entsprechenden Konstrukte mengenmäßig in Höhe des endogenen Proteins exprimieren. Abb. 15 zeigt die Western-Blot-Analysen zur Expressionskontrolle.

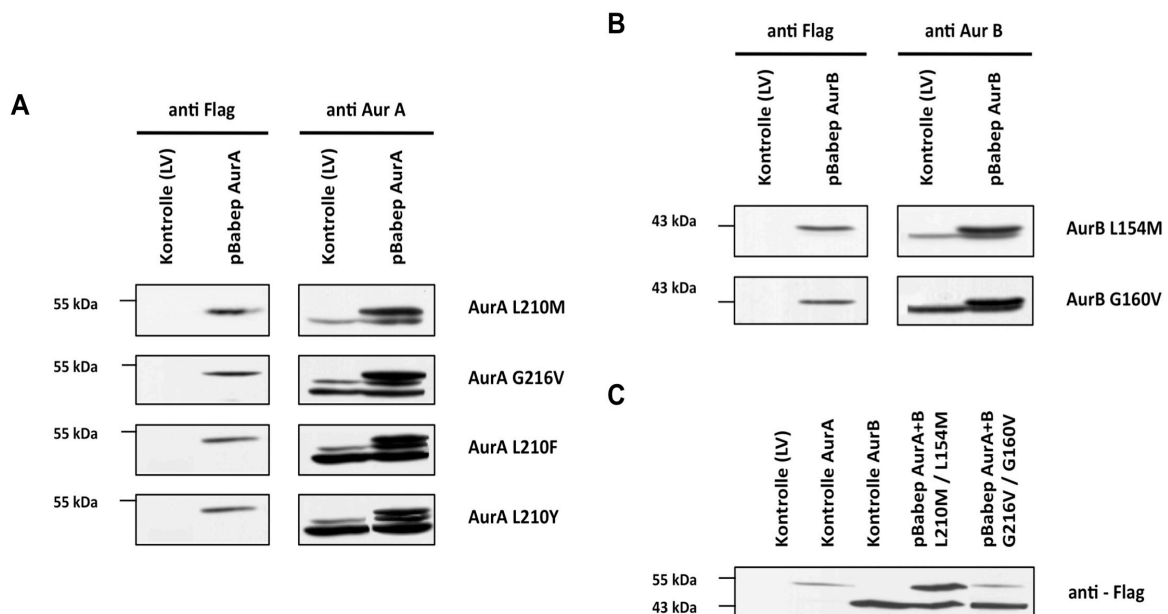


Abb. 15: Expression der rekombinanten Aurora-Konstrukte in Bcr-Abl wt-Zellen. Ba/F3 p185 wt-Zellen wurden retroviral mit den angegebenen pBabe-Puro Aurora-Konstrukten transduziert. Nach Selektion mit Puromycin wurden die erfolgreich transduzierten Zellen expandiert und anschließend zur Lysat-Herstellung eingesetzt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transduzierte Ba/F3 p185 wt-Zellen. Abgebildet ist der immunchemische Nachweis von Flag-markierten exogenen Aurora Proteinen (anti Flag), von exogenen und endogenen Aurora-Proteinen (anti AurA und anti AurB) sowie von β -Aktin (anti β -Aktin) durch Western Blot-Analyse. Die molare Masse von Aurora A beträgt 46 kDa, die von Aurora B 41 kDa.

A: Expressionkontrolle der Aurora A-Konstrukte in Ba/F3 p185 wt-Zellen

B: Expressionskontrolle der Aurora B-Konstrukte in Ba/F3 p185 wt-Zellen

C: Expressionskontrolle von zwei sich entsprechenden Aurora A- und B-Mutanten in Ba/F3 p185 wt-Zellen. Dazu wurden Ba/F3 p185 wt-Zellen simultan mit pBabe-Puro AurAL210M und pBabe-Puro AurBL154M bzw. pBabe-Puro AurAG216V und pBabe-Puro AurBG160V im Verhältnis 1:1 transduziert. Nach Puromycinselektion wurde *Single-Clones* hergestellt, um eine stabile Transduktion von beiden Aurora-Konstrukten in einer Zelle sicherzustellen.

Der Nachweis der Aurora-Konstrukte erfolgte sowohl mittels anti Aurora A- bzw. anti Aurora B-Antikörpern als auch mittels anti Flag-Antikörper, was ein Vergleich der Expressionsstärke von endogenen und exogenen Proteinlevels ermöglichte.

Mengenmäßig betrachtet zeigte sich hierbei eine mindestens vergleichbar hohe Expression der exogenen Flag-Aurora A/B Proteine sowohl untereinander als auch in Bezug auf die endogenen Protein-Levels (Abb. 15A/B, Blot: anti Flag, anti AurA bzw. anti AurB). Anzumerken ist, dass die exogenen Proteinlevels aufgrund des angehängten Flag-Proteins im höheren KD-Bereich detektiert werden (Abb. 15A/B, Blot: anti AurA bzw. anti AurB). In den Kontrollen sind erwartungsgemäß nur die endogenen Proteine nachweisbar. Somit konnten erfolgreich Zelllinien generiert werden, die die ausgewählten Aurora-Konstrukte mengenmäßig in Höhe des endogenen Proteins exprimieren und somit in der Lage sein sollten, das Ansprechverhalten gegenüber der Aurora Kinase Inhibitoren entsprechend zu beeinflussen. Um auszuschließen, dass Effekte einer Aurora Kinase Mutante durch die andere wt-Kinase kompensiert werden können, wurde eine Zelllinie entwickelt, die zwei Konstrukte mit den sich entsprechenden Punktmutationen im Aurora A- und Aurora B-Gen exprimiert (nachfolgend als Doppelmutante bezeichnet). Dazu wurden Ba/F3 p185 wt-Zellen gleichzeitig mit den Konstrukten pBabe-Puro AurAL210M und pBabe-Puro AurBL154M bzw. pBabe-Puro AurAG216V und pBabe-Puro AurBG160V im Verhältnis 1:1 transfiziert und anschließend mittels Puromycin selektioniert. Um zu gewährleisten, dass in einer Zelle beide DNA-Konstrukte stabil transduziert werden konnten, wurden sogenannte *Single-Clones* hergestellt. Nach dem Einsatz einer fest definierten Zellzahl wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte solange verdünnt, bis statistisch gesehen nur noch eine Zelle pro Well vorlag. Nach deren Expansion wurden die verschiedenen *Single-Clones* mittels Western-Blot Analyse einer Expressionskontrolle unterzogen. In den in Abb. 15C untersuchten Klonen kann neben den endogenen Protein-Levels sowohl exogenes Flag-markiertes Aurora A- als auch Flag-markiertes Aurora B-Protein pro analysiertem Klon nachgewiesen werden (Abb. 15C). Sequenzanalysen der Klone bestätigten die Richtigkeit der gewünschten Mutationen in Aurora A und B und damit die erfolgreiche Generierung einer Doppelmutante.

3.3 In-vitro Charakterisierung der verschiedenen Aurora Kinase Mutanten

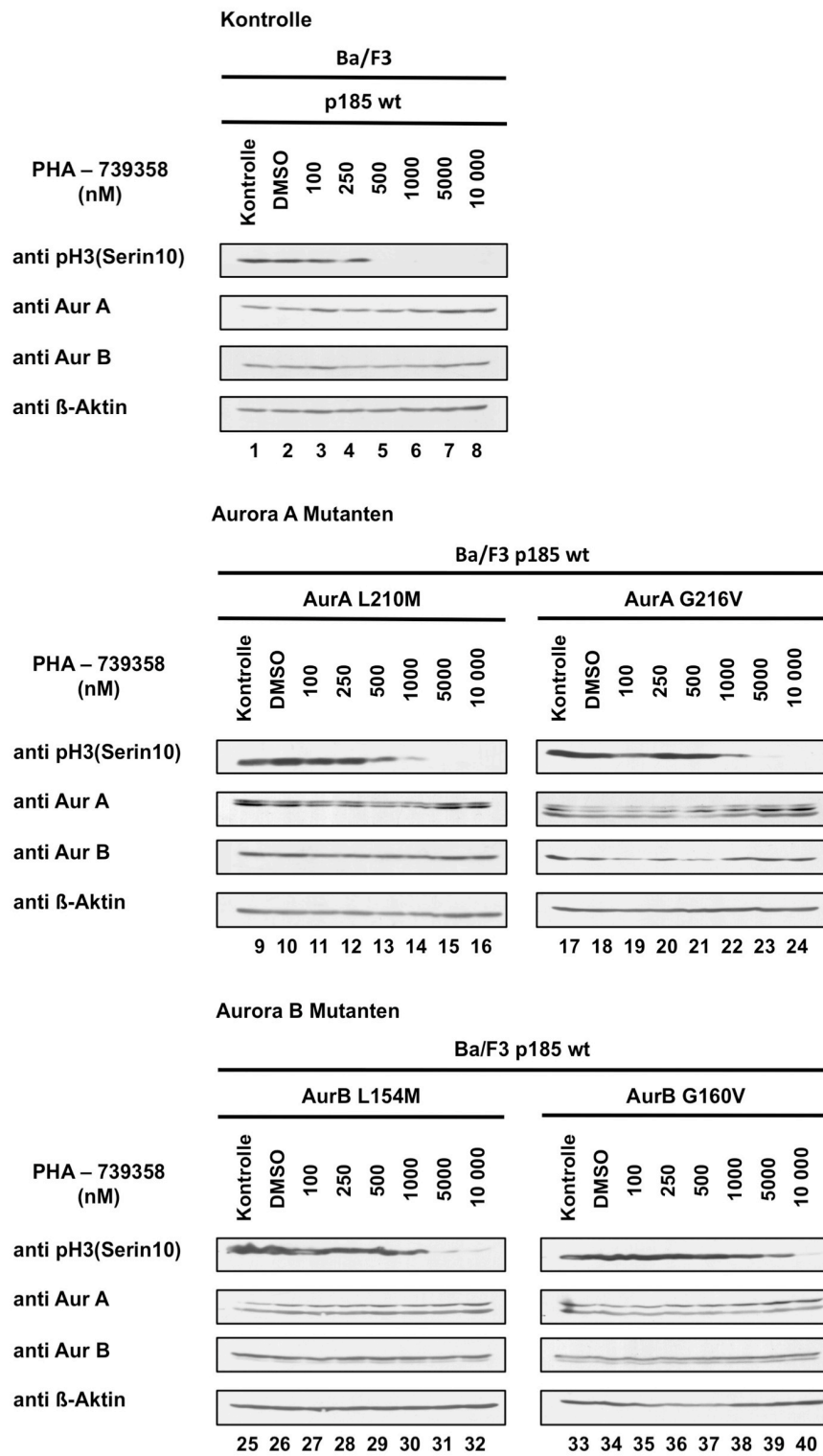
Anhand der computergestützten Strukturanalysen des Inhibitor-Aurora Kinase-Komplexes konnten diverse Aminosäuren identifiziert werden, deren gezielte Mutation möglicherweise zur Resistenz gegenüber den Inhibitoren führen könnte. Nach stabiler Transduktion in Ba/F3 p185 wt-Zellen und erfolgreicher Expressionskontrolle sollte in den folgenden Versuchen die in-vitro Charakterisierung dieser Aurora Mutanten überprüft werden.

3.3.1 Resistenzanalysen

Zur Beantwortung der Frage, welche Punktmutation in welchem Aurora-Protein zu einer Resistenz gegenüber PHA-739358 oder AS-703569 führt, wurde der Phosphorylierungsstatus von Histon 3 als akzeptiertes Substrat der Aurora Kinasen untersucht (Abb. 16; Blot: anti-pH3(Serin10)). Hierzu wurden die Mutanten AurAL210M, AurAG216V, AurBL154M und AurBG160V mit ansteigenden Konzentrationen des entsprechenden Inhibitors inkubiert. Nach Sonifizierung der Lysate erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Als Kontrolle dienten nicht transduzierte Ba/F3 p185 wt/Aur wt-Zellen, die entsprechend behandelt worden sind.

In Abb. 16A sind die Ergebnisse für PHA-739358 dargestellt. In Bezug auf die Kontrollzellen ist eine Konzentration von 500 nM notwendig, um Aurora Kinasen effektiv zu hemmen und damit eine deutliche Abnahme der Histon 3-Phosphorylierung zu induzieren (Abb. 16A, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 5). Diese Beobachtung ist kongruent mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche. Hinsichtlich der Mutanten AurAL210M, AurAG216V und AurB154M sind zur Reduktion der Histon 3-Phosphorylierung und damit zur Aurora Kinase Inhibition 1000 nM erforderlich (Abb. 16A, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 14, 22, 30). Im Vergleich zu den Kontrollzellen werden demnach nur geringfügig höhere Konzentrationen benötigt.

A



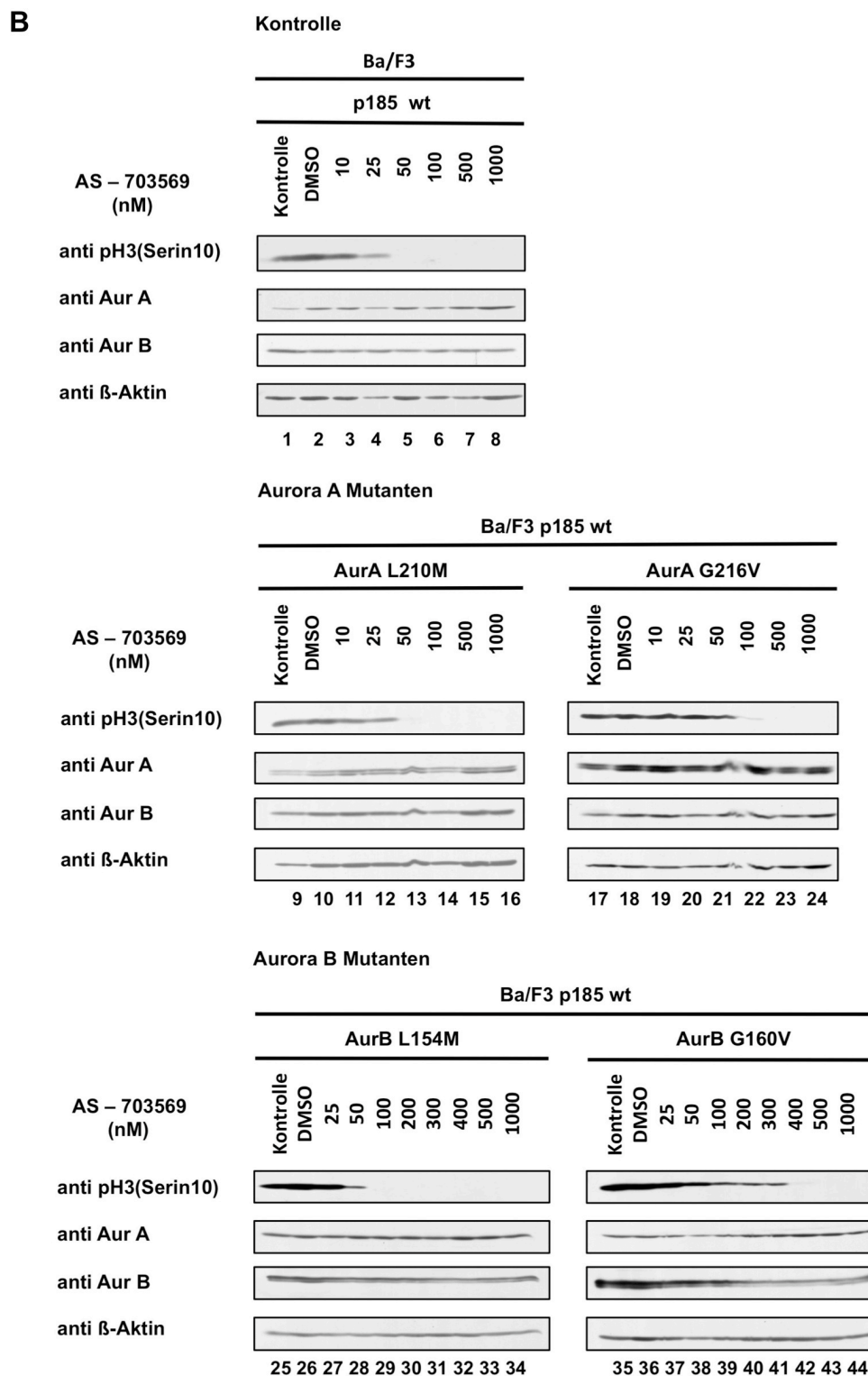


Abb. 16: Expression von Aurora B G160V führt zur Resistenz gegenüber PHA-739358 und AS-703569. AurAL210M, AurAG216V, AurBL154M und AurBG160V exprimierende Ba/F3 p185 wt-Zellen wurden für 2.30 h mit ansteigenden Konzentrationen von PHA-739358 (A) bzw. AS-703569 (B) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit DMSO versetzte Zellen. Zum Vergleich wurden nicht transfizierte Ba/F3 p185 wt-Zellen entsprechend behandelt. Zur Resistenzanalyse wurde der Phosphorylierungsstatus von Histon H3 an Serin 10 analysiert, der als Maß für die Aurora Kinase Aktivität gilt. Gezeigt wird die immunchemische Darstellung von phosphoryliertem Histon H3 (Serin 10) [anti pH3(Serin10)], Aurora A (anti AurA), Aurora B (anti AurB) und β -Aktin (anti β -Aktin) auf der Western Blot-Membran.

