Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

PD Dr. Dr. Friedemann Honecker

Zentrum für Innere Medizin II. Medizinische Klinik und Poliklinik (Onkologie, Hämatologie und Knochenmarkstransplantation mit Sektion Pneumologie)

(Direktor Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer)

Wirkung des Aurorakinaseinhibitors Danusertib (PHA-739358) auf nichtseminomatöse Keimzelltumorlinien

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Juliane Waskow aus Potsdam

Hamburg 2014

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 7.05.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Dr. Friedemann Honecker

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Sabine Riethdorf

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Andreas Block

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung			
1.1	Maligne Keimzelltumore des Mannes			
	1.1.1	Definition und Einteilung	. 5	
	1.1.2	Epidemiologie	6	
	1.1.3	Ätiologie	. 6	
	1.1.4	Mortalität	. 7	
	1.1.5	Pathogenese	. 8	
	1.1.6	Klinik und Komplikationen	. 9	
	1.1.7	Diagnostik und Differentialdiagnosen	10	
	1.1.8	Stadien und Prognosefaktoren	12	
	1.1.9	Therapie	13	
1	.2 Cisp	platin	17	
	1.2.1	Einleitung	17	
	1.2.2	Strukturformel und Wirkungsweise	17	
	1.2.3	Cisplatin-Sensitivität der TKZT und Resistenzentwicklung	19	
	1.2.4	Resistenzmechanismen	22	
	1.2.5	Nebenwirkungen	24	
1	.3 Aur	orakinaseinhibitoren	24	
	1.3.1	Zellteilung und Zellzyklus	24	
	1.3.2	Aurorakinasen	26	
	1.3.3	Aurorakinaseinhibitoren	30	
1	.4 Frag	gestellung	32	
2	Material	und Methoden	34	
2	.1 Zell	linien	34	
	2.1.1	2102-EP und 2102-EP-R	34	
	2.1.2	NTERA 2 und NTERA 2-R	34	
	2.1.3	NCCIT und NCCIT-R	34	
2	.2 Zell	biologische Verfahren	34	
	2.2.1	Zellkultur	34	
	2.2.2	Auftauen der Zellen	35	
	2.2.3	Kryokonservierung der Zellen	35	
	2.2.4	Zellzahlbestimmung	36	
2	.3 Zyto	otoxizitätsassay (MTT)	36	
2	.4 Pro	liferationsassays	38	

	2	2.4.1		Monotherapie mit PHA-739358	38		
2.4.2		2	Kombinationstherapie	38			
	2.5		Durc	chflusszytometrie	39		
	2	2.5.1	l	Pi-Messung	39		
	2.6	6 Proteir		einchemische Verfahren	41		
	2	2.6.1	l	Behandlung der Zellen und Proteinisolation für Western-Blot-Analyse	41		
	2	2.6.2	2	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Methode)	41		
	2	2.6.3		Western-Blot-Analyse einer PARP-Spaltung als Apoptosenachweis	42		
3	E	Ergebnis		se	46		
	3.1	3.1 Zytotoxizitätsanalyse		46			
	3	5.1.1	l	2102 EP und 2102 EP-R	46		
	3	8.1.2	2	NTERA 2 und NTERA 2-R	47		
	3	5.1.3	3	NCCIT und NCCIT-R	49		
	3.2		Proli	iferationsassays	50		
	3	5.2.1	l	Monotherapie mit PHA-739358	50		
	3	8.2.2	2	Kombinationstherapie	55		
	3.3		Anal	lyse des DNA-Gehaltes mit PI-Färbung	69		
	3	3.3.1	l	2102 EP und 2102 EP-R	69		
	3.3.2 3.3.3 3.4		2	NTERA 2 und NTERA 2-R	72		
			3	NCCIT und NCCIT-R	.76		
				Immunoblot	80		
	3	8.4.1	l	Nachweis einer PARP Cleavage	80		
4 Diskussion				on	82		
5	Z	Zusammenfassung und Ausblick					
6	A	Abkürzungsverzeichnis					
7	L	Literaturverzeichnis			94		
8	ŀ	Anh	ang		99		
	8.1	8.1 Tabellen		99			
	8.2 Statistische Methoden		101				
	8.2.1 T Test		101				
	8.3	3.3 Statistik Proliferation Monotherapie		101			
	8.4 Statistik Proliferation Kombinationstherapie		103				
9		Dar	nksa	gung 1	106		
10 Lebenslauf							
1	1 Eidesstattliche Erklärung						

1 Einleitung

Tumorerkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Eine Aussicht auf Heilung ist zumeist nur in frühen Stadien möglich. Keimzelltumoren (KZT) nehmen unter den Krebserkrankungen eine besondere Stellung ein, da sie eine hohe Sensitivität gegenüber Chemotherapie aufweisen. Obwohl KZT insgesamt selten sind, zählen sie zu den häufigsten soliden Tumoren des jungen Mannes im Alter zwischen 15 und 34 Jahren. (Bosl and Motzer 1997) Die Einführung von Cisplatin revolutionierte das Therapieregime der KZT. Seither können sogar im metastasierten Zustand hohe Heilungsraten erzielt werden. Ein insgesamt zwar seltenes, klinisch aber relevantes Ereignis ist eine Cisplatinresistenz bei KZT. Dieses Phänomen wird seit vielen Jahren intensiv beforscht in der Hoffnung, neue Therapieansätze zu identifizieren. Insbesondere die Identifikation neuer, in dieser Situation effektiver Substanzen könnte dazu beitragen, diese therapeutische Lücke zu schließen und das medizinische Spektrum im Kampf gegen diese Neoplasien zu erweitern. Möglicherweise lassen sich diese neuen Therapieansätze auch auf andere, bisher weniger gut therapierbare Tumorentitäten übertragen.

1.1 Maligne Keimzelltumore des Mannes

1.1.1 Definition und Einteilung

Keimzelltumoren sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die ihren Ursprung von pluripotenten Keimzellen nehmen. (Mayer, Honecker et al. 2003) Sie stellen eine Schnittstelle zwischen Embryo- und Tumorgenese dar und weisen daher eine große Variabilität in Lokalisation und Morphologie auf. Diese Tumoren können gonadal im Hoden (und Ovar), oder seltener extragonadal in Erscheinung treten. Dann treten sie häufig entlang der Körpermittellinie im Retroperitoneum, Mediastinum und zerebellär auf. (Bokemeyer, Nichols et al. 2002) Dieser Verteilung liegt vermutlich die Wanderung der Urkeimzellen (primordialen Keimzellen) zugrunde. Gegen Ende der dritten Schwangerschaftswoche migrieren diese aus der Wand des Dottersacks, entlang der Körpermittellinie in die Gonadenanlagen. KZT werden aufgrund ihrer Histologie, Klinik und dem Manifestationsalter in folgende drei Entitäten unterteilt: Typ I: Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes (Teratome und Dottersacktumoren); **Typ II**: die des Adoleszenten und jungen Erwachsenen; Typ III: das spermatozyische Seminom des älteren Mannes. Die jeweiligen Ursprungszellen differieren. Die Keimzelltumortypen I und II entstehen intrauterin. Man geht davon aus, dass der pluripotente Typ I- Keimzelltumor, zu dem Teratome und Dottersacktumoren zählen, schon sehr früh in der Embryogenese entsteht, während der omnipotente Typ II-Keimzelltumor aus in der Entwicklung zurückgebliebener Keimzellen, den primordialen Keimzellen (PGC) oder Gonozyten, entstammt. Der Typ III-Tumor des älteren Mannes

entwickelt sich erst weit nach Abschluß der Pubertät aus einer primären Spermatozyte. Dieses seltene spermatozytische Seminom ist nullipotent, meist gutartig und nur gonadal lokalisiert. (Honecker, Oosterhuis et al. 2004; Oosterhuis, Stoop et al. 2007) Die häufigeren Typ II-KZT werden nach ihrem histologischen Bild weiter in Seminome (S) und Nichtseminome (NS) unterteilt. S geben ein histologisch gleichmäßiges Bild ab und bestehen aus mehreren Lagen undifferenzierter Zellen. NS werden weiter in das Embryonal Karzinom, den Dottersacktumor, das Teratom und in das Chorionkarzinom aufgegliedert. (Mayer, Honecker et al. 2003) 15% treten als Mischtumoren auf und kombinieren seminomatöse und nichtseminomatöse oder verschiedene nichtseminomatöse Histologien. (Vos, Oosterhuis et al. 1990) (Sökeland, Schulze et al. 2004) Diese von Oosterhuis vorgeschlagene histopathologische Klassifikation wurde inzwischen von der WHO übernommen.

1.1.2 Epidemiologie

Obwohl KZT mit nur 1% aller soliden Tumorerkrankungen des Mannes insgesamt selten sind, stellen sie die häufigste solide Tumorart des Mannes im Alter zwischen 20 und 40 Jahren dar. (Rübben 2014) Laut epidemiologischen Studien verdoppelte sich die weltweite Inzidenz in den vergangenen 40 Jahren (Bosl and Motzer 1997). Die höchsten Inzidenzen finden sich in Nord- und Westeuropa (Schweiz (10.3/100000), Dänemark (9.2/100000)), sowie in Nordamerika und Australien, die niedrigsten in Afrika und Asien (<1/100000). Angehörige der kaukasischen Rasse sind deutlich häufiger betroffen. (Rosen et al. 2011) In der Bundesrepublik treten 6.1 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner auf. (Rübben 2014; Bosl and Motzer 1997) Das Lebenszeitrisiko für einen Mann, an einem Hodentumor zu erkranken, beläuft sich auf 0,5%. (Hiddemann and Bartram 2004) KZT bilden mit 90-95% die Mehrheit der im Hoden auftretenden Tumoren. (Rübben 2014; Garner 2005) 95-97% lokalisieren sich gonadal, 3-5% extragonadal. (Bokemeyer, Nichols et al. 2002) S, die etwa 50% der Typ II-KZT ausmachen, erreichen ihren Häufigkeitsgipfel in der vierten Lebensdekade. NS, zu denen weitere 40% der Typ II-KZT zählen, manifestieren sich früher. Das mittlere Alter der Patienten mit NS liegt zum Diagnosezeitpunkt bei 27 Jahren. Die restlichen 10% enthalten seminomatöse und nichtseminomatöse Komponenten und werden als kombinierte Tumoren bezeichnet. (Honecker, Oosterhuis et al. 2004)

1.1.3 Ätiologie

Es wurde eine Reihe von Faktoren postuliert, die möglicherweise mit der Entstehung von KZT assoziiert sind. Dazu zählen genetische Prädisposition, sowie prä- und postnatale Einflüsse. Als gesicherte Risikofaktoren (RF) gelten der Maldeszensus testis, ein Hodentumor in der Anamnese, sowie eine positive familiäre Belastung. (Giwercman, Grindsted et al. 1987; Rübben 2014) Weiterhin gelten Hypospadie, Sub- und Infertilität, testikuläre Atrophie und eine schlechte Samenqualität im Spermiogramm als

wahrscheinliche RF. (Haughey et al 1989; Houldsworth, Korkola et al. 2006; Virtanen, Bjerknes et al. 2007; Krege, Beyer et al. 2008; Rübben 2014) Auch Patienten mit einer unbehandelten TIN des kontralateralen Hodens zählen zur Risikogruppe. (Dieckmann and Pichlmeier 2004; Fossa, Chen et al. 2005) Genetische Prädispositionen, wie das Down-Syndrom gelten als weitere RF. (United Kingdom Testicular Cancer Study Group 1994) (Peng, Zeng et al. 2009) Syndrome, die auf Störungen der Geschlechtschromosomen oder hormonen beruhen, wie die XY-Dysgenesie oder die Androgenresistenz, sind nicht nur mit einer abnormalen Hodenentwicklung assoziiert, sondern zeigen auch eine signifikant gestörte Spermatogenese, sowie ein erhöhtes Risiko für KZT. (Hoei-Hansen, Holm et al. 2003) Da Männer mit testikulären KZT in Studien eine signifikant reduzierte Fertilität und abnormale Samenqualität aufwiesen (Richiardi, Akre et al. 2004; Haughey et al 1989), wird die Existenz eines sog. Testikulären Dysgenesie-Syndroms angenommen, welches die verschiedenen Phänotypen vereint. Hierzu zählen neben den bereits oben erwähnten funktionellen, anatomischen und histopathologischen Veränderungen des männlichen Genitalsystems, die zu Reproduktionsstörungen in unterschiedlichen Schweregraden führen und jeweils als RF für TKZT gelten, auch eine abnorme Spermatogenese, Kryptorchismus, Hypospadie, Mikrolithiasis und maligne testikuläre Keimzellneoplasien. (Hoei-Hansen, Holm et al. 2003; Olesen, Sonne et al. 2007). Pränatale RF werden nicht zuletzt aufgrund der intrafötalen Entstehung der Vorläuferzellen (TIN-Zellen, die Gonozyten bzw. reifungsgestörten primordialen Keimzellen ähneln) in der Literatur diskutiert. Beispielsweise zeigte sich, dass eine Frühgeburtlichkeit >2 Wochen, sowie ein niedriges Geburtsgewicht von < 3000g zur 50%igen Risikoerhöhung für eine KZT-Entwicklung führte. (Coupland, Forman et al. 2004) Auch exogene Faktoren, wie die intrauterine Östrogenkonzentration während des ersten Trimenon der Schwangerschaft, scheinen bei der Entstehung von TKZT eine Rolle zu spielen, da sie die Gonadenentwicklung beeinträchtigen können. Maternale Komponenten, die den Östrogenspiegel verändern, könnten dabei eine Bedeutung haben. (Dieckmann and Pichlmeier 2004) Der Einfluss von Ernährungsfaktoren (fettreiche Ernährung, verstärkte Aufnahme von Milchprodukten), mangelnder körperlicher Aktivität und einem frühen Eintritt in die Pubertät wird diskutiert. (United kingdom testicular cancer study group 1994)