Es kann angenommen werden, dass es sich dabei um eine Konsequenz des erhöhten Aurora-Proteingehaltes in den Mutanten handelt (endogenes und exogenes Protein), der einer größeren Menge an Wirkstoffmolekülen zur Inhibition bedarf. Das Einbringen der jeweiligen Punktmutation in das entsprechende Aurora Kinase-Gen scheint jedoch keinen Einfluss auf die Inhibitorbindung zu haben, da anderenfalls mit einem signifikant höheren Anstieg der Inhibitionsdosis zu rechnen wäre. Eine andere Darstellung ergibt sich für die Mutante AurBG160V. Erst bei Behandlung mit 10.000 nM PHA-739358 ist keine Phosphorylierung an Histon 3 mehr detektierbar und die Kinase somit maximal gehemmt (Abb. 16A, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 40). Folglich müssen bei dieser Mutante 20-fach höhere Konzentrationen zur Aurora Kinase Inhibition eingesetzt werden als bei den Kontrollzellen. Aufgrund der Größe dieses Shifts kann dieser nicht durch den höheren Aurora-Proteingehalt in der Zelle begründet werden, sondern lässt auf eine fehlende Verdrängung von ATP durch den Aurora Kinase Inhibitor schließen. Die Gesamtproteinfraktion von Aurora A und B bleibt in allen getesteten Zelllinien auch unter pharmakologischer Inhibition konstant (Abb. 16A, Blot: anti AurA und anti AurB) und schließt somit eine kompensatorische Hochregulation des Aurora A- bzw. B-Proteins aus. Der β -Aktin-Nachweis dient als Ladungskontrolle.

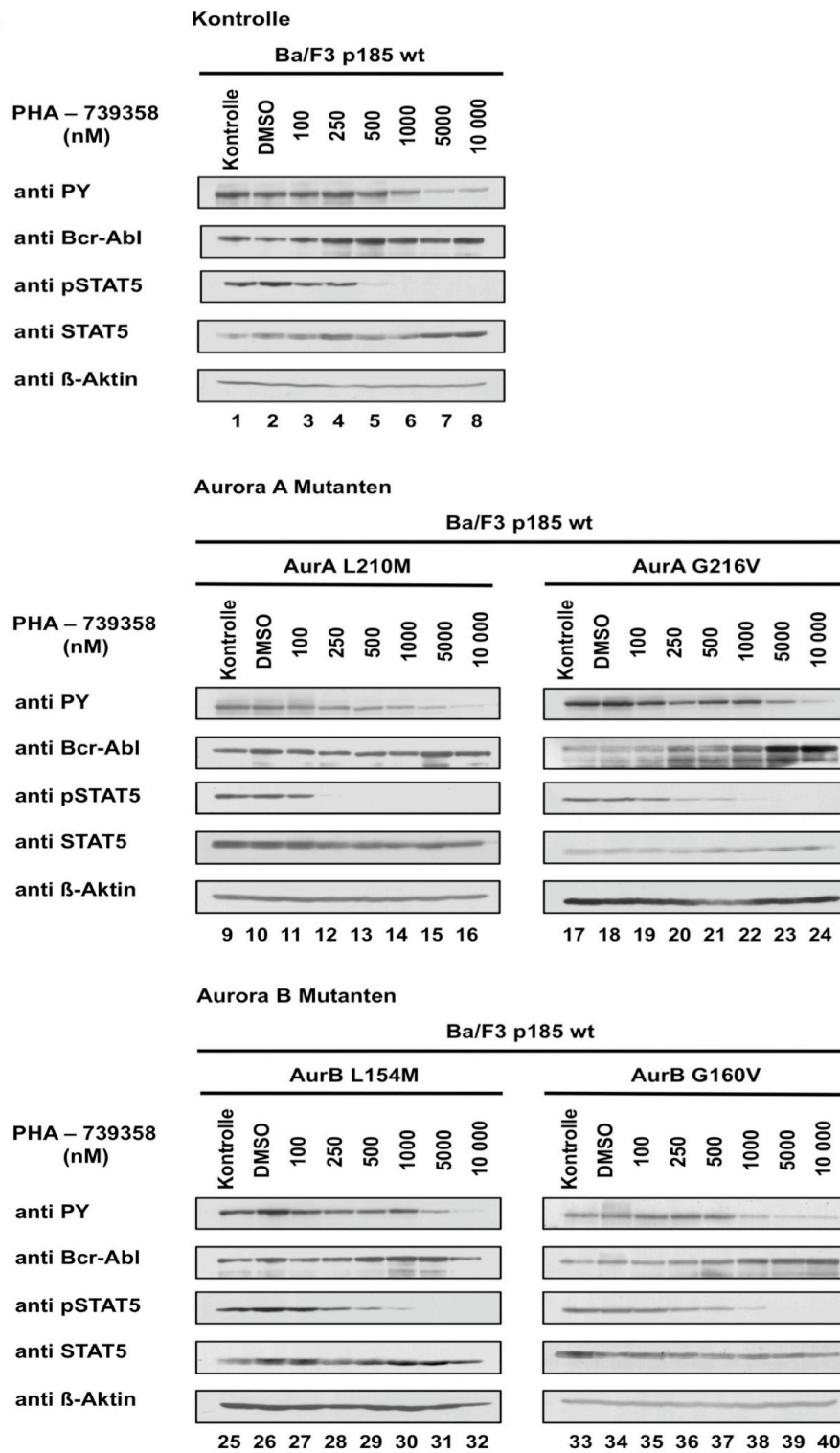
Die Western Blot-Analyse der mit AS-703569 behandelten Kontrollzellen zeigt, dass entsprechend der vorherigen Versuche die Konzentration zur maximalen Aurora Kinase Inhibition im Bereich von 50 nM liegen (Abb. 16B, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 4). Leicht höhere Inhibitionskonzentrationen sind bei den Mutanten AurAL210M, AurAG216V und AurBL154M (Abb. 16B, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 13, 22 und 28) zu beobachten, wobei diese Erhöhung wie oben erklärt als eine Konsequenz des größeren Gesamtproteingehaltes zu werten ist. Analog zum Experiment mit PHA-739358 stellt erneut die AurBG160V-Mutante eine wichtige Ausnahme dar. Erst 400 nM AS-703569 induzieren eine maximale Hemmung der Kinase-Aktivität und damit eine nicht mehr nachweisbare Histon 3-Phosphorylierung (Abb. 16B, Blot: anti pH3(Serin10), Spur 42). Es sind somit 16-fach höhere Inhibitorkonzentrationen zur maximalen Kinaseinhibition notwendig. Dies kann als eine signifikante Erhöhung infolge fehlender inhibitorischer Aurora Kinase Blockade eingestuft werden. Zur Kontrolle gleicher Gesamtproteinlevels wurde Aurora A und B detektiert. β -Aktin fungiert als

Ladungskontrolle. Durch den Versuch konnte AurBG160V eindeutig als resistente Mutante gegenüber den Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 identifiziert werden. Alle anderen Mutationen zeigten keine oder schwächer ausgeprägte Effekte.

Zum Ausschluss einer durch die Transduktion der Aurora-Konstrukte verursachten Veränderung der Bcr-Abl Aktivität und seiner nachgeschalteten Signaltransduktion wurde in allen getesteten Mutanten die Konzentration zur effektiven Bcr-Abl Inhibition nach 2.30 stündiger Inhibitorbehandlung mit PHA-739358 und AS-703569 ausgewertet und mit den Kontrollzellen verglichen (Abb. 17). Anschließend folgte die Western Blot-Analyse. Inhibition der Bcr-Abl Aktivität wurde anhand der Bcr-Abl Autophosphorylierung gemessen. Die zusätzliche Bestimmung des STAT5-Phosphorylierungsstatus erfolgte zur Messung einer intakten nachgeschalteten Signaltransduktion. Abl und STAT5-Levels wurden zum Nachweis gleicher Gesamtproteinmengen dargestellt. Der β -Aktin-Nachweis diente als Ladungskontrolle.

Zusammenfassend lässt sich für beide Inhibitoren festhalten, dass die Expression der verschiedenen Aurora-Konstrukte keinen Einfluss auf die Inhibierung von Bcr-Abl durch diese Substanzen hat. Wie erwartet liegen die Konzentrationen hinsichtlich PHA-739358 im Bereich von 500-1000 nM (Abb. 17A, Blot: anti PY, Spur 14, 22, 29, 38) bzw. bei 250-500 nM für AS-703569 (Abb. 17B, Blot: anti PY, Spur 13, 21, 28, 37). Sie entsprechen damit in etwa den Kontrollvergleichswerten (Abb. 17A, Blot: anti PY, Spur 5; Abb. 17B, Blot: anti PY, Spur 4).

A



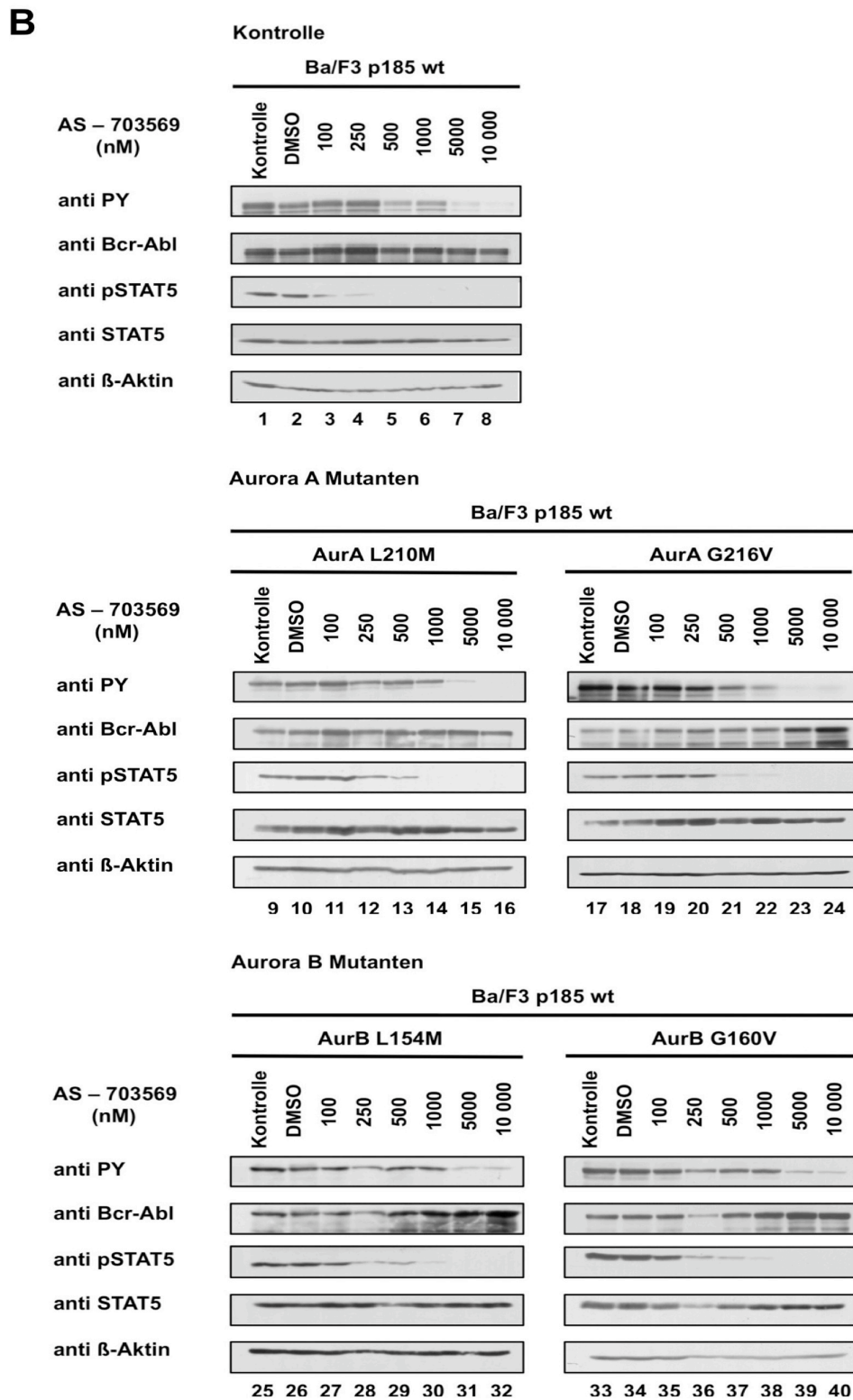


Abb. 17: Expression der Aurora-Konstrukte beeinflusst nicht die Inhibition von Bcr-Abl durch PHA-739358 oder AS-703569. AurAL210M, AurAG216V, AurBL154M und AurBG160V exprimierende Ba/F3 p185 wt-Zellen wurden für 2.30 h mit ansteigenden Konzentrationen von PHA-739358 (A) bzw. AS-703569 (B) inkubiert. Zur Kontrolle wurden sowohl unbehandelte als auch mit DMSO versetzte Zellen verwendet. Vergleichswerte lieferten entsprechend behandelte, nicht transfizierte Ba/F3 p185 wt-Zellen. Abgebildet ist die Detektion von phosphoryliertem Bcr-Abl (anti PY), Bcr-Abl (anti Bcr-Abl), phosphoryliertem STAT5 (anti pSTAT5), STAT5 (anti STAT5) und β-Aktin (anti β-Aktin) auf der Western Blot-Menbran.

Analog zum vorangegangenen Versuch wurden die Mutanten AurAL210F, AurAL210Y sowie die Doppelmutanten AurAL210M/AurBL154M und AurAG216V/AurBG160V anhand des Phosphorylierungsstatus von Histon 3 charakterisiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Charakterisierung weitere Aurora Mutanten

PHA - 739358

Zelllinie	Aurora Mutation	H3(Serin 10) Dephosphorylierung (nM)
p185 wt ⁺	pBabep AurA L210F	1000
p185 wt ⁺	pBabep AurA L210Y	5000

*BCR-ABL positive Zellen

AS - 703569

Zelllinie	Aurora Mutation	H3(Serin 10) Dephosphorylierung (nM)
p185 wt ⁺	pBabep AurA L210F	100
p185 wt ⁺	pBabep AurA L210Y	100
p185 wt ⁺	pBabep AurA L210M AurB L154M	100
p185 wt ⁺	pBabep AurA G216V AurB G160V	1000

*BCR-ABL positive Zellen

Keine der getesteten Mutanten wies jedoch einen höheren Resistenzgrad gegenüber PHA-739358 oder AS-703569 als AurBG160V exprimierende Ba/F3 p185 wt-Zellen auf. Ferner konnten anhand der Doppelmutanten Kompensationsprozesse zwischen Aurora A und B ausgeschlossen werden. So konnte beispielsweise die Resistenz der AurBG160V-Mutante durch Mutation von G216V in Aurora A nicht weiter gesteigert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die These, dass Aurora B in-vitro als die entscheidende Zielstruktur anzusehen ist. Zur Durchführung der weiteren Untersuchungen wurde sich auf zwei Mutanten fokussiert. Neben der resistenten AurBG160V-Mutante kam als Kontrolle die AurBL154M-Mutante zum Einsatz, die keinen Resistenzphänotyp aufweist.

3.3.2 Expression von Aurora B G160V reduziert die antiproliferative Wirkung von Aurora Kinase Inhibitoren

Mit Hilfe der bisher durchgeführten Experimente gelang es, Aurora B G160V als Mutante zu identifizieren, die zur Resistenz gegenüber der Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 führt. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Expression der resistenten AurBG160V-Mutante auf die antiproliferativen Wirkung von Aurora Kinase Inhibitoren ausübt. Ausgehend von den bisherigen Beobachtungen, die auf eine entscheidende Rolle von Aurora B Kinase Inhibition in der Vermittlung der Inhibitoreffekte schließen lassen, ist zu erwarten, dass es durch Expression der resistenten AurBG160V-Mutante und damit erschwerter Inhibitorbindung zur Verschiebung der IC_{50} - sowie der IC_{90} -Werte zu höheren Werten hin kommt. Dafür wurden Ba/F3 p185 wt-Zellen, die endogenes Aurora wt-Protein exprimieren, nicht resistente Aurora B L210M exprimierende Zellen sowie die stark resistente AurBG160V-Mutante mit ansteigenden Inhibitorkonzentrationen 48 h lang kultiviert und anschließend die proliferative Aktivität der Zellen gemessen. Zur Kontrolle wurden sowohl unbehandelte als auch mit DMSO versetzte Zellen verwendet.

Abb. 18 zeigt eine tendenzielle Verschiebung der zur Proliferationshemmung benötigten Inhibitorkonzentrationen in Richtung höherer Werte in Aurora B G160V exprimierenden Zellen verglichen mit den beiden Kontrollzelllinien. Diese Beobachtung tritt sowohl unter Behandlung mit PHA-739358 (Abb. 18A, Pfeil im linken Bild) als auch mit AS-703569 auf (Abb. 18A, Pfeil im rechten Bild) und kann bei 200 nM PHA-739358 bzw. 15 nM AS-703569 als signifikant eingestuft werden (Abb. 18B). Entsprechend sind für eine 50%-ige Inhibition der AurBG160V-Mutante deutlich höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Expression der resistenten AurBG160V-Mutante in Gegenwart beider hier verwendeter Inhibitoren zum Shift in den IC_{50} -Werten führt. Dies bedeutet, dass die verminderte Inhibitorbindung an Aurora B und die damit verbundenen abgeschwächten antiproliferativen Effekte nicht durch die gleichzeitig stattfindende Aurora A Kinase Inhibition vollständig kompensiert werden können. Mit diesem Versuch konnte Aurora Kinase B als maßgebliches in-vitro Target nicht nur von AS-703569 sondern auch PHA-739358 bestätigt werden.

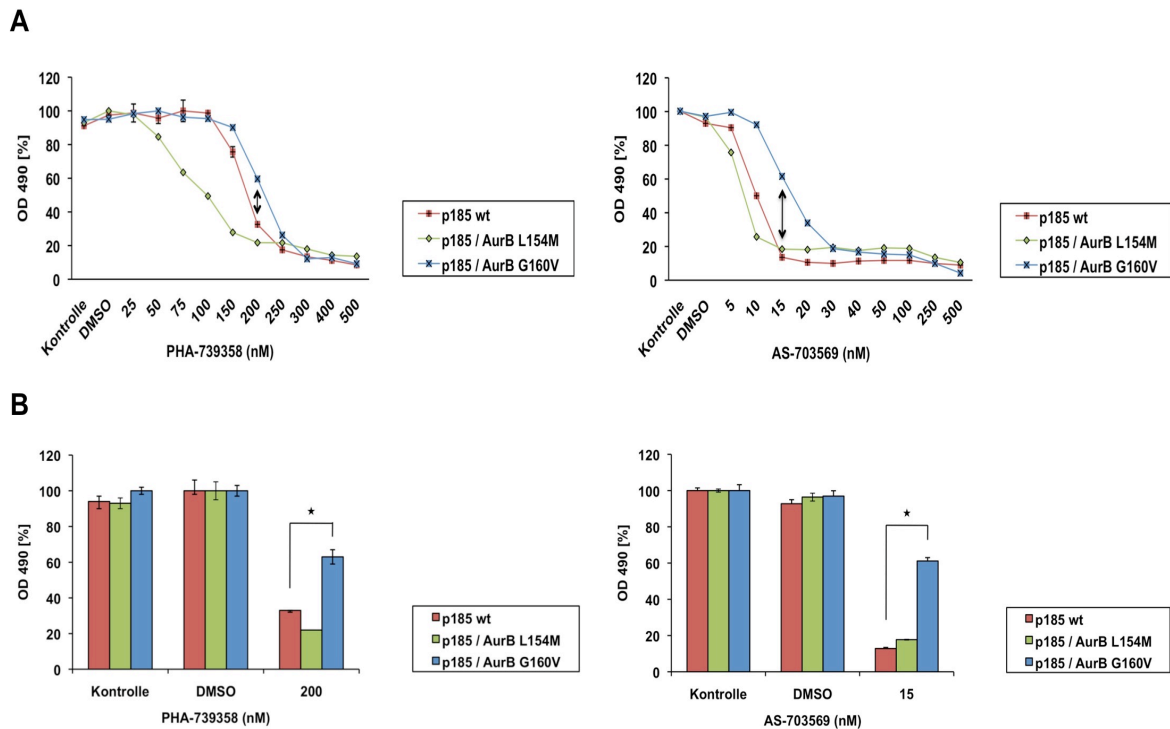


Abb. 18: Resistente Aurora B G160V-Mutante überwindet teilweise den antiproliferativen Effekt von PHA-739358 und AS-703569. Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von PHA-739358 bzw. AS703569 kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Messung der proliferativen Aktivität mittels MTS-Methode. Die Darstellung des inhibitorischen Potentials von PHA-739358 bzw. AS-703569 wurde in Korrelation zu unbehandelten Kontrollzellen durchgeführt. Statistische Analysen erfolgten unter Verwendung des *Student's t tests*, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0.05$ festgesetzt wurde. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen (\pm Standardabweichung).

A: Dosis-Wirkungs-Kurven für PHA-739358 (links) und AS-703569 (rechts)

B: Darstellung der größten Zelllinien-abhängigen Ansprechdifferenz unter Behandlung mit PHA-739358 (links) bzw. AS-703569 (rechts)

3.3.3 Expression der resistenten Aurora B G160V-Mutante führt zur Wiederherstellung Aurora B assoziierter Zellzyklus-Funktionen unter pharmakologischer Aurora Kinase Inhibition

Anhand von Zellzyklusanalysen konnte in den vorangehenden Kapiteln Aurora B als die Kinase vermutet werden, deren Inhibition hauptsächlich für die Akkumulation von polyploiden Zellen mit einem DNA-Gehalt von bis zu 16n verantwortlich ist. Es stellt sich nun die Frage, ob dieser Phänotyp durch Expression der resistenten AurBG160V-Mutante aufgehoben werden kann. Neben Ba/F3 p185 wt-Zellen wurde die nicht resistente AurBL154M-Mutante bzw. die stark resistente AurBG160V-Mutante mit 500 nM PHA-739358 oder 50 nM AS-703569 versetzt. Je eine Kultur wurde direkt geerntet (0 h Zeitpunkt), die

restlichen Zellen wurden nach 4, 8, 12, 24 bzw. 48 h aufgearbeitet. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend PI-gefärbt und einer statischen Zellzyklus-Analyse unterzogen.

Die durchflusszytometrische Analyse liefert für PHA-739358 und AS-703569 nahezu identische Ergebnisse. Der 0 h Zeitpunkt gibt die Zellverteilung innerhalb eines normalen Zellzyklus wieder (Abb. 19A/B, Spalte 1). Bereits nach 4 h (Abb. 19A/B, Spalte 2) ist eine massive Akkumulation von Zellen mit $4n$ -DNA-Gehalt in den Zellzyklus-Profilen aller Zelllinien unabhängig vom Aurora Kinase Mutationsstatus nachweisbar. Dies wird durch den im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt erhöhten G_2/M -Gipfel repräsentiert. Im weiteren Verlauf kann neben einer Größenprogredienz des G_2/M -Gipfels auch das Auftreten von Zellen mit einem DNA-Gehalt von $8n$ bis hin zu $16n$ bei gleichzeitiger deutlicher Reduktion der $2n$ -Zellpopulation (G_1 -Gipfel) nachgewiesen werden (Abb. 19A/B, Spalte 4, 5, 6). Darüber hinaus lässt sich geringe Zunahme der Zellen mit Sub- G_1 -DNA Gehalt feststellen. Aus der prozentualen Auftragung dieses apoptotischen Zellanteils geht hervor, dass durch Behandlung mit 500 nM PHA-739358 (Abb. 19C, linke Graphik) zu jedem Zeitpunkt Apoptose stärker induziert wird als mit 50 nM AS-703569 (Abb. 19C, rechte Graphik). Die Begründung dafür liegt in der zusätzlichen Bcr-Abl Inhibition bei Konzentrationen von 500 nM PHA-739358. Der proapoptotische Effekt des Inhibitors fällt folglich stärker aus als bei alleiniger Aurora Kinase Inhibition. Da bei 50 nM AS-703569 Bcr-Abl nicht inhibiert wird (siehe Kapitel 3.1.3), ist dementsprechend der Anteil apoptotischer Zellen geringer.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Aurora Kinase Inhibition über fehlerhafte Ausbildung des mitotischen Spindelapparates und infolge dessen fehlender chromosomaler Segregation dazu führt, dass die Mehrheit der aus der G_2/M -Phase kommenden Zellen ohne durchgeführte Zellteilung und mit doppeltem Chromosomensatz wieder in den Zellzyklus eintreten. Nur ein sehr geringer Zellanteil geht dagegen in Apoptose. Da sich Polyploidie in allen Inhibitor-behandelten Zellen nachweisen lässt, unabhängig davon, ob die nachweislich zur Resistenz führende AurBG160V-Mutation exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass unter diesen statischen Bedingungen die fehlende Aurora B Blockade durch Aurora A Inhibition kompensiert wird. Daher können trotzdem Aurora Kinase typische Inhibitionseffekte beobachtet werden.

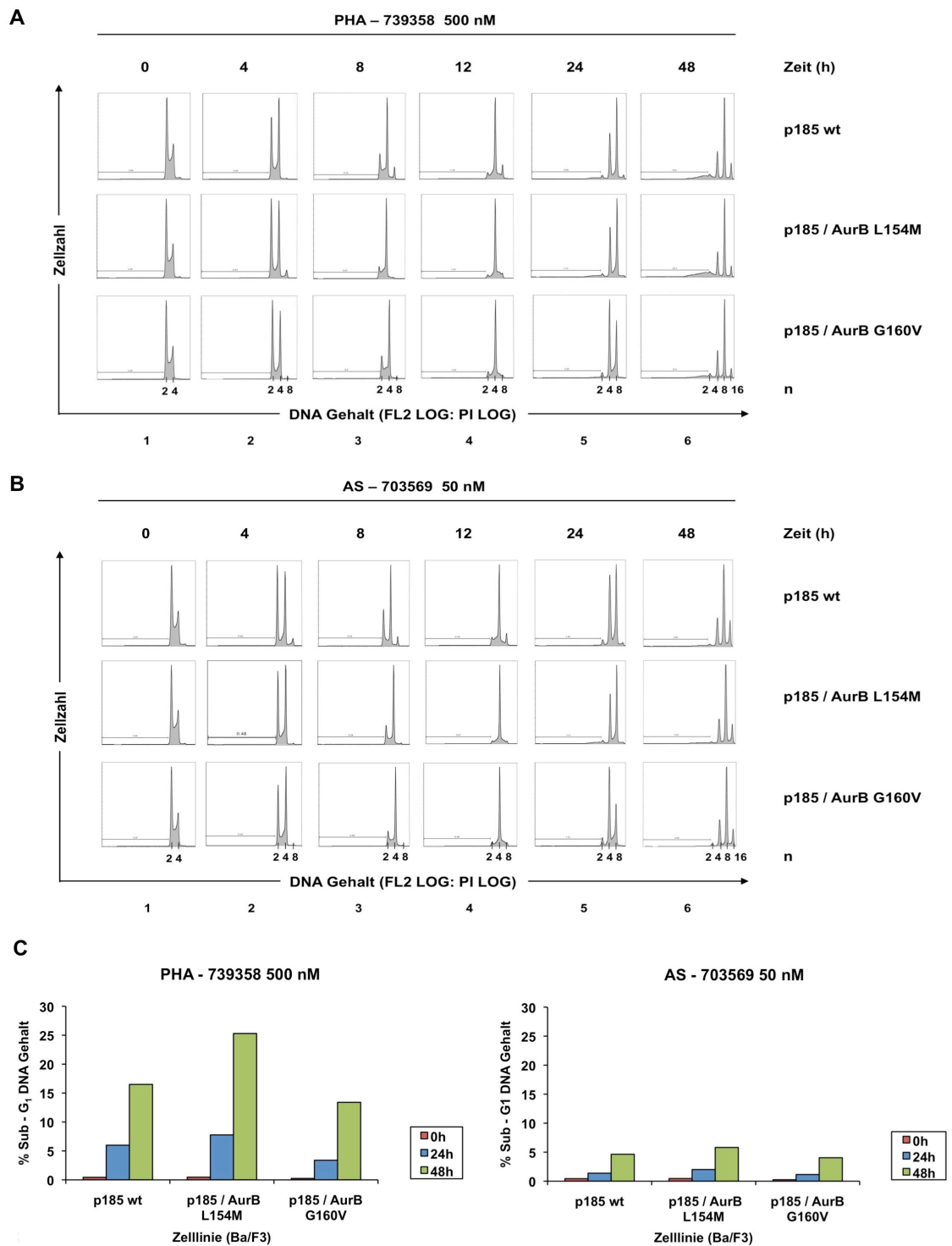


Abb. 19: Expression von Aurora B L154M und Aurora B G160V führt zum Auftreten von Zellzyklusdefekten unter Behandlung mit PHA-739358 oder AS-703569. AurBL154M und AurBG160V exprimierende Ba/F3 p185 wt-Zellen wurden mit 500 nM PHA-739358 bzw. 50 nM AS-703569 versetzt. Je eine Kultur wurde sofort geerntet (0h), die restlichen Zellen wurden nach 4 h, 8 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h aufbereitet. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Ba/F3 p185 wt-Zellen. Mit diesen wurde entsprechend verfahren. Anschließend wurden die Zellen in Ethanol fixiert, PI-gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

PI: Propidiumiodid, Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers
 Statische Zellzyklusanalysen für PHA-739358 (A) und AS-703569 (B). Apoptose-Messung erfolgte durch Bestimmung des Sub-G₁-DNA-Gehaltes.

C: Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen mit Sub-G₁-DNA-Gehalt

Das beschriebene Experiment ließ in Bezug auf die Aurora B-Mutanten keine wesentlichen Veränderungen im Zellzyklus-Profil erkennen. Um gering ausgeprägte Zellzyklus-Effekte der resistenten Aur BG160V-Mutante besser darstellen zu können, wurden die Zellen (Ba/F3 p185 wt/Aur wt, AurBL154M, AurBG160V) im Rahmen eines neuen Versuchs durch Serumentzug (0,5% FCS) in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert (Abb. 20A). Nach 72 h wurde eine Probe pro Zelllinie zur Überprüfung des Synchronisationserfolges geerntet. Die restlichen Zellen wurden gewaschen und anschließend unter Zugabe von 50 nM AS-703569 mittels 20% FCS synchron aus dem Arrest entlassen. Als Kontrolle dienten in den Zellzyklus entlassene Ba/F3 p185 wt-Zellen, denen kein Inhibitor zugesetzt worden war. Die Aufbereitung der Zellen erfolgt nach 15 h, 24 h, 39 h bzw. 63 h. Nach PI-Färbung wurden statische Zellzyklusanalysen durchgeführt.