1.1.4 Mortalität

Dank der Einführung einer hocheffektiven Chemotherapie ist die altersabhängige Mortalität trotz der steigenden Inzidenz in allen Industrieländern signifikant von 1.4/100000 (1950-1974), über 1/100000 (1974-1979) (Brown et al. 1986) auf 0.4/100000 gesunken. (Rosen et al. 2011; Rübben 2014)

1.1.5 Pathogenese

1.1.5.1 TIN-Zellen als Vorstufe der Keimzelltumoren

Als Vorstufe aller KZT mit Ausnahme des spermatozytären Seminoms wird allgemein die sog. testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN), auch "intratubular germ cell neoplasia, unclassified (ITGCN-U)" genannt, angesehen. (Lind, Skotheim et al. 2007) Erstmals beschrieben wurde sie als "carcinoma in situ" (CIS) 1972 von Skakkebaek. Diese atypischen Zellen besitzen einen größeren Kern als gesunde Zellen und befinden sich in Längsrichtung innerhalb der Tubuli seminiferi häufig in der Nähe von Sertolizellen, den Ammenzellen der Spermatogenese. (Honecker, Oosterhuis et al. 2004) Sie zeigen eine morphologische Ähnlichkeit zu ihren Ursprungszellen, den primordialen Keimzellen und humanen fetalen Gonozyten. Diese Urgeschlechtszellen entwickeln sich normalerweise nach Einwanderung in die Gonadenanlagen zu Spermatogonien weiter. (Rajpert-De Meyts 2006) Wird intrauterin die Organogenese der Gonaden und der Tubuli seminiferi behindert, zum Beispiel durch hohe Östrogenspiegel oder im Falle einer testikulären Dysgenesie, führt dies zur Verzögerung der Differenzierung und Entwicklung der Keimzellen und der somatischen Sertolizellen. Es verbleiben veränderte Keimzellen, die ihre Morphologie und Pluripotenz nicht verloren haben. Sofern sie im weiteren Verlauf nicht absterben, können sie als präinvasive TIN-Zellen überdauern. In diesem Stadium kann diese Präkanzerose mittels Biopsie detektiert werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen kann im Zytoplasma der TIN-Zellen das Isoenzym PLAP nachgewiesen werden. (Hautmann and Huland 2006) Verschiedene Kriterien untermauern, dass TIN-Zellen intrauterin während der frühen Embryogenese entstehen und sich von fetalen Gonozyten ableiten. Zum einen ähneln sie sich morphologisch. Sie sind größer als normale Spermatogonien und verfügen über einen großen hyperchromatischen Kern. Zum anderen wurden auch auf immunhistochemischer und zytogenetischer Ebene Gemeinsamkeiten bestätigt, die diese Theorie unterstützen. Beispielsweise exprimieren TIN-Zellen, Seminomzellen und embryonale Karzinomzellen den Transkriptionsfaktor OCT 3/4, der mit Pluripotenz und der Fähigkeit zur Differenzierung assoziiert ist. Dieser Marker ist normalerweise spezifisch für embryonale Stammzellen. (Clark 2007) Desweiteren wird diese Hypothese durch die Expression von c-KIT unterstützt, das für einen Stammzellrezeptor kodiert. C-KIT kommt in fetalen und infantilen Gonozyten, in TIN- Zellen und in Seminomen vor und stellt für diese Zellen wahrscheinlich einen Überlebens- und Wachstumsvorteil dar. (Rajpert-De Meyts 2006) (Biermann, Goke et al. 2007)

1.1.5.2 Entstehung invasiver Tumoren

TIN-Zellen sind allgemein als Präkanzerose akzeptiert. Sobald durch weitere Stimuli die Zellen die Tubuli verlassen und die Umgebung infiltrieren, entwickelt sich ein invasives Malignom (KZT). (Hautmann and Huland 2006) Die kumulative Wahrscheinlichkeit beim

Vorhandensein einer TIN einen Hodentumor zu entwickeln, beträgt 70% in 7 Jahren. (Krege, Beyer et al. 2008) Aus TIN-Zellen können verschiedene KZT entstehen. Dies wird durch die Pluripotenz der Keimzellen mit einem hohen Gehalt an genetischem Material erklärt. Im Gegensatz zu Seminomen, die ebenfalls den Gonozyten ähneln, können Nichtseminome verschiedene Histologien enthalten, wie das Embryonalkarzinom (EC), den Dottersacktumor (YST), das Teratom (TE) und das Chorionkarzinom (CC). Diese Elemente gleichen unterschiedlichen Entwicklungsund Differenzierungsstufen embryonalen und extraembryonalen Gewebes. Das undifferenzierte pluripotente Embryonalkarzinom kann wie Stammzellen in andere embryonale (reifes und unreifes Teratom) und extraembryonale Gewebe (Dottersacktumor, Chorionkarzinom) ausdifferenzieren. Das spermatozytische Seminom des älteren Mannes stammt nicht von TIN-Zellen, sondern direkt von samenbildenden Zellen ab. (Hautmann and Huland 2006)

Ein invasiv wachsender Tumor entsteht, wenn die Basalmembran des Tubulus seminiferus durchbrochen wird. Für diesen Progress sind neue Faktoren maßgeblich. Man vermutet, dass chromosomale Veränderungen für den Übergang von TIN-Zellen zu malignen invasiven KZT verantwortlich sind. Tatsächlich wurden Aberrationen in malignen KZT-Zellen gefunden. Dazu zählen Überrepräsentationen von chromosomalem Material von 7, 8, 12 und X, sowie Unterrepräsentationen von chromosomalem Material von 4, 5, 11, 13, 18 und Y. Besonders der kurze Arm von Chromosom 12 (12p) scheint von Bedeutung zu sein. Alle invasiven KZT zeigen hier Veränderungen, in Form eines charakteristischen Zugewinns von 12p. Über 80% verfügen über ein Isochromosom i(12p), welches aus zwei identischen kurzen Armen besteht. In TIN-Zellen wird eine Überrepräsentation von 12p nicht gefunden, so dass dies einen hervorstechenden Unterschied zu invasiven TKZT darstellt. Womöglich findet sich hier die Ursache für die finale Transformation der präinvasiven TIN-Zellen. (Rodriguez, Houldsworth et al. 1993; Honecker, Oosterhuis et al. 2004)