Abb. 20A gibt das Ergebnis für AS-703569 wieder. Während ohne Inhibitorbehandlung normale Zellzyklus-Profile vorliegen (Abb. 20A, Zeile 1, Spalte 3-6), ist unter Verwendung von AS-703569 in allen Zelllinien wie erwartet Polyploidie als Resultat der Aurora B Inhibition nachweisbar (Abb. 20A, Zeile 2-4, Spalte 3-6). Ferner treten die einzelnen Populationen der polyploiden Zellen (8n, 16n) in den Mutanten als Folge der Aurora-Überexpression im Vergleich zu den Ba/F3 p185 wt/Aur wt-Zellen zeitlich verzögert auf. Hervorzuheben ist, dass sich in den Profilen der AurBG160V-Mutante deutlich größere G₁-Gipfel feststellen lassen als in den Vergleichszellen. Dieser Unterschied tritt erstmals nach 24 h auf (Abb. 20A, Zeile 4, Spalte 4) und liegt beim 63 h-Zeitpunkt in seiner ausgeprägtesten Form vor (Abb. 20A, Zeile 4, Spalte 6, Markierung durch Pfeil). Demnach besitzt ein Großteil der AurBG160V exprimierenden Zellen einen normalen 2n-DNA-Gehalt. Dies lässt darauf schließen, dass diese Zellen in der Lage sind, auch in Gegenwart des Inhibitors den Zellzyklus ohne Zellteilungsdefekte zu durchlaufen.

Zur Überprüfung und Bestätigung dieser Aussage wurden dynamische Zellzyklusanalysen unter identischen Bedingungen (siehe oben) durchgeführt (Abb. 20B). Da sich der zu untersuchende Effekt am deutlichsten nach 63 h zeigte, erfolgte ausschließlich eine Analyse zu diesem Zeitpunkt.

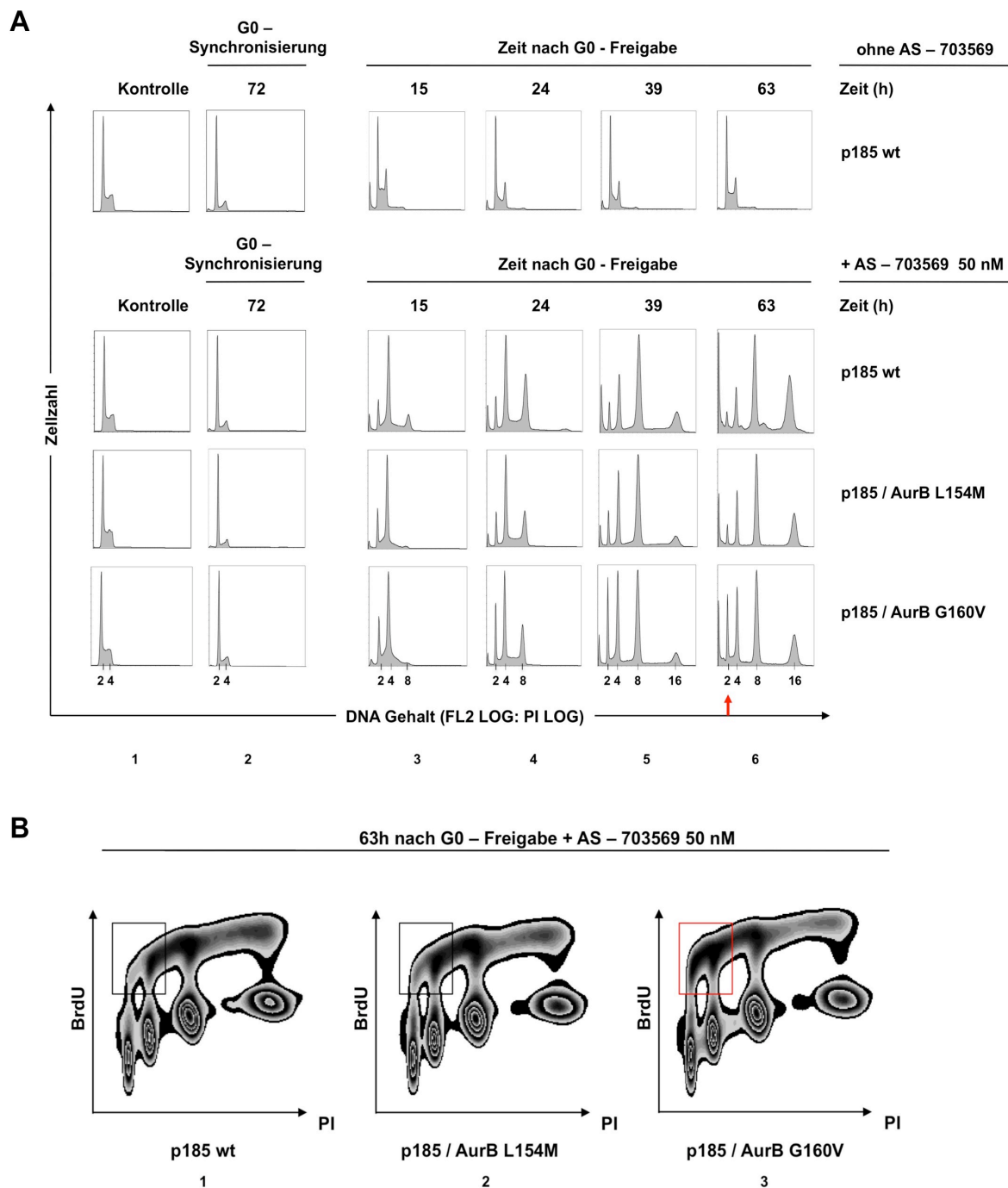


Abb. 20: Resistente Aurora B G160V-Mutante bewirkt durch Wiederherstellung von Aurora B-Aktivität eine Teilnormalisierung des Zellzyklus. AurBL154M und AurBG160V exprimierende Ba/F3 p185 wt-Zellen sowie nicht transfizierte Ba/F3 p185 wt-Zellen wurden durch Serumentzug in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Nach 72 h wurden diese mittels 20% FCS und unter Zugabe von 50 nM AS-703569 reaktiviert. Je eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), die übrigen Zellen wurden nach 15 h, 24 h, 39 h bzw. 63 h zur Weiterverarbeitung gewonnen. Als Kontrolle dienten G₀-synchronisierte, nicht transfizierte Ba/F3 p185 wt-Zellen, die ohne Inhibitorzugabe nach 72 h aus dem Arrest entlassen wurden.

A: statische Zellzyklusanalyse für AS-703569. PI: Propidiumiodid, Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers

B: dynamische Zellzyklusanalyse für AS-703569 für den 63 h Zeitpunkt. PI: Propidiumiodid, Kanal 1 des Durchflusszytometers; BrdU (Bromdesoxyuridin)-Aufnahme bzw. Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers

Vor der Ernte wurde jede Kultur für 60 min mit 10 μ M BrdU inkubiert. Dabei handelt es sich um ein Tymidin-Analogon, das während der S-Phase in die zelluläre DNA integriert wird. Solche BrdU-markierten Zellen können durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten BrdU-spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer registriert werden. Eine gleichzeitige Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung mit dem Farbstoff PI ermöglicht es, ein Voranschreiten BrdU-markierter und BrdU-negativer Zellen im Zellzyklus zu beurteilen. Abb. 20B zeigt die dynamische Zellzyklusanalyse der mit 50 nM AS-703569 behandelten Zelllinien Ba/F3 p185 wt/Aur wt, AurBL154M und AurBG160V zum 63 h Zeitpunkt. Im Hinblick auf die Ba/F3 p185 wt/Aur wt-Zellen und die nicht resistente AurBL154M-Mutante befinden sich zu diesem Zeitpunkt bei einer synchron aus dem Arrest entlassenen Kultur die Mehrzahl der Zellen in der S-Phase, in der durch Endoreduplikationsvorgänge der 4n-DNA-Gehalt auf 8n verdoppelt wird. In Abb. 20B Bild 1 und 2 wird dies durch den „schwarzen Bogen“ zwischen der 4n und 8n-Population verdeutlicht. Nur vereinzelt finden sich Zellen mit 2n DNA-Gehalt in der S-Phase (schwarzer Kasten). Dies lässt darauf schließen, dass ein Durchlaufen des Zellzyklus mit anschließender Zellteilung fast nicht mehr stattfindet. Somit spiegeln diese Zellzyklus-Verhältnisse den klassischen, durch AS-703569 via Aurora B Inhibition induzierten Phänotyp (Zellteilungsdefekte und Endoreduplikation) wieder.

Im Gegensatz dazu findet sich bei der mit 50 nM AS-703569 behandelten AurBG160V-Mutante 63h nach Arrest-Entlassung eine andere S-Phasen-Verteilung. So sind neben einem kleinen Anteil polyploider Zellen insbesondere solche mit normalem 2n-DNA-Gehalt in der S-Phase nachweisbar (Abb. 20B, Bild 3, roter Kasten). Voraussetzung dafür ist eine große 2n-Ausgangspopulation in der G₁-Phase. Dies ist nur möglich, wenn Zellen den Zellzyklus ohne Zellteilungsdefekte durchlaufen können. Die Beobachtung impliziert, dass durch Expression von AurBG160V annähernd normale DNA-Gehalt-Profile wiederhergestellt werden können, was auf eine verminderte Inhibierung der Aurora B-Aktivität zurückzuführen ist. Dieser Versuch bestätigt eindeutig die Resistenz der AurBG160V-Mutante gegenüber dem Inhibitor AS-703569.

4 Diskussion

Ziel der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie ist die Induktion eines möglichst kompletten zytogenetischen und molekularen Ansprechens und die damit verbundene anhaltende, vollständige Remission des Patienten. In klinischen Phase 2- und 3-Studien konnte die Wirksamkeit von Imatinib in allen drei Krankheitsphasen der CML dokumentiert werden, wobei die höchsten Ansprechraten in Patienten mit neu diagnostizierter, unbehandelter CML in der chronischen Phase verzeichnet werden konnte (Druker et al. 2001; Kantarjian et al. 2002a; Sawyers et al. 2002; Talpaz et al. 2002; Hughes et al. 2003; O'Brien et al. 2003; Druker et al. 2006; Hochhaus et al. 2008b; von Bubnoff et al. 2010). Hier erreichten nach 18 Monaten unter Erstlinientherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib über 96% der Patienten eine komplette hämatologische und über 76% eine komplette zytogenetische Remission (O'Brien et al. 2003). In der akzelerierten Phase sowie in der Blastenkrise sind die Remissionsraten unter Imatinib-Therapie zwar signifikant besser als unter konventioneller Chemotherapie, dennoch erwies sich der Wirkstoff als weniger effektiv im Vergleich zu den Ergebnissen bei Patienten in der chronischen Phase (Sawyers et al. 2002; Talpaz et al. 2002; Kantarjian et al. 2005; Palandri et al. 2008; Palandri et al. 2009). Daher gilt Imatinib derzeit als Goldstandard in der Therapie der CML in chronischen Phase. Als zunehmendes, klinisch relevantes Problem wird jedoch die steigende Zahl primärer und sekundärer Resistenzen unter therapeutisch eingesetzten Kinaseninhibitoren gewertet. Während primäre hämatologische Resistenz in der frühen Phase der CML in unter 5% der Fälle auftritt und damit ein seltenes Ereignis darstellt, steigt die Zahl bei fortgeschrittener CML nach vier Jahren auf 45% bis 70% in der akzelerierten Phase bzw. 90% in der Blastenkrise an (Daley et al. 1990; Druker et al. 2001; Kantarjian et al. 2002b; Kantarjian et al. 2002c; Ottmann et al. 2002). Neben zytogenetischen Aberrationen oder Amplifikationen des Bcr-Abl-Gens sind hierfür vor allem Mutationen in der Bcr-Abl-Kinasedomäne verantwortlich. Diese verhindern eine kompetitive und selektive Blockade der ATP-Bindungsstelle von Bcr-Abl durch Imatinib und können teilweise auch von Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation nicht überwunden werden. Insbesondere in diesen Fällen sind Therapieoptionen für resistente Patienten zwingend erforderlich. Im Rahmen der Entwicklung von Bcr-Abl

Inhibitoren der dritten Generation konnten Wirkstoffmoleküle identifiziert werden, die auch gegenüber bislang nicht überwindbaren Resistenzmutationen wie der Bcr-Abl/T315I Mutation Aktivität zeigten. Interessanterweise erstreckte sich deren Wirkungsprofil nicht nur auf Bcr-Abl sondern schloss auch andere Zielstrukturen wie die zur Familie der Serin-Threonin Kinase gehörenden Aurora Kinasen mit ein. Diese sind Schlüsselregulatoren in der Mitose und u.a. verantwortlich für Centrosomen-Maturation/Seperation, Eintritt in die Mitose, Aufbau und Stabilisierung der mitotischen Spindel, chromosomale Segregation und korrekten Ablauf der Zytokinese (Andrews et al. 2003; Carmena et al. 2003; Keen et al. 2004; Fu et al. 2007; Vader et al. 2008). Zudem konnte Genamplifikation und/oder Überexpression von Aurora Kinasen bei verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung bei der Tumorentstehung schließen lässt (Bischoff et al. 1998; Tatsuka et al. 1998; Tanaka et al. 1999; Jeng et al. 2004; Huang et al. 2008; Dar et al. 2010). Die Identifikation ihrer onkogenen Potenz einerseits, sowie ihre Involvierung in verschiedene Abläufe des Zellzyklus als Voraussetzung für eine korrekte Zellproliferation andererseits ließen sie in den Fokus der Krebstherapie rücken. Einige der entwickelten Aurora Kinase Inhibitoren konnten bereits in klinischen Phase I- und II-Studien erfolgreich eingesetzt werden. Vielversprechende Ergebnisse lieferten hierbei die Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS703569 (Burriss 2006; De Jonge et al. 2006; Renshaw et al. 2007; Sonet et al. 2008; Cohen et al. 2009; Cortes-Franco et al. 2009). Ungeklärt bleibt bislang jedoch die Frage, ob deren klinisch nachgewiesene Wirksamkeit bei Bcr-Abl positiver CML auf Inhibition von Bcr-Abl oder Aurora Kinasen zurückzuführen ist. Daher stand die Charakterisierung der Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS703569 in vitro bezüglich ihres Effekts auf die Tyrosinkinase Bcr-Abl, auf die einzelnen Mitglieder der Aurora Kinasen Familie sowie die Auswirkung möglicher Resistenzmutationen auf die Wirksamkeit dieser Substanzen im Zentrum dieser Arbeit.