1.1.6 Klinik und Komplikationen

1.1.6.1 Hodentumor

Das Leitsymptom des testikulären Keimzelltumors (TKZT) stellt eine zumeist schmerzlose Größenzunahme des Hodens dar. Diese kann auch mit einem Druck- oder Schweregefühl, einer tastbaren Verhärtung, sowie diffusen testikulären Schmerzen einhergehen. Durch das zunehmende Gewicht können ziehende Schmerzen am Samenstrang auftreten. Rasches Wachstum kann zu Spannungsschmerzen führen. Ein bilateraler Befall ist möglich. (Sökeland, Schulze et al. 2004)

1.1.6.2 Metastasen

20% der KZT manifestieren sich durch Zeichen einer systemischen Metastasierung, die entsteht, wenn der Tumor in Lymph- und Blutgefäße einbricht. TKZT metastasieren zunächst lymphogen in die ipsilateralen retroperitonealen Lymphknoten, später weiter nach kranial in die retrokruralen und subdiaphragmalen LK, sowie hämatogen. Eine primär hämatogene Metastasierung ist seltener und betrifft nur 3-10% der Patienten. Je nach Lokalisation der Absiedlungen variieren die klinischen Symptome. Häufigster Ort ist die Lunge. (Hautmann and Huland 2006) Metastasen können in Ausnahmefällen auch eine inguinale Lymphadenopathie durch eine Infiltration von Nebenhoden, Samenstrang und Skrotum hervorrufen. Bei retroperitonealem Befall treten unter Umständen Rückenund Flankenschmerzen auf. Husten, Dyspnoe und Hämoptysis können Zeichen einer metastatischen Beteiligung der Lungen und Bronchien sein. Schwellungen, z.B. zervikal, durch befallene LK sind möglich. (Hilton 2009) Mitunter treten Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen bei Azothämie bei Harnstauungsniere oder Kompression der Vena renalis auf. Je nach Befall des zentralen Nervensystems manifestieren sich neurologische Symptome. Eine Schwellung der unteren Extremität kann Folge einer retroperitonealen Lymphadenopathie mit Kompression der Vena cava inferior sein. (Rübben 2014) Bei großen Absiedlungen kann es auch zu Verdrängung, Kompression und Schmerzen anderer Organe (z.B. Harnstau) kommen. (Hautmann and Huland 2006) Fälle von schmerzender Gynäkomastie sind bekannt und werden auf erhöhte Östrogen- und Prolaktinspiegel zurückgeführt, die Folge der ß-HCG-Produktion durch den Tumor sind. (Cantwell, Richardson et al. 1991)

1.1.6.3 Extragonadale Tumoren

Extragonadale KZT lokalisieren sich am häufigsten im Mediastinum und Retroperitoneum. Daneben können diese Tumoren auch in der Pinealregion, sakrococcygeal und in Prostata, Vagina, Orbita, Leber und im Gastrointestinaltrakt auftreten. Mediastinale Tumoren rufen häufig Dyspnoe, Brustschmerz und Husten hervor, außerdem B-Symptomatik und Venacava-Obstruktion, seltener zervikale Knoten, Hämoptysen und Dysphagie. Retroperitonealen Tumoren führen hingegen vorrangig zu Rücken- und Abdominalschmerzen, Thrombosen, zervikalen Knoten, Skrotalödemen, Gynäkomastie und Dysphagie. (Schmoll 2002)

1.1.7 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Die Diagnose wird im Regelfall durch eine radikale inguinale Orchidektomie und die histopathologische Befundung des gewonnenen Materials gestellt. Wichtig für die Therapieplanung ist die histologische Unterscheidung zwischen S und NS, die Höhe der Tumormarker und der Metastasenstatus. (Heidenreich, Bokemeyer et al. 2009)

Obligater Bestandteil der Diagnostik bei Tumorverdacht stellen zuvor Anamneseerhebung, die allgemeine körperliche Untersuchung und die bimanuelle testikuläre Palpation,

beginnend am vermeintlich gesunden Gegenhoden, dar. Dabei sollten Größe, Oberfläche und Konsistenz erfasst, sowie die Strukturen des Nebenhodens und des Samenstrangs mit einbezogen werden. Eine überwiegende Mehrzahl der Hodentumoren können anhand des Tastbefundes diagnostiziert werden. In bis zu 30% der Fälle verhindert eine Hydrozele die Palpation des Tumors. Desweiteren sollten inguinale, axilläre, zervikale und supraklavikuläre Lymphknoten, sowie das Abdomen palpatorisch untersucht werden. Da durch eine vermehrte Östrogen- oder eine verminderte Androgenproduktion eine Gynäkomastie (ca. 5%) auftreten kann, muss der Brustdrüsenkörper untersucht werden. Bei primär mediastinaler oder retroperitonealer Lage (2-5%) muss zur Diagnosefindung anstelle der Orchidektomie eine Biopsie veranlasst werden. Patienten mit multiplen Metastasen oder einer ausgedehnten Tumormasse sollten schnellstmöglich einer Chemotherapie unterzogen werden. Daher kann hier auf die Ablatio testis zunächst verzichtet werden. In Einzelfällen führen typische klinische Symptome und Tumormarkerelevation zur Diagnose. Bei jungen Männern und einem Karzinom mit unklarem Primarius (sog. CUP-Syndrom) ist eine Bestimmung der Tumormarker (s.u.) deshalb zwingend erforderlich. (Rübben 2014)

Testikuläre Sonographie

Da die hochauflösende skrotale Sonographie mit einem 7,5-10-MHz-Schallkopf über 98% der TKZT identifizieren kann, ist für die Diagnostik unverzichtbar. Sie kann helfen, zwischen intra- und extratestikulären, sowie zwischen zystischen und soliden Prozessen zu unterscheiden. (Rübben 2014)

Tumormarker

Die Bestimmung der Tumormarker AFP, ß-HCG, LDH (und PLAP), sowie die bildgebende Ausbreitungsdiagnostik gehören zum Standard der Diagnostik. Die Tumormarker müssen prä- und postoperativ bestimmt werden, um im Falle einer okkulten Metastasierung diese frühzeitig zu erkennen. Zwei Drittel der Hodentumoren produzieren Tumormarker. AFP, welches normalerweise während der Schwangerschaft in Dottersack, Gastrointestinaltrakt und der Leber gebildet wird, wird nur von NS produziert. Eine Erhöhung deutet immer auf Anteile eines Embryonalkarzinoms, eines Dottersackkarzinoms oder eines Mischtumors hin. Bei 80% der metastasierten Nichtseminome sind AFP und ß-HCG positiv. Im klinischen Stadium I ist dies bei 57% der Fall. Bei 20% der S zeigt sich eine Erhöhung von ß-HCG, welches normalerweise in der Plazenta gebildet wird. Da Chorionkarzinome Ähnlichkeit zu Synzytiotrophoblasten aufweisen, ist hier ß-HCG stark erhöht. LDH und hPLAP (letzteres bei S) sind als Marker weniger spezifisch. (Rübben 2014)

Ausbreitungsdiagnostik

Die Ausbreitungsdiagnostik zur Festlegung von Stadium und Risikoprofil umfasst eine CT von Abdomen und Becken. Sollten diese Untersuchungen pathologisch sein, ist eine CT des

Thorax indiziert. Bei unauffälligem Retroperitonealraum ist eine thorakale Metastasierung sehr unwahrscheinlich. Daher reicht hier eine Röntgen-Thoraxaufnahme aus. (Heidenreich, Bokemeyer et al. 2009) Eine MRT des Kopfes oder eine Skelettszintigraphie sind bei weit fortgeschrittenen Verläufen oder klinischen Hinweisen sinnvoll.

Die Biopsie des kontralateralen Hodens sollte mit dem Patienten besprochen werden, da sich in 4.9 – 8.7% der Fälle eine Präkanzerose (TIN) im kontralateralen Hoden befindet und die Hodenbiopsie unter Hinzunahme immunhistochemischer Verfahren eine Sensitivität von bis zu 95% erreicht. (Rübben 2014)

Differenzialdiagnosen

Differenzialdiagnostisch muss bei dem Bild einer schmerzhaften intraskrotalen Raumforderung an akute Epididymitis, Hodentorsion oder Torsion der Appendix, Leistenhernie, Orchitis (auch granulomatöse Orchitis), Hydrozele, Varikozele, skrotales Trauma und an neurogene Orchidopathie gedacht werden. (Rübben 2014) Mitunter können Tumoren des Nebenhodens, Metastasen anderer Tumoren oder Lymphome zu diesem Beschwerdebild führen. Verursacht ein testikulärer Tumor primär skrotale Schmerzen, führt dies in 20-30% zur Fehldiagnose Epididymitis und damit zur Verlängerung der Diagnosefindung. (Hilton 2009; Rübben 2014) Extragonadale Primärtumoren sind selten und werden häufig zunächst verkannt, zumal die vom Tumor verursachten Symptome nicht krankheitsspezifisch sind.

1.1.8 Stadien und Prognosefaktoren

Die Stadieneinteilung erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der UICC oder der gebräuchlicheren Lugano-Klassifikation für Hodentumoren. Diese Aufgliederung in Stadium I-III orientiert sich am Befallsmuster der Metastasen und stellt eine praktikable Einteilung für Therapieplanung und Prognose dar. Die Prognose für fortgeschrittene KZT kann mit der IGCCCG-Klassifikation abgeschätzt werden. (IGCCCG 1997) Sie richtet sich nach der Histologie, der Primärtumorlokalisation, dem Metastasenstatus und den Tumormarkern einschließlich LDH. Seminome, eine gonadal oder retroperitoneale Lage des Primärtumors, keine viszeralen Metastasen und niedrige Serumspiegel der Tumormarker sind prognostisch günstiger als Nichtseminome, mediastinale Primärtumoren, viszerale Metastasen und hohe Tumormarkerspiegel. Die Klassifikation unterscheidet drei Risikogruppen: gute Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von ca. 90%, intermediäre Prognose mit ca. 80%, und schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50%. (Sökeland, Schulze et al. 2004) S sind sehr strahlensensibel und fallen immer in die Gruppe mit guter oder intermediärer Prognose. NS haben eine ungünstigere Prognose. Bei Mischtumoren legt die malignere

Komponente, also das NS, die Prognose und das therapeutische Vorgehen fest. Weitere Details siehe auch unter Therapie bzw. Tabellen im Anhang.

1.1.9 Therapie

Die Therapieplanung richtet sich nach dem histopathologischen Befund, der Serumkonzentration der Tumormarker, sowie der Ausdehnung der Metastasierung. (Heidenreich, Bokemeyer et al. 2009) Als Therapieoptionen stehen nach operativer Entfernung des befallenen Hodens neben einer Überwachungsstrategie bei Tumoren im Stadium I stadienadaptiert eine Chemotherapie, eine Strahlentherapie und auch eine Metastasenchirurgie zur Verfügung. Mit den European Consensus Guidelines von zuletzt 2008 stehen Behandlungsleitlinien zur Verfügung, die für alle Stadien mit meist guter Evidenzlage Therapieempfehlungen formulieren. (Krege, Beyer et al. 2008)

1.1.9.1 Operative Therapie des Primärtumors

Die Therapieziele bei der Behandlung des Primärtumors bestehen aus Kuration der Erkrankung durch komplette Resektion und der diagnostischen Sicherung der Verdachtsdiagnose Keimzelltumor. (Winter et al. 2005; Rübben 2014) Eine Orchidektomie erfolgt über einen inguinalen Zugang und findet im Regelfall vor jeder anderen Therapieoption statt. Der betroffene Testikel wird mit dem Samenstrang auf Höhe des inguinalen Rings abgesetzt. Eine Verletzung des Hodengewebes durch Biopsie oder offene Chirurgie sollte vermieden werden. Die anschließende Einlage einer Hodenprothese in das leere Skrotalfach wird von ca. 20% der Patienten gewünscht. (Chapple and McPherson 2004) Bei Patienten in einem weit fortgeschrittenen Stadium mit lebensbedrohlichem Metastasenstatus oder großer Tumormasse und eindeutiger Erhöhung der Tumormarker wird die Ablatio testis zunächst aufgeschoben. Hier wird schnellstmöglich eine Chemotherapie veranlasst. (Krege, Beyer et al. 2008) Die Diagnosestellung erfolgt dann klinisch (Palpation, Tumormarker, Metastasenstatus). In gewissen Fällen, wie besonders kleinen Tumormassen, bilateralen Tumoren, zeitgleichen Zweittumoren oder einem solitären Testikel, kann eine testikelerhaltende Operation in Erwägung gezogen werden und muss mit dem Patienten diskutiert werden. (Rübben 2014; Giannarini et al. 2010)