4.1 PHA-739358 und AS-703569 zeigen Aktivität gegenüber Imatinib resistenten Bcr-Abl-Mutanten

Der Nachteil einer sequentiellen Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren besteht in der Ausübung eines starken Selektionsdrucks für substanzspezifische,

resistente Zellklone, sei es durch Selektion präexistenter Subklone oder durch De-novo-Mutationen unter laufender Therapie. Die T315I-Mutation ist mit fast 15% die häufigste Mutation im Bcr-Abl-Gen, gefolgt von den P-Loop-Mutationen Y253H und Y253F. F317L ist mit nahezu 4% etwas seltener (Apperley 2007b; Apperley 2007a). Während T315I eine Pan-Resistenz gegenüber den gängigen Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib aufweist, zeichnen sich P-Loop-Mutationen durch Resistenz gegenüber Imatinib und Nilotinib und F317L-Mutationen durch Resistenz gegenüber Dasatinib aus. Mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 konnte eine dosisabhängige, signifikante Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion nicht nur in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen, sondern auch bei Expression der klinisch relevanten, oben genannten Bcr-Abl-Mutanten erreicht werden. Folglich hatte der Bcr-Abl-Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Sensitivität hinsichtlich dieser Aurora Kinase Inhibitoren. Die Wirksamkeit dieser Substanzen bei IM-resistenter CML bestätigte sich auch in klinischen Studien mit PHA-739358 bei Patienten mit Therapie refraktärer CML. Bei einer Dosierung von 330 mg/m² konnte in einigen Patienten, darunter auch Träger der T315I-Mutation, ein sowohl hämatologisches als auch zytogenetisches Ansprechen beobachtet werden (Paquette et al. 2007; Cortes-Franco et al. 2009; Gontarewicz et al. 2010; Steeghs et al. 2010). Anhand von Kristall-Struktur-Analysen konnte der Bindungsmechanismus von PHA-739358 an Abl-T315I entschlüsselt und somit offengelegt werden, wie diese Substanz IM-Resistenzmutationen überwindet. Imatinib bindet an die inaktive Konformation der Abl-Kinase und bedingt dadurch deren Stabilisierung. Dabei interagiert es mit aromatischen Seitenketten des konservierten Phe innerhalb des Asp-Phe-Gly (DFG) Motivs. Dadurch wird die Aktivierungsschleife aus ihrer normalen Position verdrängt und in eine substratähnliche Konformation, die *DFG-out* Konformation, überführt (Schindler et al. 2000). Die Mutation des *gatekeeper* Threonins an Position 315 zu Isoleucin führt auf Grund einer größeren Seitenkette zur sterischen Hinderung und folglich zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Imatinib und der Seitenkette von Threonin. PHA-739358 hingegen lagert sich an die ATP-Bindungstasche der in aktiver Konformation vorliegenden Abl-Kinase an. Drei Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Proteinerückgrat der Schanierregion sorgen für die notwendige Stabilität. Der Gatekeeper T315 wird

dabei hufeisenförmig umschlossen und ist demnach in keinster Weise in die Bindungsvorgänge involviert, weshalb dessen Mutation auch keine Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit von PHA-739358 hat (Modugno et al. 2007). Interessanterweise konnte die Gruppe um Moll in Kinasierungsversuchen sogar eine stärkere Inhibition der Substratphosphorylierung in T315I mutiertem Abl-Protein im Vergleich zu wt-Protein nachweisen. Quantifizierungsversuche bestätigten die höhere Affinität zur T315I-Mutante. Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf die zusätzliche Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen dem Pyrolopyrazol-Gerüst von PHA-739358 und der Seitenkette des mutierten Isoleucin 315 im Abl-Protein zurückzuführen (Modugno et al. 2007). In unserem Modell konnte dieser Effizienzunterschied in der Inhibition IM-resistenter Mutanten im Vergleich zu wt-Bcr-Abl nicht bestätigt werden. Die Induktion der biologischen Effekte der hier eingesetzten Aurora Kinase Inhibitoren erfolgte bei signifikant unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Während durchschnittlich 150 nM PHA-739358 zur halbmaximalen Proliferationsinhibition benötigt wurden, konnte der gleiche Effekt bereits bei im Durchschnitt 15-fach niedrigeren AS-703569 Konzentrationen erzielt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten. Für Ba/F3 Zellen, die die p210 Variante des Bcr-Abl-Proteins exprimieren, liegen IC_{50} -Werte für PHA-739358 im vergleichbaren Bereich (Gontarewicz et al. 2008). Auch Varianz des transformierenden Onkogens führte zu keiner wesentlichen Änderung der zur halbmaximalen Proliferationsinhibition benötigten Konzentration. So konnte in c-Myc-exprimierenden humanen Lymphomzellen ein kompletter Proliferationsblock bei 12,5 nM beobachtet werden (den Hollander et al. 2010). Die verfügbare Literatur verdeutlicht somit, dass verschiedene Vertreter dieser Substanzklasse in unterschiedlichen Zellsystemen im nanomolaren Bereich aktiv sind (Harrington et al. 2004; Tyler et al. 2007; Wilkinson et al. 2007; Wang et al. 2010). Dies lässt die Vermutung zu, dass die durch Aurora Kinase Inhibitoren induzierten antiproliferativen und proapoptotischen Effekte hauptsächlich auf Aurora Kinase Inhibition und weniger auf die Inhibition anderer Kinasen wie Bcr-Abl, Jak2, FLT3 oder c-Myc zurückzuführen sind. Aurora Kinasen und nicht Bcr-Abl müssten demnach als maßgebliche Zielstruktur in Bcr-Abl positiven Zellen angesehen werden. Diese Hypothese wurde unserer weiteren Arbeit zugrunde gelegt und galt es, nachfolgend zu überprüfen.

4.2 Aurora Kinase B ist die entscheidende Zielstruktur von PHA-739358 und AS-703569 in Bcr-Abl positiven Zellen

Anhand diffizil eingesetzter Konzentrationen von AS-703569 gelang es, eine Auftrennung der Inhibitoreffekte in Aurora Kinase und Bcr-Abl Kinase vermittelte Effekte vorzunehmen. Unsere Untersuchungen zeigten eine effiziente Proliferationsinhibition bei Verwendung Aurora Kinasen-, nicht aber Bcr-Abl inhibierenden Konzentrationen in Bcr-Abl transformierten Zellen. Ersteres wurde bereits ab einer Konzentration von 25 nM erzielt und lag damit 20fach niedriger als die zur Bcr-Abl Inhibition benötigte Konzentration. Dieses Ergebnis konnte durch statische Zellzyklusanalysen bekräftigt werden. Behandlung mit Aurora Kinasen-, nicht aber Bcr-Abl inhibierenden AS-703569-Konzentrationen bewirkte die Induktion von Zellteilungsdefekten in Form irreversibler Polyploidie. Ferner konnten identische Zellzyklusphänome auch in nicht Bcr-Abl transformierten Zellen nachgewiesen werden, was eindeutig für Aurora Kinasen inhibitionsvermittelte Effekte spricht. Ähnliche Ergebnisse fanden sich für den Inhibitor PHA-739358. Obwohl hier die Inhibition von Bcr-Abl und Aurora Kinasen bei ähnlichen Konzentrationen nachgewiesen wurde, zeigte sich identisch zu den AS-703569 induzierten Zellzyklusprofilen eine massive Polyploidie sowohl in Bcr-Abl negativen als auch positiven Zellen. Dies weist darauf hin, dass auch die Zytotoxizität dieses Inhibitors maßgeblich auf Hemmung Aurora Kinase assoziierter Effekte beruht. Betrachtet man bisher veröffentlichte Daten, so lassen sich anhand des veränderten Zellzyklusprofils Rückschlüsse auf die Relevanz der verschiedenen Aurora Kinase-Isoformen bei Vermittlung von Inhibitor assoziierten Effekten ziehen. Knock-down Experimente erbrachten erste Ergebnisse zur Differenzierung des Aurora A- bzw. Aurora B-vermittelten Phänotyps (Ditchfield et al. 2003; Hata et al. 2005). Während Aurora A Inhibition zu einem erhöhten mitotischen Index in Folge eines mitotischen Arrests (G_2/M -Block) sowie zu einem vermehrten Auftreten von Spindeldefekten führte, ist Aurora B Inhibition mit der Dephosphorylierung von Histon 3 und der Akkumulation polyploider, multinukleärer Zellen als Konsequenz von Zellteilungsdefekten vergesellschaftet (Kawasaki et al. 2001; Abe et al. 2006; Barr et al. 2007; Fu et al. 2007; Hoar et al. 2007; Manfredi et al. 2007; Carpinelli et al. 2008). Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass PHA-739358 und AS-703569 vermutlich einen auf Aurora B

Inhibition basierenden zellulären Phänotyp konstituieren. Diese Erkenntnis identifiziert Aurora B als maßgebliches in-vitro Target beider Kinaseninhibitoren. Charakterisierungen anderer dualer Aurora Kinase Inhibitoren wie Hesperadin, ZM447439 und VX680 bestätigen dies (Ditchfield et al. 2003; Hauf et al. 2003; Harrington et al. 2004). Alle drei Wirkstoffe induzierten eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades des Biomarkers Histon 3 an Serin 10 während der Mitose. Darüber hinaus konnten in entsprechend behandelten Zellen Aurora B inhibitionstypische Zellzyklusphänomene nachgewiesen werden. Dies wirft die Frage auf, weshalb duale Aurora Kinase Inhibitoren ausschließlich einen durch Aurora B-Inaktivität charakterisierten Phänotyp induzieren, obwohl sich ihre Aktivität potentiell auch gegen Aurora Kinase A richtet. Ditchfield et al. deutete an, dass duale Aurora Kinase Inhibitoren in vivo ausschließlich gegenüber Aurora B aktiv sind und daher lediglich Aurora B-assoziierte Phänotypen induziert werden können (Ditchfield et al. 2005). Yang et al. konnte dies widerlegen, indem die Arbeitsgruppe postulierte, dass Aurora B-Inaktivierung zur Ausschaltung Aurora A assoziierter Funktionen in der Mitose führt, obwohl Aurora A im Hinblick auf die Signalkaskade in der Mitose Aurora B vorgeschaltet ist (Yang et al. 2005). Selektive Inhibition von Aurora A verursacht eine Aurora B abhängige Aktivierung des Spindelkontrollpunkts und folglich eine Arretierung abnormer Zellen in der Mitose. Wird Aurora B zusätzlich inaktiviert, erfolgt eine Unterbrechung dieser Aktivierungskaskade. Veränderte Zellen können die Mitose ungehindert durchlaufen, entwickeln aber in Folge der defekten Zellteilung via DNA-Endoreduplikation den Aurora B inhibitionstypischen, polyploiden Phänotyp (Yang et al. 2005). Im Gegensatz dazu stehen aktuelle Daten der Brümmendorf Arbeitsgruppe. Hier konnte durch Einsetzen Aurora A und Aurora B inhibierender Konzentrationen des Wirkstoffes PHA-739358 ein kompletter G₂/M-Arrest in humanen hepatozellulären Karzinomzellen beobachtet werden, während niedrige, nur Aurora A inhibierende Dosen, Polyploidie induzierten (Benten et al. 2009). Vor dem Hintergrund der verfügbaren Literatur wird jedoch deutlich, dass nicht nur die Analyse Aurora vermittelter Effekte sondern auch die Wirksamkeit von Aurora Kinase Inhibitoren gegenüber off-target Kinasen berücksichtigt werden muss. Die Aktivität von AS-703569 richtet sich neben Aurora Kinasen auch gegen die Tyrosinkinase FLT3. Versuche mit diesem Inhibitor zeigten, dass die Dauer der phospho-Histon 3 Inhibition in der FLT3 ITD mutierten AML Zelllinie MV4-11

deutlich länger ausfällt als in MIAPACa-2 Tumorzellen. Dies lässt darauf schließen, dass die gleichzeitige Inhibition mehrerer biologisch relevanter Kinasen durch Vertreter dieser Substanzgruppe synergistische und damit stärkere proliferationshemmende Effekte ausüben kann (McLaughlin et al. 2009). Ähnliche Beobachtungen konnten anhand von in-vitro Versuchen mit PHA-739358 getätigt werden. Während in wt-Zellen lediglich die Akkumulation von Zellen mit einem DNA-Gehalt größer $4n$ induziert wurde, konnte in Bcr-Abl positiven Zellen neben Polyploidie auch eine massive Zunahme der apoptotischen Fraktion nachgewiesen werden (Gontarewicz et al. 2008). Die Autoren schlussfolgerten, dass in-vitro Effekte von PHA-739358 auf eine Kombination der Inhibition von Bcr-Abl und Aurora Kinasen beruhen. Passend dazu fand sich auch in den von uns durchgeführten Zellzyklusanalysen mit PHA-739358 und AS-703569 eine Zunahme apoptotischer Zellen unter Verwendung von Konzentrationen, welche Bcr-Abl und Aurora Kinasen im gleichen Maße inhibieren. Dezentere Unterschiede in der Apoptoseinduktion in Abhängigkeit des Bcr-Abl-Mutationsstatus unterstützten diese Annahme zusätzlich. Nach unseren Ergebnissen ist die Bcr-Abl Inhibition jedoch keine notwendige Voraussetzung für die biologische Aktivität dieser Substanzen, da bereits niedrige, ausschließlich Aurora Kinasen inhibierende Konzentrationen deutliche antiproliferative und proapoptische Effekte hervorrufen. Ein weiterer, diese These bekräftigender Aspekt stellt die Dominanz Aurora B assoziierter über Bcr-Abl assoziierter Zellzyklusphänomene dar. Während Inhibition von Aurora Kinasen durch mitotische Regulationsdefekte zur Proliferationshemmung führt, beruht die Effizienz von Inhibitoren onkogener, promitogener Tyrosinkinase wie Bcr-Abl auf der Beeinflussung anderer Zellzyklusphasen, beispielsweise der Transition von G_0/G_1 -Phase zur S-Phase. Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus würde man bei gleichzeitiger Inhibition von Aurora Kinasen und Bcr-Abl eine Kombination beider Zellzyklus-Phänomene erwarten. Entsprechende Untersuchungen zeigten jedoch, dass durch Abl-Inhibition induzierte Zellzyklusphänomene wie beispielsweise ein G_1 -Block eine untergeordnete Rolle spielen (Carpinelli et al. 2007; McLaughlin et al. 2009). Des Weiteren wurde für den pan-Aurora Kinase Inhibitor VX-680 Apoptoseinduktion in Imatinib resistenten CML-Zelllinien ohne Beeinflussung der Bcr-Abl Kinaseaktivität beschrieben (Giles et al. 2007; Donato et al. 2010). Die Anwendung höherer, Bcr-Abl Kinase

inhibierender Konzentrationen stellte sich hier aufgrund schwächerer Apoptoseinduktion sogar als suboptimal heraus. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in leukämischen Zellmodellen apoptotische Effekte der Aurora Kinase Inhibitoren zwar auf komplexen Mechanismen beruhen, unsere Resultate jedoch Aurora B Inhibition als Hauptakteur in der Vermittlung dieser Prozesse andeuten. Detaillierte präklinische und klinische Studien sind notwendig, um die Rolle von Aurora Kinasen, deren Interaktionspartnern sowie off-target Kinasen in der antineoplastischen Aktivität von Aurora Kinase Inhibitoren zu beschreiben.