1.1.9.2 Adjuvante Therapie

Nach operativer Entfernung des Testikels stehen verschiedene adjuvante Therapieoptionen zur Verfügung, die vom Stadium der Erkrankung und der Histologie abhängig sind. Das Stadium I ist nach Diagnosesicherung durch Bildgebung auf den Hoden beschränkt, im Stadium II liegt eine lokoregionäre Metastasierung im Retroperitoneum vor. Die Dignität eines Lymphknotens wird an dessen Größe, die mittels CT gemessen wird, ausgemacht. Pathologisch vergrößerte LK von mehr als 1cm Größe an typischer Lokalisation gelten als

mutmaßlich maligne. (Krege, Beyer et al. 2008) Die TNM-Klassifikation unterscheidet zwischen Stadium IIA bzw. B, wenn eine isolierte ipsilaterale LK-vergrößerung in typischer Lokalisation (infradiaphragmal und retroperitoneal) vorliegt und 2 bzw. 5 cm nicht überschreitet. Des weiteren müssen aufgrund hervorragender Heilungsaussichten in frühen Stadien therapieassoziierte Akut- und Spätfolgen, insbesondere Langzeittoxizitäten wie u.a. eine Induktionen von Zweitneoplasien, gering gehalten werden, ohne die Kurationsraten zu verkleinern. Die Einteilung in Risikogruppen soll eine adäquate Behandlung garantieren und eine Unter- wie Überbehandlung vermeiden. Mögliche adjuvante Therapieoptionen stellen die Surveillance-Strategie (primärer Verzicht auf postoperative onkologische Behandlung; Voraussetzung ist die regelmäßige Teilnahme an der obligaten Nachsorge und somit eine gute Patientencompliance), die perkutane Radiotherapie über dorsoventrale Stehfelder, die Chemotherapie (Carboplatin-Monotherapie bei Seminomen oder Nichtseminomen), Kombinationschemotherapie: PEB oder PE-Schema bei die nervenerhaltende, diagnostische retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) und die Residualtumorresektion (RTR) zu Verfügung. Die Strahlentherapie kommt nur bei Seminomen zum Einsatz, da sie besonders sensibel reagieren.

Seminom CS I: Ausbreitung des Tumors auf den Hoden beschränkt, Signifikante prognostische Risikofaktoren für das Vorliegen einer okkulten Metastasierung (in 12-35%) sind eine Tumorgröße >4cm und/oder eine Infiltration des Rete testis.

- Low Risk (5-Jahres-Rückfallwahrscheinlichkeit 6-12%), wenn der Tumor <4 cm ist und keine Rete testis Infiltration vorliegt. Hier empfiehlt sich die Surveillance-Strategie.
- Intermediate Risk (15-16%) besteht, wenn einer der beiden Risikofaktoren vorliegt. Eine adjuvante Therapie sowie eine Surveillance-Strategie sind möglich.
- High Risk (30-35%) liegt bei einem Tumor >4cm und einer Rete testis Infiltration vor.
 Es bestehen auch hier 3 Handlungsoptionen: Surveillance-Strategie, Radiotherapie (20Gy) oder Monochemotherapie mit Carboplatin. (Huddart and Kataja 2008)

Auch im Falle eines Rezidivs nach Surveillance-Strategie (gemittelt in 12-16%) werden nach Aufnahme einer stadienadaptierten Therapie nahezu 100% geheilt. Daher wird die Indikation zu adjuvanten Therapiemaßnahmen relativ eng gestellt, um das Risiko für therapieassoziierte Spätfolgen (v.a. nicht-testikuläre Zweitneoplasien) gering zu halten. (Rübben 2014) Die Rezidivraten für die adjuvanten Therapieverfahren liegen jeweils bei 3-4%. (Krege, Beyer et al. 2008) **Nichtseminom CS I**: Wichtigster Prognosefaktor stellt die vaskuläre Invasion des Tumors in Blut- oder Lymphgefäße dar, die das Rezidivrisiko von 13 auf 50% anhebt. Weitere Risikofaktoren, allerdings ohne Relevanz als unabhängige Parameter, ist ein prozentualer Anteil an embyonalem Karzinom von >50% des Tumorgewebes und eine Proliferationsrate des Tumors (MIB-1) von >70%. Bei Vorliegen aller drei Faktoren ergibt sich ein Risiko von 64%. Eine Chemotherapie sollte ab einem Rezidivrisiko von 50% (also Vorliegen einer Gefäßinvasion) diskutiert werden. (Albers, Siener et al. 2003; Rübben 2014)

- Low-Risk (Rezidivrisiko 13%); hier wird die Surveillance-Strategie empfohlen, alternativ 2 x PEB oder nervenerhaltende RLA.
- High Risk (Rezidivrisiko 64%); hier empfiehlt sich eine adjuvante Chemotherapie (2 x PEB), alternativ Überwachung, oder bei Kontraindikationen nervenerhaltende RLA.

Die Überlebensraten beider Gruppen sind identisch.

Seminom CS IIA/B: Die Auswahl des therapeutischen Verfahrens hängt von der Tumorzelllast ab, deren Ausmaß im CT-Befund abgeschätzt wird. Die Abgrenzung zum Stadium CS I kann hierbei schwierig sein.

- CS II A: LK <2cm; hier empfiehlt sich die perkutane Radiotherapie (Gesamtdosis 30Gy).</p>
- CS II B: LK 2-5cm; optional ist eine Radiotherapie (Gesamtdosis von 36Gy) oder eine Chemotherapie (3 x PEB oder 4 x PE). Beide Verfahren gelten als gleichwertig.
- CS II C: LK >5cm; erste Wahl stellt die Chemotherapie dar (3 x PEB oder 4 x PE).
 (Krege et al. 2008)

Nichtseminom CS IIA/B: Die Therapieintensität richtet sich nach der Tumorzellast und für das Stadium II A nach den Serumtumormarkern.

CS II A: Bei persistierend erhöhten Tumormarkern nach Ablatio testis erfolgt die Behandlung mit 3 (- 4, bei deutlich erhöhten Markern) Zyklen PEB-Chemotherapie und anschließender RTR. Negative Tumormarker lassen bezweifeln, ob es sich bei der radiologisch gesehenen LK-Vergrößerung tatsächlich um eine Metastase handelt. Daher erfolgt entweder zunächst eine frühzeitige Verlaufskontrolle mittels Bildgebung nach ca. 6 Wochen, oder aber die histologische Sicherung anhand einer nervenerhaltenden RLA, bevor über die weitere Therapie entschieden werden kann. CS II B: erfordert ebenfalls eine Chemotherapie und fällt abhängig von der Markerhöhe in die "Good oder Intermediate Prognosis"-Gruppe der fortgeschrittenen Hodentumoren. (Krege et al. 2008)

1.1.9.3 Therapie der fortgeschrittenen Hodentumoren (IGCCCG-Klassifikation)

Die Therapie des fortgeschrittenen TKZT richtet sich nicht allein nach dem TNM-Stadium, sondern auch nach der (IGCCCG)-Klassifikation (siehe Anhang). Die Einteilung berücksichtigt Histologie, die primäre Tumorlokalisation, Tumormarker sowie das Muster des Organbefalls bei Metastasen und dient neben der Prognoseabschätzung der Therapieauswahl. Eine Kombinationschemotherapie ist Therapie der ersten Wahl. Dabei werden mehrere Zyklen einer dosisintensivierten Chemotherapie verabreicht. Häufig ist bei NS-Resttumoren nach Chemotherapie eine Residualtumorresektion (RTR) indiziert, die in 30-40% undifferenziertes Teratomgewebe ergibt. Diese Patienten profitieren vom chirurgischen Eingriff, da diese Tumorentität durch Chemotherapie nicht zu beeinflussen ist. (Rübben 2014):

- Scood Prognosis (5-Jahres-ÜR: 90%): Standard ist 3 x PEB, alternativ 4 x EP
- > Intermediate Prognosis (5-Jahres-ÜR: 79%): derzeitige Empfehlung lautet 4 x PEB
- Poor Prognosis (5-Jahres-ÜR: 48%): Standard ist 4 x PEB, alternativ 4 x PEI (Krege et al. 2008; Rübben 2014)

1.1.9.4 Therapie von Rezidiven oder refraktären Tumoren

Rezidive nach alleiniger Chirurgie (z.B. Surveillance-Strategie) werden wie eine primär metastasierte Erkrankung behandelt. Es folgen in der Regel 3-4 Zyklen Cisplatin-basierter Chemotherapie. Rezidive oder ein Progress des Tumors nach einer primären Chemotherapie indiziert eine Salvagetherapie (salvage, engl.: Rettung, Bergung). Hier stehen die Salvagechemotherapie und -chirurgie zur Auswahl. Die Chemotherapie kann als Hochdosis- oder als konventionell dosierte Chemotherapie erfolgen. (Lorch et al, J Clin Oncol 2011) Beiden Verfahren folgt in der Regel eine RTR. Die Auswahl des besten Verfahrens ist abhängig von Prognosefaktoren. (Lorch et al, J Clin Oncol 2011) Einen wichtigen Faktor stellt das Ansprechen auf die Primärtherapie dar. Bei einer nur partiellen Remission des Primärtumors ohne Rückgang der Tumormarker (pRm+) oder stabiler Erkrankung als Reaktion auf die Primärchemotherapie gilt eine HDCT als indizert. Die konventionelle Chemotherapie sollte bei kompletter Remission (CR) oder bei partieller Remission mit negativen Tumormarkern (pRm-) erfolgen. Eine klare Indikation zur Salvagechirurgie stellt ein Progress während der Primär- oder Salvagechemotherapie, sowie ein Spätrezidiv >2 Jahre nach Primärtherapie dar. Desweiteren wird ein operatives Verfahren bei Rückgang der Tumormarker aber radiologisch nachweislichem Größenprogress des Tumors angestrebt. Häufig sind hier Teratomelemente im Sinne eines "growing teratoma syndrome" zu finden. (Rübben 2014)

1.2 Cisplatin

1.2.1 Einleitung

TKZT gelten als Paradebeispiel einer heilbaren Tumorerkrankung. Durch Fortschritte in Diagnostik und Therapie sowie eine optimierte interdisziplinäre Zusammenarbeit werden auch im metastasierten Stadium heute mehr als 80% der Patienten geheilt. Der Einsatz cisplatinhaltiger Kombinationen in der Chemotherapie stellt hierbei einen entscheidenden Faktor dar. Zuvor konnten nur 5-10% der Patienten durch die damalige Standardtherapie metastasierter TKZT aus Dactinomycin, Methotrexat und Chlorambucil, geheilt werden. (Einhorn 2002) Durch Änderung des Therapieregimes zugunsten Vinblastin und Bleomycin, wurde ein krankheitsfreies Langzeitüberleben von 25% erreicht. In Studien verhalf Cisplatin 1973 erstmalig Patienten mit refraktären TKZT zur Remission. 1974 wurde es Teil einer Kombinationstherapie mit Vinblastin und Bleomycin (PVB), um deren synergistische Effekte zu verstärken. Dieses Regime führte in 70% zur vollständigen Remission. 1978 zeigten Schabel et al. enorme synergistische Effekte durch Kombination von Cisplatin und Etoposid, die auch bei therapierefraktären Tumoren Wirkung zeigten. Nach mehreren Studien wurde 1984 die Kombination aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (BEP) als Standardtherapie eingeführt, da sie sich gegenüber PVB (74% Heilung) durch bessere Therapieergebnisse (83% Heilung) und ein günstigeres Nebenwirkungsprofil (weniger Neurotoxizität) durchsetzte. (Einhorn 2002) Heute gilt Cisplatin als effektives und weit verbreitetes Chemotherapeutikum und spielt in der Behandlung vieler Tumorentitäten eine Rolle. Dazu gehören neben den TKZT auch Ovarial-, Zervix-, Blasen- und Ösophaguskarzinome, bösartige Neubildungen im Kopf/Halsbereich sowie das kleinzellige Bronchialkarzinom. (Cepeda, Fuertes et al. 2007)

1.2.2 Strukturformel und Wirkungsweise

Cisplatin [Pt(NH₃)₂Cl₂], [*cis*-diamminedichloroplatinum(II)] gehört, wie Carboplatin [cisdiammine-1,1-cyclobutanedicarboxylateplatinum(II)] und Oxaliplatin [trans-L-1,2diaminocyclohexaneoxalatoplatinum(II)], zu Schwermetallverbindungen mit einem zentralen Platinatom. Diese Komplexe wirken zytotoxisch, indem sie in Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Durch Bindung der Komplexe an die DNA-Stränge im Zellkern entstehen verschiedene Verknüpfungen, sog. Addukte. Diese verändern die Struktur der DNA und setzen einen DNA-Schaden. Über reaktive Prozesse in der Zelle wird daraufhin Apoptose induziert.