4.3 Pharmakoresistente Aurora Kinase Mutanten als Hilfsmittel zur Targetvalidierung

Die bisherigen Ergebnisse stärken die Hypothese, dass Aurora Kinasen, speziell Aurora B und weniger Bcr-Abl, als entscheidendes Zielmolekül in der Vermittlung der inhibitorischen Effekte von PHA-739358 und AS-703569 anzusehen sind. Insbesondere unter Einsatz von AS-703569 konnten inhibitorische Einflüsse auf Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklus bei Dosierungen beobachtet werden, bei denen nachweislich keine suffiziente Bcr-Abl Inhibition vorlag. Es ist jedoch darauf zu achten, dass es sich dabei um rein korrelative Daten handelt, beruhend auf dem Einsatz unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen. Zur Bekräftigung der oben genannten Arbeitshypothese sollte daher in einem nächsten Schritt ein experimentelles Zellsystem aufgebaut werden, in dem durch Mutation im Aurora A- oder Aurora B- Gen die Bindung von PHA-739358 und AS-703569 an einer dieser Strukturen gezielt unterbunden werden kann und somit Inhibitionseffekte selektiv ausgeschaltet werden können. Führt Expression dieser Konstrukte in Bcr-Abl wt-Zellen nachweislich zur Resistenz gegenüber den Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569, ermöglicht dies nicht nur die Auftrennung in Aurora und Bcr-Abl Kinase vermittelter Inhibitionseffekte auf funktioneller Ebene sondern beweist auch die herausragende Relevanz der Aurora Kinasen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher anhand von in-silico Kristallstrukturanalysen des jeweiligen Inhibitor-Aurora Kinase-Komplexes Aminosäuren identifiziert, deren gezielte Mutation zur Resistenzentwicklung gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren führen könnte. In-vitro wies hierbei die Aurora B G160V-Mutante den größten Resistenzgrad gegenüber PHA-739358

und AS-703569 auf. Eine signifikante Dephosphorylierung von Histon 3 als Folge der Inhibition von Aurora B konnte für AurBG160V im Vergleich zu Wildtyp Aurora B erst bei 20-fach höheren PHA-739358 bzw. 16-fach höheren AS-703569 Konzentrationen erreicht werden. Des Weiteren konnten Aurora B G160V exprimierende Zellen den antiproliferativen Effekt beider Aurora Kinase Inhibitoren überwinden, verdeutlicht durch einen signifikanten Anstieg der IC_{50} -Werte. In weiteren Untersuchungen konnten die Resultate in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden. So war es möglich, anhand von Zellzyklusanalysen eine Reaktivierung von Aurora B Kinase Aktivität in Aurora B G160V exprimierenden Ba/F3 p185 wt Zellen unter Behandlung mit AS-703569 nachzuweisen. Diese Zellen wiesen auch in Gegenwart des Inhibitors annähernd normale DNA-Gehalt-Profile auf, während in Kontrollzellen Polyploidie als Aurora B inhibitionstypischer Phänotyp induziert wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die schon eingangs gestellte Vermutung, dass in-vitro die antiproliferativen und proapoptotischen Effekte der Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 maßgeblich auf Aurora B Kinase Inhibition zurückzuführen sind. Off-target Effekte beider Inhibitoren sind somit unwahrscheinlich. In der Literatur wird die Frage, welcher Aurora Kinase im Hinblick auf eine gezielte Therapie die größere Bedeutung zukommt und somit in der Entwicklung nachfolgender Inhibitorgenerationen eine Vormachtstellung einnehmen sollte, kontrovers diskutiert (Keen et al. 2004; Gautschi et al. 2008; Vader et al. 2008). Wilkinson et al. plädiert für Aurora B, da Kinaseninhibition hier nicht nur in mitotischer Katastrophe sondern auch in einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums in-vivo resultiert (Wilkinson et al. 2007). Ein weiteres Argument in diese Richtung stellen die Erkenntnisse aus zellulären Screening-Untersuchungen mit einer hypermutagenen Krebszelllinie und dem Aurora Kinase Inhibitor ZM447439 dar (Girdler et al. 2008). Die Tatsache, dass ausschließlich Punktmutationen in Aurora B nachgewiesen werden konnten, qualifiziert Aurora B als biologisch relevantere und effektivere Zielstruktur im Vergleich zu Aurora A. Auch frühere Ergebnisse der Girdler Gruppe bestätigen dies. So hatte Tetracyclin induzierte Expression einer dominant negativen Aurora A-Mutante kaum Auswirkungen auf Zellproliferation und Kolonienformation, während Expression einer inaktiven Auora B-Mutante zu einer starken Inhibition des Zellwachstums und reduzierten Kolonienzahlen führte (Girdler et al. 2006; Cochran 2008). Dagegen sehen andere Arbeitsgruppen

Aurora A als relevantere Zielstruktur zur Vermittlung antiproliferativer Effekte (Hirota et al. 2003; Marumoto et al. 2005; Manfredi et al. 2007; Gorgun et al. 2010) an. Warner et al. verglich die Effekte von Aurora A und B Antisense-Oligonukleotiden in Pankreaskarzinomzellen und kam zu dem Ergebnis, dass simultane Inhibition von Aurora A und B einer selektiven Inhibition nicht überlegen ist. Die Autoren geben dabei gezielter Aurora A Inhibition aufgrund rapider Apoptose- und Mitosearrestinduktion den Vorzug (Warner et al. 2006). Zudem zeigen neueste Daten, dass durch Expression einer partiell resistenten Aurora A T217D-Mutante der antiproliferative Effekt von Aurora A Inhibitoren wie MLN8054 und MLN8237 auf humane Zelllinien überwunden werden kann, was wiederum die in-vitro Relevanz von Aurora A stärkt (Sloane et al. 2010). Angesichts dieser kontroversen Beobachtungen in unterschiedlichsten Zellsystemen scheint eine zelltypabhängige Varianz in der Bedeutung von Aurora A bzw. B als maßgebliche Zielstruktur wahrscheinlich.

4.4 Biomarker als Wegweiser in der Therapie mit Aurora Kinase Inhibitoren

Zur Klärung der Frage, welche Aurora Kinase in welchem Zellsystem als effizienteres Target zu favorisieren ist, wären neben einer umfangreichen Evaluation von Aurora Kinase Inhibitoren in klinischen Studien auch die Identifizierung geeigneter funktionaler Biomarker dieser Wirkstoffklasse in-vivo weiterführend. Auf diese Weise könnte nicht nur eine Validierung des relevanten zellulären Targets sondern auch patientenindividuelle Therapiegestaltung durch genaue Evaluation der antineoplastischen Effekte induzierenden Dosis erfolgen. Während sich Dephosphorylierung von Histon H3 als sensitiver und spezifischer Biomarker für Aurora B Inhibition bereits auch klinisch etablieren konnte (De Jonge et al. 2006), fehlt ein verlässlicher Biomarker für Aurora A Aktivität. Die Ansätze sind jedoch vielfältig. Gautschi et al. erwägt die Zunahme phosphorylierter Histon H3 Levels als geeigneten Marker, bedingt durch Aurora A Inhibition vermittelte Akkumulation von Zellen in der Mitose (Gautschi et al. 2008). Andere Arbeitsgruppen sehen in der Kombination aus Messung des mitotischen Index und Aurora A-T288 Autophosphorylierung eine vielversprechende Alternative (Galvin et al. 2007). Darüber hinaus könnten prädiktive Biomarker zur

Auswahl bestimmter Tumorentitäten oder Sub-Gruppen von Tumorerkrankungen, die eine besondere Suszeptibilität gegenüber Aurora Kinase Inhibitoren ausweisen, sinnvoll sein. Der Status von p53 scheint diesbezüglich eine bedeutende Rolle zu spielen (Gautschi et al. 2008; Dar et al. 2010).

4.5 Erfolgsaussichten von Kombinationstherapien und kritische Bewertung der Aurora Kinase Inhibitoren als Chemotherapeutika

Ein weiterer Aspekt, den es in klinischen Studien zu untersuchen gilt, ist die Effizienz von Aurora Kinase Inhibitoren in Kombinationstherapien. Insbesondere im Hinblick auf Vermeidung von Resistenzentwicklung ist dies eine relevante Frage. Die ersten Untersuchungen sind vielversprechend. So konnten synergistische bzw. sensitivierende Effekte bei Kombination von Aurora Kinase Inhibitoren mit Mikrotubuliinhibitoren wie Etoposid und Docetaxel, Anthracyclinen, Cisplatin sowie den Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Sorafenib beobachtet werden (Hata et al. 2005; Lee et al. 2006; Yang et al. 2006; Sun et al. 2007; Tanaka et al. 2007; Fiskus et al. 2008; Gontarewicz et al. 2008; Benten et al. 2009). Dennoch ist der Einsatz von Aurora Kinase Inhibitoren nicht unumstritten. Da sie an kritischen Regulatoren des Zellzyklus angreifen, sind sie streng genommen keine Substanzen mit Selektivität gegenüber Tumoren. Der Nachweis von Neutropenie als vorrangig dosislimitierende Toxizität und Ausdruck kollateraler antiproliferativer Aktivität auf die Hämatopoese bestätigt dies in zahlreichen Studien (Gautschi et al. 2008; Keen et al. 2009; Kitzen et al. 2009; Pollard et al. 2009; Dar et al. 2010). Fraglich ist auch, ob die Inhibition von Kinasen, deren Aufgabe die Stabilisierung der chromosomalen Integrität ist, die Wahrscheinlichkeit genetischer Heterogenität und damit auch das Potential zur Karzinomentwicklung nicht erhöhen (Dar et al. 2010). Ferner konnte die Induktion von Polyploidie durch Aurora Kinase Inhibitoren auch bei in-vitro Kulturen normaler Mammaepithelzellen nachgewiesen werden, was auf die theoretische Bedeutung klinischer Langzeiteffekte hinweist (Ditchfield et al. 2003). Zudem ist unklar, ob Polyploidie das Überleben aneuploider Karzinomzellen nicht begünstigt (Dar et al. 2010). In Anbetracht der erhöhten Überexpression von Aurora Kinasen in soliden Karzinomen, ihrer Interaktion mit tumorassoziierten Signalwegen und biologisch relevanten Prozessen sowie der vielversprechenden Ergebnisse

bisheriger klinischer Studien, insbesondere auf dem Feld TKI-resistenter hämatologischer und solider Neoplasien, validiert die Substanzklasse der Aurora Kinase Inhibitoren als eine potente Alternative in der Behandlung von Tumorerkrankungen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl korrelative kinetische Zellproliferationsstudien und Zellzyklusanalysen als auch funktionelle Untersuchungen in einem speziell entwickelten Zellsystem ergaben, dass die Wirksamkeit der Inhibitoren PHA-739358 und AS-70356 in Bcr-Abl exprimierenden Zellen einschließlich der hoch resistenten Bcr-Abl-Mutanten T315I, Y253H, Y253F und F317L maßgeblich auf Aurora B Kinase Inhibition zurückzuführen ist. Inhibition von Bcr-Abl spielt lediglich eine untergeordnete Rolle.

5 Zusammenfassung

Zur Klärung der Frage, ob die in klinischen Studien nachgewiesene Aktivität der Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 gegenüber Imatinib resistenter Bcr-Abl-Mutanten auf Aurora oder Bcr-Abl Inhibition zurückzuführen ist, wurden im murinen CML-Zellmodell deren Einfluss auf Proliferation, Apoptoseinduktion, Bcr-Abl - und Aurora Kinasen-vermittelter Phosphorylierungen sowie Zellzyklusverteilung untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung Bcr-Abl negativer und positiver Zelllinien sowie TKI-resistenter Mutanten, ausgewählt nach Kriterien der Häufigkeit und Mutationsstärke. In den Versuchen zeigte sich eine dosisabhängige, signifikante Proliferationsreduktion und Apoptoseinduktion nicht nur in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen, sondern auch in den klinisch relevanten Bcr-Abl-Mutanten. Folglich hatte der Bcr-Abl-Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber den getesteten Aurora Kinase Inhibitoren. Die Induktion dieser biologischen Effekte erfolgte bei signifikant unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Während durchschnittlich 150 nM PHA-739358 zur halbmaximalen Proliferationsinhibition benötigt wurden, konnte der gleiche Effekt bereits bei im Durchschnitt 15-fach niedrigeren AS-703569 Konzentrationen erzielt werden. Analysen Bcr-Abl bzw. Aurora Kinasen spezifischer Phosphorylierungsstellen an etablierten Downstreamtargets zeigten, dass sich in Bcr-Abl transformierten Zellen die effiziente Proliferationsinhibition durch AS-703569 auf Aurora Kinasen und nicht auf Bcr-Abl Inhibition zurückführen lässt. Bezüglich PHA-739358 konnte dagegen die Inhibition beider Kinasenfamilien potentiell für die beschriebenen Effekte verantwortlich sein. Statische Zellzyklusanalysen bekräftigen, dass Behandlung mit Aurora Kinasen, nicht aber Bcr-Abl inhibierenden AS-703569 Konzentrationen eine Induktion Aurora B inhibitionstypischer Zellteilungsdefekte in Form irreversibler Polyploidie unabhängig von der Bcr-Abl-Expression bewirken. Da nahezu identische Zellzyklusphänomene unter PHA-739358 beobachtet werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Zytotoxizität dieses Inhibitors auch maßgeblich auf Effekten beruht, die mit der Hemmung der Aurora Kinasen assoziiert sind. Um die Bedeutung von Aurora Kinasen und Bcr-Abl Inhibition im Hinblick auf die biologischen Effekte weiter differenzieren zu können, wurden in einem nächsten Schritt anhand von in-silico Kristallstrukturanalysen des jeweiligen Inhibitor-Aurora

Kinase-Komplexes verschiedene Positionen von Aminosäuren im Aurora Kinase-Gen identifiziert, deren Punktmutation zur Resistenz gegenüber der hier verwendeten Kinaseninhibitoren führt. In-vitro wies hierbei die Aurora B G160V-Mutante den größten Resistenzgrad gegenüber den Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 auf. Eine signifikante Dephosphorylierung von Histon 3 als Folge inhibierter Aurora B Kinase Aktivität konnte im Vergleich zu der Wildtyp-Kinase erst bei 20-fach höheren PHA-739358 bzw. 16-fach höheren AS-703569 Konzentrationen erreicht werden. Des Weiteren führte die Expression von Aurora B G160V zu einem signifikanten Anstieg der IC_{50} -Werte beider Inhibitoren, was die essentielle Bedeutung von Aurora B bei der Vermittlung biologischer Inhibitoreffekte bestätigte. Anhand von Zellzyklusanalysen konnten die Resultate in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden. So war es möglich, unter Behandlung mit AS-703569 die Aurora B Kinase Aktivität durch Aurora B G160V Expression in Ba/F3 p185 wt Zellen zu rekonstituieren. Diese Zellen zeichneten sich auch in Gegenwart des Inhibitors durch annähernd normale DNA-Gehalt-Profile aus, während in Kontrollzellen Polyploidie als Aurora B inhibitionstypischer Phänotyp induziert wurde. Diese Ergebnisse bekräftigen die schon eingangs gestellte Vermutung, dass in-vitro die antiproliferativen und proapoptotischen Effekte der Aurora Kinase Inhibitoren PHA-739358 und AS-703569 maßgeblich Aurora B Kinase Inhibition zuzuschreiben sind und damit Aurora B und nicht Bcr-Abl als relevantes in-vitro *Target* angesehen werden muss.

6 Literaturverzeichnis

Abe Y, Ohsugi M, Haraguchi K, Fujimoto J und Yamamoto T. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett* **580**, 782-8 (2006).

Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC und Carmena M. Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* **153**, 865-80 (2001).

Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, Kandels-Lewis SE, Carmena M, Smythe C, Gerloff DL und Earnshaw WC. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* **10**, 1075-8 (2000).

Agrawal M, Garg RJ, Kantarjian H und Cortes J. Chronic myeloid leukemia in the tyrosine kinase inhibitor era: what is the "best" therapy? *Curr Oncol Rep* **12**, 302-13 (2010).

Andrews PD, Knatko E, Moore WJ und Swedlow JR. Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 672-83 (2003).

Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**, 1018-29 (2007a).

Apperley JF. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**, 1116-28 (2007b).

Barr AR und Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* **120**, 2987-96 (2007).

Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M und et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277-80 (1983).

Bayliss R, Sardon T, Vernos I und Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* **12**, 851-62 (2003).

Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ und Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* **83**, 2038-44 (1994).

Benten D, Keller G, Quaas A, Schrader J, Gontarewicz A, Balabanov S, Braig M, Wege H, Moll J, Lohse AW und Brummendorf TH. Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model. *Neoplasia* **11**, 934-44 (2009).

Beran M, Cao X, Estrov Z, Jeha S, Jin G, O'Brien S, Talpaz M, Arlinghaus RB, Lydon NB und Kantarjian H. Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin Cancer Res* **4**, 1661-72 (1998).

Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A und Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics* **53**, 406-9 (1998).

Bharadwaj R und Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-27 (2004).

Bhatia R, Munthe HA, Williams AD, Zhang F, Forman SJ und Slovak ML. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp Hematol* **28**, 1401-12 (2000).

Bhatia R und Verfaillie CM. The effect of interferon-alpha on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* **28**, 241-54 (1998).

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 und Plowman GD. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* **17**, 3052-65 (1998).

Blagosklonny MV. STI-571 must select for drug-resistant cells but 'no cell breathes fire out of its nostrils like a dragon'. *Leukemia* **16**, 570-2 (2002).

Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1572-7 (2005).

Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J und Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* **13**, 3064-77 (2002).

Borgne A und Meijer L. Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* **271**, 27847-54 (1996).

Boring CC, Squires TS und Tong T. Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J Clin* **43**, 7-26 (1993).

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP und Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* **99**, 3472-5 (2002).

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ und Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **295**, 139-45 (2000).

Burriss H. Phase I dose escalation study of the aurora kinase inhibitor PHA-739358 administered as a 24 h infusion in a 14-day cycle in patients with advanced/metastatic solid tumors. *Eur. J. Cancer* 2006 **S4**, **107**, **Abstract No. 343**(2006).

Carmena M und Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 842-54 (2003).

Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML, Cappella P, Gianellini L, Croci V, Degrassi A, Texido G, Rocchetti M, Vianello P, Rusconi L, Storici P, Zugnoni P, Arrigoni C, Soncini C, Alli C, Patton V, Marsiglio A, Ballinari D, Pesenti E, Fancelli D und Moll J. PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Mol Cancer Ther* **6**, 3158-68 (2007).

Carpinelli P und Moll J. Aurora kinase inhibitors: identification and preclinical validation of their biomarkers. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 69-80 (2008).

Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG und Druker BJ. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* **90**, 4947-52 (1997).

Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbe JC, Prigent C und Lorca T. APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* **3**, 457-62 (2002a).

Castro A, Vigneron S, Bernis C, Labbe JC, Prigent C und Lorca T. The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep* **3**, 1209-14 (2002b).

Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C und Ducommun B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* **4**, 1233-8 (2005).

Cheetham GM, Knechtel RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA und Austen DA. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J Biol Chem* **277**, 42419-22 (2002).

Chen SH und Tang TK. Mutational analysis of the phosphorylation sites of the Aie1 (Aurora-C) kinase in vitro. *DNA Cell Biol* **21**, 41-6 (2002a).

Chen SS, Chang PC, Cheng YW, Tang FM und Lin YS. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J* **21**, 4491-9 (2002b).

Cochran AG. Aurora A: target invalidated? *Chem Biol* **15**, 525-6 (2008).

Cohen RB, Jones SF, Aggarwal C, von Mehren M, Cheng J, Spigel DR, Greco FA, Mariani M, Rocchetti M, Ceruti R, Comis S, Laffranchi B, Moll J und Burris HA. A phase I dose-escalation study of danusertib (PHA-739358) administered as a 24-hour infusion with and without granulocyte colony-stimulating factor in a 14-day cycle in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 6694-701 (2009).

Cooke CA, Heck MM und Earnshaw WC. The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* **105**, 2053-67 (1987).

Cortes J, Kantarjian H, Brümmendorf T, Khoury J, Kim D, Turkina A, Volkert A, Wang J, Arkin S und Gambacorti-Passerini C. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia following resistance or intolerance to imatinib. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **28**, suppl 6502 (2010a).

Cortes JE, Jones D, O'Brien S, Jabbour E, Konopleva M, Ferrajoli A, Kadia T, Borthakur G, Stigliano D, Shan J und Kantarjian H. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J Clin Oncol* **28**, 392-7 (2010b).

Cortes-Franco J, Dombret H, Schafhausen P, Brummendorf T, Boissel N, Latini F, Capolongo L, Laffranchi B und Comis S. Danusertib hydrochloride (PHA-739358), a multi-kinase Aurora inhibitor, elicits clinical benefit in advanced chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **114**, 864 (2009).

Cortez D, Kadlec L und Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* **15**, 5531-41 (1995).

Cortez D, Reuther G und Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* **15**, 2333-42 (1997).

Cozza G, Mazzorana M, Papinutto E, Bain J, Elliott M, di Maira G, Gianoncelli A, Pagano MA, Sarno S, Ruzzene M, Battistutta R, Meggio F, Moro S, Zagotto G und Pinna LA. Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem J* **421**, 387-95 (2009).

Crane R, Kloepfer A und Ruderman JV. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* **117**, 5975-83 (2004).

Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L und Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* **106**, 1133-4; author reply 34 (2005).

Daley GQ und Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9312-6 (1988).

Daley GQ, Van Etten RA und Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824-30 (1990).

Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J und El-Rifai W. Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther* **9**, 268-78 (2010).

De Jonge M, Steeghs N, Verweij J, Nortier JW, Eskens F, Ouwkerk J, Laffranchi B, Mariani M, Rocchetti M, Gelderblom H. Phase I study of the aurora kinases (AKs) inhibitor PHA-739358 administered as a 6 and 3-h iv infusion on days 1, 8, 15 every 4 wks in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **26**, suppl; abstr 3507(2006).

Deininger MW. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 59-72 (2004).

Deininger MW, Goldman JM und Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343-56 (2000a).

Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM und Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* **60**, 2049-55 (2000b).

den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, Kremer M, Graf N, Scheerer M, Hall MA, Goga A, von Bubnoff N, Duyster J, Peschel C, Cleveland JL, Nilsson JA und Keller U. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood* **116**, 1498-1505 (2010).

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

Ditchfield C, Keen N und Taylor SS. The Ipl1/Aurora kinase family: methods of inhibition and functional analysis in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **296**, 371-81 (2005).

Donato NJ, Fang D, Sun H, Giannola D, Peterson LF und Talpaz M. Targets and effectors of the cellular response to aurora kinase inhibitor MK-0457 (VX-680) in imatinib sensitive and resistant chronic myelogenous leukemia. *Biochem Pharmacol* **79**, 688-97 (2010).

Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R und Talpaz M. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* **101**, 690-8 (2003).

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L und Larson RA. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408-17 (2006).

Druker BJ und Lydon NB. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **105**, 3-7 (2000).

Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R und Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* **344**, 1038-42 (2001).

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J und Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-6 (1996).

Ducat D und Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* **301**, 60-7 (2004).

Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, Mirey G, Bouche JP, Theis-Febvre N, Schmitt E, Monsarrat B, Prigent C und Ducommun B. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* **117**, 2523-31 (2004).

Elefanty AG, Hariharan IK und Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* **9**, 1069-78 (1990).

Era T und Witte ON. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1737-42 (2000).

Eyers PA, Erikson E, Chen LG und Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol* **13**, 691-7 (2003).

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R und Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**, 164-72 (1999).

Fancelli D, Moll J, Varasi M, Bravo R, Artico R, Berta D, Bindi S, Cameron A, Candiani I, Cappella P, Carpinelli P, Croci W, Forte B, Giorgini ML, Klapwijk J, Marsiglio A, Pesenti E, Rocchetti M, Roletto F, Severino D, Soncini C, Storici P, Tonani R, Zugnoni P und Vianello P. 1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazoles: identification of a potent Aurora kinase inhibitor with a favorable antitumor kinase inhibition profile. *J Med Chem* **49**, 7247-51 (2006).

Fiskus W, Wang Y, Joshi R, Rao R, Yang Y, Chen J, Kolhe R, Balusu R, Eaton K, Lee P, Ustun C, Jillella A, Buser CA, Peiper S und Bhalla K. Cotreatment with vorinostat enhances activity of MK-0457 (VX-680) against acute and chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res* **14**, 6106-15 (2008).

Foran JM, Ravandi F, O'Brien SM, Borthakur G, Rois M, Boone P, Worrell J, Mallett KH, Squires M, Fazal LH und Kantarjian HM. Phase I and pharmacodynamic trial of AT9283, an aurora kinase inhibitor, in patients with refractory leukemia. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **26**, suppl 2518 (2008).

Fu J, Bian M, Jiang Q und Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* **5**, 1-10 (2007).

Galvin KM, Huck J, Burenkova O, Burke K, Bowman D, Shinde V, Stringer B, Zhang M, Manfredi M und Meetze K. Preclinical pharmacodynamic studies of Aurora A inhibition by MLN8054. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **24**, suppl 13059 (2007).

Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F und D'Incalci M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1641-50 (2000).

Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, Nigg EA, Gerloff DL und Earnshaw WC. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**, 179-91 (2004).

Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Jr. und Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res* **14**, 1639-48 (2008).

Gesbert F, Sellers WR, Signoretti S, Loda M und Griffin JD. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J Biol Chem* **275**, 39223-30 (2000).

Giet R und 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**, 669-82 (2001a).

Giet R und Prigent C. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* **112**, 3591-601 (1999).

Giet R und Prigent C. The non-catalytic domain of the *Xenopus laevis* auroraA kinase localises the protein to the centrosome. *J Cell Sci* **114**, 2095-104 (2001b).

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

Girdler F, Gascoigne KE, Evers PA, Hartmuth S, Crafter C, Foote KM, Keen NJ und Taylor SS. Validating Aurora B as an anti-cancer drug target. *J Cell Sci* **119**, 3664-75 (2006).

Girdler F, Sessa F, Patercoli S, Villa F, Musacchio A und Taylor S. Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem Biol* **15**, 552-62 (2008).

Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA und Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95-105 (1995).

Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J und Brummendorf TH. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* **111**, 4355-64 (2008).

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

Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM und Greaves MF. Adhesive defects in chronic myeloid leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* **149**, 151-5 (1989).

Gorgun G, Calabrese E, Hideshima T, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, Ikeda H, Bianchi G, Hu Y, Cirstea D, Santo L, Tai YT, Nahar S, Zheng M, Bandi M, Carrasco RD, Raje N, Munshi N, Richardson P und Anderson KC. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* **115**, 5202-13 (2010).

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN und Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-80 (2001).

Goto H, Yasui Y, Nigg EA und Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* **7**, 11-7 (2002).

Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR und Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-9 (1984).

Gruss OJ, Wittmann M, Yokoyama H, Pepperkok R, Kufer T, Sillje H, Karsenti E, Mattaj IW und Vernos I. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol* **4**, 871-9 (2002).

Han Z, Riefler GM, Saam JR, Mango SE und Schumacher JM. The *C. elegans* Tausled-like kinase contributes to chromosome segregation as a substrate and regulator of the Aurora B kinase. *Curr Biol* **15**, 894-904 (2005).

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 JM und Miller KM. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* **10**, 262-7 (2004).

Hata T, Furukawa T, Sunamura M, Egawa S, Motoi F, Ohmura N, Marumoto T, Saya H und Horii A. RNA interference targeting aurora kinase a suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **65**, 2899-905 (2005).

Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL und Peters JM. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**, 281-94 (2003).

Haydon CE, Eyers PA, Aveline-Wolf LD, Resing KA, Maller JL und Ahn NG. Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1055-67 (2003).

Heald R, McLoughlin M und McKeon F. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* **74**, 463-74 (1993).

Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A und Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph¹ translocation. *Nature* **315**, 758-61 (1985).

Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR und Grosveld G. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239-42 (1983).

Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K und Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* **114**, 585-98 (2003).

Hoar K, Chakravarty A, Rabino C, Wysong D, Bowman D, Roy N und Ecsedy JA. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol Cell Biol* **27**, 4513-25 (2007).

Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, Corm S, Shah NP, Cervantes F, Silver RT, Niederwieser D, Stone RM, Dombret H, Larson RA, Roy L, Hughes T, Muller MC, Ezzeddine R, Countouriotis AM und Kantarjian HM. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* **22**, 1200-6 (2008a).

- Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, Guilhot F, Schiffer CA, Cortes J, Niederwieser DW, Gambacorti-Passerini C, Stone RM, Goldman J, Fischer T, O'Brien SG, Reiffers JJ, Mone M, Krahnke T, Talpaz M und Kantarjian HM. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood* **111**, 1039-43 (2008b).
- Hochhaus A, Erben P, Ernst T und Mueller MC. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* **44**, S15-24 (2007).
- Hochhaus A, Müller MC und Hehlmann R. Diagnostik und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie. *Der Onkologe* **8**, 693-707 (2002).
- Honda R, Korner R und Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 3325-41 (2003).
- Huang XF, Luo SK, Xu J, Li J, Xu DR, Wang LH, Yan M, Wang XR, Wan XB, Zheng FM, Zeng YX und Liu Q. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 2854-65 (2008).
- Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM und Radich JP. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **349**, 1423-32 (2003).
- Hutterer A, Berdnik D, Wirtz-Peitz F, Zigman M, Schleiffer A und Knoblich JA. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell* **11**, 147-57 (2006).
- Jelluma N, Brenkman AB, van den Broek NJ, Cruijssen CW, van Osch MH, Lens SM, Medema RH und Kops GJ. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* **132**, 233-46 (2008).
- Jeng YM, Peng SY, Lin CY und Hsu HC. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 2065-71 (2004).
- Jones SF, Cohen RB, Dees EC, Lee Y, Papas JA, Cooper MR, Galvin KM und Burris HA. Phase I clinical trial of MLN8054, a selective inhibitor of aurora A kinase. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **25**, suppl 3577 (2007).
- Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T und Tatsuka M. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene* **24**, 7266-72 (2005).
- Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, DiPersio J, Muller MC, Radich JP, Khoury HJ, Khoroshko N, Bradley-Garelik MB, Zhu C und Tallman

MS. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood* **113**, 6322-9 (2009).

Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L und Ottmann OG. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* **354**, 2542-51 (2006).

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M und Morra E. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **346**, 645-52 (2002a).

Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Faderl S, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Shan J, Rios MB, Champlin R, de Lima M und Cortes J. Survival benefit with imatinib mesylate therapy in patients with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia--comparison with historic experience. *Cancer* **103**, 2099-108 (2005).

Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Albitar M, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas DA, Resta D und Talpaz M. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* **99**, 3547-53 (2002b).

Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, Smith TL, Rios MB, Shan J, Yang Y, Giles FJ, Thomas DA, Faderl S, Garcia-Manero G, Jeha S, Wierda W, Issa JP, Kornblau SM, Keating M, Resta D, Capdeville R und Talpaz M. Treatment of Philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* **8**, 2167-76 (2002c).

Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA und Sen S. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36**, 55-62 (2004).

Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M und Sen S. Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem* **276**, 46219-24 (2001).

Kawasaki A, Matsumura I, Miyagawa J, Ezoe S, Tanaka H, Terada Y, Tatsuka M, Machii T, Miyazaki H, Furukawa Y und Kanakura Y. Downregulation of an AIM-1 kinase couples with megakaryocytic polyploidization of human hematopoietic cells. *J Cell Biol* **152**, 275-87 (2001).

- Keen N und Taylor S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **4**, 927-36 (2004).
- Keen N und Taylor S. Mitotic drivers--inhibitors of the Aurora B Kinase. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 185-95 (2009).
- Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T und Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lpl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem* **274**, 7334-40 (1999).
- Kitzen JJ, de Jonge MJ und Verweij J. Aurora kinase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol* (2009).
- Konopka JB, Watanabe SM und Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* **37**, 1035-42 (1984).
- Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P und Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* **158**, 617-23 (2002).
- Kurzrock R, Gutterman JU und Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **319**, 990-8 (1988).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
- Lee EC, Frolov A, Li R, Ayala G und Greenberg NM. Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* **66**, 4996-5002 (2006).
- Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, Taniguchi H, Furukawa K und Urano T. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* **279**, 47201-11 (2004).
- Littlepage LE und Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-85 (2002a).
- Littlepage LE, Wu H, Andresson T, Deanehan JK, Amundadottir LT und Ruderman JV. Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15440-5 (2002b).
- Liu Q, Kaneko S, Yang L, Feldman RI, Nicosia SV, Chen J und Cheng JQ. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem* **279**, 52175-82 (2004).

Liu Q und Ruderman JV. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5811-6 (2006).

Lu LY, Wood JL, Ye L, Minter-Dykhouse K, Saunders TL, Yu X und Chen J. Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression. *J Biol Chem* **283**, 31785-90 (2008).

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ und Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079-82 (1990).

Lugo TG und Witte ON. The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol Cell Biol* **9**, 1263-70 (1989).

Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB und Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119-23 (2008).

Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, Balani SK, Burenkova O, Chen W, Galvin KM, Hoar KM, Huck JJ, LeRoy PJ, Ray ET, Sells TB, Stringer B, Stroud SG, Vos TJ, Weatherhead GS, Wysong DR, Zhang M, Bolen JB und Claiborne CF. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4106-11 (2007).

Mao JH, Perez-Losada J, Wu D, Delrosario R, Tsunematsu R, Nakayama KI, Brown K, Bryson S und Balmain A. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* **432**, 775-9 (2004).

Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, Jiang T, Li Q, Neve RM, Gray JW, Cai WW und Balmain A. Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell* **11**, 161-73 (2007).

Marumoto T, Zhang D und Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* **5**, 42-50 (2005).

Mazzorana M, Pinna LA und Battistutta R. A structural insight into CK2 inhibition. *Mol Cell Biochem* **316**, 57-62 (2008).

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 und Hitoshi Y. Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569 identified through an image-based phenotypic screen. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 99-113 (2009).

Meggio F, Donella Deana A, Ruzzene M, Brunati AM, Cesaro L, Guerra B, Meyer T, Mett H, Fabbro D, Furet P und et al. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur J Biochem* **234**, 317-22 (1995).

Meraldi P, Honda R und Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* **21**, 483-92 (2002).

Merk Serono International S.A. und EMD Serono Inc. Aurora Kinase inhibitor - AS703569 (R763). *Investigator's Brochure - Edition Number 3.1* (2008).

Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M und Hunt T. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* **12**, 77-97 (1989).

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

Modugno M, Casale E, Soncini C, Rosettani P, Colombo R, Lupi R, Rusconi L, Fancelli D, Carpinelli P, Cameron AD, Isacchi A und Moll J. Crystal structure of the T315I Abl mutant in complex with the aurora kinases inhibitor PHA-739358. *Cancer Res* **67**, 7987-90 (2007).

Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, Zhang D, Saya H, Toyoshima YY, Kinoshita K, Wynshaw-Boris A und Hirotsune S. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol* **27**, 352-67 (2007).

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1, 263-73 (1986).

Musacchio A und Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-93 (2007).

Nguyen HG, Chinnappan D, Urano T und Ravid K. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* **25**, 4977-92 (2005).

Noble ME, Endicott JA und Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* **303**, 1800-5 (2004).

Nolte M, Werner M, Ewig M, von Wasielewski R, Wilkens L und Georgii A. Demonstration of the Philadelphia translocation by fluorescence in situ hybridization (FISH) in paraffin sections and identification of aberrant cells by a combined FISH/immunophenotyping approach. *Histopathology* **26**, 433-7 (1995).

Nowell PC und Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* **25**, 85-109 (1960).

O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R und Druker BJ. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**, 994-1004 (2003).

Ohi R und Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 267-73 (1999).

Ohyashiki K, Iwama H, Tauchi T, Shimamoto T, Hayashi S, Ando K, Kawakubo K und Ohyashiki JH. Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **40**, 49-56 (2000).

Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG und Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* **97**, 2440-8 (2001).

Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y und Tatsuka M. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* **62**, 5168-77 (2002).

Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM, Reiffers J, Silver RT, Tura S, Fischer T, Deininger MW, Schiffer CA, Baccarani M, Gratwohl A, Hochhaus A, Hoelzer D, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R und O'Brien SG. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* **100**, 1965-71 (2002).

Palandri F, Castagnetti F, Alimena G, Testoni N, Breccia M, Luatti S, Rege-Cambrin G, Stagno F, Specchia G, Martino B, Levato L, Merante S, Liberati AM, Pane F, Saglio G, Alberti D, Martinelli G, Baccarani M und Rosti G. The long-term durability of cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib 600 mg: the GIMEMA CML Working Party experience after a 7-year follow-up. *Haematologica* **94**, 205-12 (2009).

Palandri F, Castagnetti F, Testoni N, Luatti S, Marzocchi G, Bassi S, Breccia M, Alimena G, Pungolino E, Rege-Cambrin G, Varaldo R, Miglino M, Specchia G, Zuffa E, Ferrara F, Bocchia M, Saglio G, Pane F, Alberti D, Martinelli G, Baccarani M und Rosti G. Chronic myeloid leukemia in blast crisis treated with imatinib 600 mg: outcome of the patients alive after a 6-year follow-up. *Haematologica* **93**, 1792-6 (2008).

Paquette R, Shah N, Sawyers C, Martinelli G, John N, Chalukya M, Rocchetti M, Fiocchi C, Comis S, Capolongo L und Laffranchi B. PHA-739358, an Aurora kinase inhibitor, induces clinical responses in chronic myeloid leukemia harboring T315I mutations of BCR-ABL. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **110**, 1030 (2007).

Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML und Baltimore D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**, 3780-92 (1998).

Perez-Losada J, Mao JH und Balmain A. Control of genomic instability and epithelial tumor development by the p53-Fbxw7/Cdc4 pathway. *Cancer Res* **65**, 6488-92 (2005).

Perrotti D, Bonatti S, Trotta R, Martinez R, Skorski T, Salomoni P, Grassilli E, Lozzo RV, Cooper DR und Calabretta B. TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *EMBO J* **17**, 4442-55 (1998).

Pollard JR und Mortimore M. Discovery and development of aurora kinase inhibitors as anticancer agents. *J Med Chem* **52**, 2629-51 (2009).

Pugacheva EN und Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* **7**, 937-46 (2005).

Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, Ahmed S, Redaelli S, Piazza R, Magistrini V, Andreoni F, Scapozza L, Formelli F und Gambacorti-Passerini C. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res* **66**, 11314-22 (2006).

Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistrini V, Perini P, Marega M, Gambacorti-Passerini C und Boschelli F. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol* **27**, 469-71 (2009).

Renart J, Reiser J und Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3116-20 (1979).

Renshaw J, Patnaik A, Gordon M, Beeram M, Fischer D, Gianella-Borradori A, Lin C und Mendelson D. Phase I two arm trial of AS703569 (R763), an orally available aurora kinase inhibitor, in subjects with solid tumors: preliminary results. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **25**, suppl 14130 (2007).

Rieder CL, Cole RW, Khodjakov A und Sluder G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* **130**, 941-8 (1995).

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P und Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* **100**, 1014-8 (2002).

Rodriguez-Tarduchy G, Collins M und Lopez-Rivas A. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J* **9**, 2997-3002 (1990).

Rosasco-Nitcher SE, Lan W, Khorasanizadeh S und Stukenberg PT. Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* **319**, 469-72 (2008).

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-3 (1973).

Rubin EH, Shapiro GI, Stein MN, Watson P, Bergstrom D, Xiao A, Clark JB, Freedman SJ und Eder JP. A phase I clinical and pharmacokinetic (PK) trial of Aurora kinase (AK) inhibitor MK-0457 in cancer patients. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **24**, suppl 3009 (2006).

Ruchaud S, Carmena M und Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 798-812 (2007a).

Ruchaud S, Carmena M und Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* **131**, 230-1 (2007b).

Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA und Kantarjian HM. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **362**, 2251-9 (2010).

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).

Sasai K, Katayama H, Stenoien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR und 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**, 249-63 (2004).

Satinover DL, Leach CA, Stukenberg PT und Brautigan DL. Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8625-30 (2004).

Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **340**, 1330-40 (1999).

Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL und Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* **99**, 3530-9 (2002).

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B und Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-42 (2000).

Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR und Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**, 1655-8 (2008).

Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, Tarricone C, Areces LB, Schneider TR, Stukenberg PT und Musacchio A. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* **18**, 379-91 (2005).

Severson AF, Hamill DR, Carter JC, Schumacher J und Bowerman B. The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol* **10**, 1162-71 (2000).

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J und 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**, 117-25 (2002).

Shao S, Wang Y, Jin S, Song Y, Wang X, Fan W, Zhao Z, Fu M, Tong T, Dong L, Fan F, Xu N und Zhan Q. Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. *J Biol Chem* **281**, 28943-50 (2006).

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP und Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315**, 550-4 (1985).

Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-84 (1994).

Sloane DA, Trikic MZ, Chu ML, Lamers MB, Mason CS, Mueller I, Savory WJ, Williams DH und Eyers PA. Drug-resistant aurora A mutants for cellular target validation of the small molecule kinase inhibitors MLN8054 and MLN8237. *ACS Chem Biol* **5**, 563-76 (2010).

Sonet A, Graux C, Maertens J, Hartog C-M, Duyster J, Götze K und al. e. 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 Abstract)* **112**, 2963 (2008).

Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, Giannini B, Trabacchi E, Castagnetti F, Testoni N, Luatti S, de Vivo A, Cilloni D, Izzo B, Fava M, Abruzzese E, Alberti D, Pane F, Saglio G und Baccharani M. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 4100-9 (2005).

Steeghs N, Mathijssen RH, Wessels JA, de Graan AJ, van der Straaten T, Mariani M, Laffranchi B, Comis S, de Jonge MJ, Gelderblom H und Guchelaar HJ. Influence of pharmacogenetic variability on the pharmacokinetics and toxicity of the aurora kinase inhibitor danusertib. *Invest New Drugs*, PMID: 20182906 (2010).

Stewart S und Fang G. Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res* **65**, 8730-5 (2005).

Sun C, Chan F, Briassouli P und Linardopoulos S. Aurora kinase inhibition downregulates NF-kappaB and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 220-5 (2007).

Taguchi S, Honda K, Sugiura K, Yamaguchi A, Furukawa K und Urano T. Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett* **519**, 59-65 (2002).

Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP und Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **354**, 2531-41 (2006).

Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM und Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* **99**, 1928-37 (2002).

Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J und Shimada Y. The suppression of aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemosensitivity to docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 1331-40 (2007).

Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H und Okano Y. Centrosomal kinase ALK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* **59**, 2041-4 (1999).

Tang CJ, Lin CY und Tang TK. Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol* **290**, 398-410 (2006).

Tatsuka M, Katayama H, Ota T, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F und Terada Y. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and lpl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* **58**, 4811-6 (1998).

Tatsuka M, Sato S, Kitajima S, Suto S, Kawai H, Miyauchi M, Ogawa I, Maeda M, Ota T und Takata T. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 1122-7 (2005).

Terada Y, Tatsuka M, Suzuki F, Yasuda Y, Fujita S und Otsu M. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J* **17**, 667-76 (1998).

Toji S, Yabuta N, Hosomi T, Nishihara S, Kobayashi T, Suzuki S, Tamai K und Nojima H. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells* **9**, 383-97 (2004).

Towbin H, Staehelin T und Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).

Tyler RK, Shpiro N, Marquez R und Evers PA. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. *Cell Cycle* **6**, 2846-54 (2007).

Vader G und Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 60-72 (2008).

Vader G, Medema RH und Lens SM. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* **173**, 833-7 (2006).

Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* **9**, 179-86 (1999).

Van Etten RA, Jackson P und Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* **58**, 669-78 (1989).

Van Etten RA und Shannon KM. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. *Cancer Cell* **6**, 547-52 (2004).

van Vugt MA, Bras A und Medema RH. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* **15**, 799-811 (2004).

Verfaillie CM, Hurley R, Zhao RC, Prosper F, Delforge M und Bhatia R. Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone? *J Lab Clin Med* **129**, 584-91 (1997).

Vermes I, Haanen C und Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**, 167-90 (2000).

von Bubnoff N und Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* **107**, 114-21 (2010).

von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C und Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* **359**, 487-91 (2002).

Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J und Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* **19**, 4906-16 (2000).

Wang S, Midgley CA, Scaerou F, Grabarek JB, Griffiths G, Jackson W, Kontopidis G, McClue SJ, McInnes C, Meades C, Mezna M, Plater A, Stuart I, Thomas MP, Wood G, Clarke RG, Blake DG, Zheleva DI, Lane DP, Jackson RC, Glover DM und Fischer PM. Discovery of N-phenyl-4-(thiazol-5-yl)pyrimidin-2-amine aurora kinase inhibitors. *J Med Chem* **53**, 4367-78 (2010).

Warmuth M, Danhauser-Riedl S und Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* **78**, 49-64 (1999).

- Warner SL, Munoz RM, Stafford P, Koller E, Hurley LH, Von Hoff DD und Han H. Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**, 2450-8 (2006).
- Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A und Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **7**, 345-56 (2007).
- Wheeler TT, Broadhurst MK, Sadowski HB, Farr VC und Prosser CG. Stat5 phosphorylation status and DNA-binding activity in the bovine and murine mammary glands. *Mol Cell Endocrinol* **176**, 39-48 (2001).
- 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 und Green S. AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. *Clin Cancer Res* **13**, 3682-8 (2007).
- Wittmann T, Wilm M, Karsenti E und Vernos I. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol* **149**, 1405-18 (2000).
- Wong S und Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* **22**, 247-306 (2004).
- Yang H, Burke T, Dempsey J, Diaz B, Collins E, Toth J, Beckmann R und Ye X. Mitotic requirement for aurora A kinase is bypassed in the absence of aurora B kinase. *FEBS Lett* **579**, 3385-91 (2005).
- Yang H, He L, Kruk P, Nicosia SV und Cheng JQ. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* **119**, 2304-12 (2006).
- Young JC und Witte ON. Selective transformation of primitive lymphoid cells by the BCR/ABL oncogene expressed in long-term lymphoid or myeloid cultures. *Mol Cell Biol* **8**, 4079-87 (1988).
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC und Gillespie DA. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* **12**, 247-60 (2007).
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR und Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**, 189-93 (1998).

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) in CML (nach Faderl et al. 1999).....	2
Abb. 2: Konstitutive Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Bcr-Abl p210 (nach Faderl et al. 1999).....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Aurora Kinase A-C (nach Bolanos-Garcia 2005).....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Aurora Kinasen vermittelten Zellzyklus-Funktionen (nach Meraldi et al. 2004).....	12
Abb. 5: Statische Zellzyklusanalyse.....	49
Abb. 6: Dynamische Zellzyklusanalyse.....	51
Abb. 7: Strukturformel von PHA-739358 (1,4,5,6-Tetrahydropyrrolo(3,4-c)- pyrazol).....	60
Abb. 8: Strukturformel von AS-703569 (Pyrimidin-2,4-Diamin-derivat).....	60
Abb. 9: PHA-739358 und AS-703569 beeinträchtigen Zellproliferation und Viabilität.	61
Abb. 10: PHA-739358 und AS-703569 reduzieren Bcr-Abl Autophos- phorylierung und Aktivierung von STAT5 unabhängig vom Bcr-Abl-Mutationsstatus.....	64/65
Abb. 11: Inhibition der Aurora Kinase Aktivität erfolgt bei unterschiedlichen Konzentrationen von PHA-739358 und AS-703569 und führt zur verminderten Phosphorylierung von Histon H3 an Serin10.....	67/68
Abb. 12: Inhibition der Aurora B Kinase Aktivität durch PHA-739358 oder AS-703569 führt zu Zellteilungsdefekten und induziert Apoptose in Bcr-Abl negativen und positiven Ba/F3-Zellen.....	70/71
Abb. 13: Kristallstruktur-Analysen von Inhibitor-Aurora Kinase-Komplexen (zur Verfügung gestellt von Richard A. Engh [A] und EMD Serono [B])	75
Abb. 14: Schematische Darstellung zur Herstellung der Aurora Kinase Mutanten.....	76
Abb. 15: Expression der rekombinanten Aurora-Konstrukte in Bcr-Abl wt-Zellen	78
Abb. 16: Expression von Aurora B G160V führt zur Resistenz gegenüber PHA-739358 und AS-703569	81/82
Abb. 17: Expression der Aurora-Konstrukte beeinflusst nicht die Inhibierung von Bcr-Abl durch PHA-739358 oder AS-703569.....	85/86

- Abb. 18: Resistente Aurora B G160V-Mutante überwindet teilweise den antiproliferativen Effekt von PHA-739358 und AS-70356989
- Abb. 19: Expression von Aurora B L154M und Aurora B G160V führt zum Auftreten von Zellzyklusdefekten unter Behandlung mit PHA-739358 oder AS-70356991
- Abb. 20: Resistente Aurora B G160V-Mutante bewirkt durch Wiederherstellung von Aurora B Aktivität eine Teilnormalisierung des Zellzyklus.....93

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Er verstand es, mich nicht nur durch seine eigene Begeisterung für dieses Thema sondern auch durch Förderung praktischer Erfahrungen auf dem Gebiet der Hämatonkologie stets zu motivieren.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im hämatologischen Forschungslabor des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München anfertigen zu dürfen.

Bei Herrn Priv-Doz. Dr. Nikolas von Bubnoff möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche Betreuung und Hilfestellung bei allen Experimenten und wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken.

Herzlichen Dank auch an Jana Sänger für ihre geduldige Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken und ihre Unterstützung im Laboralltag. Entsprechender Dank auch an Petra Seipel, die mich arbeitsgruppenübergreifend unter ihre Fittiche genommen hat.

Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Anna-Lena Illert für die Einweisung in die Zellzyklusanalysen. Sie stand mir nicht nur mit fachlicher Kompetenz sondern auch freundschaftlich stets mit Rat und Hilfe zur Seite.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Richard A. Engh für die Durchführung und Bereitstellung der in-silico Kristallstrukturanalysen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre ständige Hilfsbereitschaft und konstruktiven Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Vielen Dank auch an meinen Bruder Niklas Maximilian und an Johanna für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt allen voran meinen Eltern, meinem Freund und all denjenigen, die mich auf ihre persönliche Art und Weise auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.