1.2.2.1 Phasen der Cispaltinwirkung

Vier Phasen lassen sich bei der Wirkung von Cisplatin unterscheiden: 1. Aufnahme in die Zelle, 2. Aktivierung der Platinkomplexe, 3. Bindung an die DNA und Adduktbildung und 4. Zelluäre Prozesse, als Antwort auf den DNA-Schaden. (Todd and Lippard 2009) Cisplatin wird intravenös verabreicht und diffundiert schnell in verschiedene Gewebe. Über 90% des Cisplatins im Blut wird an Plasmaproteine (u.a. Albumin) gebunden und dadurch inaktiviert. Die Aufnahme nach intrazellulär verläuft vermutlich durch passive Diffusion und aktiv über Transporter. Extrazellulär herrscht eine hohe Chloridkonzentration (ca. 100 mM), die eine Hydrolyse der zwei Chloridliganden und somit die Aktivierung der Komplexe verhindert. Gelangt Cisplatin intrazellulär, lösen sich durch den Abfall der Chloridkonzentration auf 2-30 mM die beiden Chloridgruppen und werden durch Wasser- oder Hydroxylgruppen ersetzt. Jetzt ist Cisplatin positiv geladen und kann mit verschiedenen zellulären Strukturen reagieren, zum Beispiel mit Proteinen, RNA, Membranphopholipiden, sowie Glutathion, Methionin und Cystein. Nur 1% interagiert mit der DNA und führt zum Zelltod. (Jamieson and Lippard 1999; Cepeda, Fuertes et al. 2007; Hou, Zhang et al. 2009) Cisplatin bindet an die DNA-Stränge, indem es seine Wassermoleküle gegen N_7 -Atome der Purinbasen austauscht. Dies führt zu Querverknüpfungen der DNA in Form von Intrastrangund Interstrangverknüpfungen. Am häufigsten sind Interstrangverknüpfungen, die zu 65% zwischen zwei Guaninbasen, in 25% zwischen Guanin und Adenosin und zu kleineren Anteilen mit einer dritten neutralen Base zwischen zwei Guaninbasen entstehen. (Hou, Zhang et al. 2009) Es können sich Di-Addukte ausbilden, sowie Mono-Addukte, die dann mit anderen Nukleotiden weiter reagieren können. Die DNA wird flexibler, bekommt Knicke und verkürzt sich. Reagieren Mono-Addukte mit entfernteren Nukleotiden, bilden sich Mikro-Loopings, die zur Verkürzung, Kondensation und Aggregatbildung der DNA-Stränge führen. Neben der Adduktbildung, bewirkt Cisplatin eine Verdrehung der Doppelhelix in Richtung der großen Furche, sowie ein partielles Entwinden in der Nähe der Verknüpfungen. (Hou, Zhang et al. 2009; Todd and Lippard 2009) Durch diese verschiedenen Veränderungen werden zelluläre Prozesse, wie Transkription, Replikation, DNA-Reparatur und Telomeraseaktivität, gestört. Kann der DNA-Schaden im Zellzyklusarrest nicht repariert werden, kommt es zur Apoptoseinduktion und somit letztendlich zum Absterben der Zelle.

1.2.2.2 Apoptose

Apoptose bezeichnet man kontrollierten Zelltod. Dieser Als einen genetisch Unterschied energieverbrauchende Vorgang zieht im zur Nekrose keine Entzündungsreaktion nach sich. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle, das Chromatin kondensiert, die DNA wird fragmentiert und Zellorganellen sowie Membranen bleiben intakt. Schließlich wird die Zelle durch Phagozytose beseitigt. Apoptose kann über verschiedene Wege (extrinsischer und intrinsischer Weg) initiiert werden. Beide Wege enden in der Aktivierung von Caspasen. (Kliche et al.) Caspasen ("cytosolic-aspartat-specific-cysteinprotease") stellen wichtige Schlüsselenzyme der Apoptose dar. Es handelt sich um Proteasen mit zentral gelegenem Cysteinmolekül, die nach einem Aspartatsäurerest Proteine spalten. Sie werden als inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert und werden in Inititiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10), Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) und inflammatorische Caspasen (Caspase 1, 4, 5, 11, 12 und 13) unterteilt. Die Aktivierung von Initiatorcaspasen erfolgt durch Bildung von Dimeren, die der Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung durch andere aktivierte Caspasen. (Crow, Mani et al. 2004) Beim extrinsischen oder rezeptorvermittelten Weg der Apoptoseinitiierung leiten extrazelluläre Signale über Oberflächenrezeptoren eine Signalkaskade ein. Diese Rezeptoren, auch Todesrezeptoren genannt, verfügen auf zytoplasmatischer Seite über eine sog. Todesdomäne (engl. "death domain", DD). Das Binden eines passenden Liganden verursacht die Trimerisierung des Rezeptors, wodurch eine Zusammenlagerung vieler "DD"-Domänen erreicht wird. An diese Struktur binden Moleküle, z.B. FADD ("Fas-accociated death domain protein"), die zur Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-8-Molekülen führt. Der Multiproteinkomplex aus Rezeptor, Procaspase und Adaptermolekül wird auch als DISC ("death-inducing signaling complex") bezeichnet. (Crow, Mani et al. 2004) Die aktivierte Caspase 8 ist die Hauptinitiatorcaspase des rezeptorvermittelten Weges. Beim intrinsischen oder mitochondrialen Weg kommt es als Reaktion auf interne und externe Schäden (z.B. DNA-Schäden) zur Freisetzung reaktiver Moleküle (darunter Cytochrom c). Hierbei spielen Proteine der Bcl-2-Familie eine Rolle. Wahrscheinlich formen sie durch Interaktion mit anderen Proteinen Kanäle in die mitochondriale Wand, durch die Cytochrom c hindurch dringen kann. Dies führt schließlich zur Aktivierung d er Procaspase 9. (Hengartner 2000) Beide Wege münden letztendlich in der Aktivierung der Procaspase 3 durch proteolytische Spaltung. Die Caspase 3 zählt als Effektorcaspase zu den wichtigsten Parametern der Apoptoseaktivität. Zu ihren Substraten gehören unter anderem das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-(Adenosindiphosphat-ribose)-Polymerase), durch dessen Spaltung die DNA-Reparatur unterbunden wird. (Takahashi, Alnemri et al. 1996) Außerdem ist die Caspase 3 an der Fragmentierung des Zellkernes beteiligt. (Tang and Kidd 1998)

1.2.3 Cisplatin-Sensitivität der TKZT und Resistenzentwicklung

Keimzelltumoren sind außergewöhnlich sensibel gegenüber cisplatinhaltiger Chemotherapie. Diese Empfindlichkeit entstammt vermutlich ihren Ursprungszellen, den primordialen Keimzellen und humanen fetalen Gonozyten, und ist Ausdruck ihres pluripotenten und embryonalen Charakters. (Boublikova, Buchler et al. 2014) In diesen Zellen ist es von besonderer Relevanz, die Weitergabe fehlerhafter Erbinformationen an Nachkommen zu reduzieren. Die Fähigkeit zur Apoptose kann daher als ein Sicherheitssystem angesehen werden. So werden Fehler durch Reparaturversagen vermieden und die Weitergabe intakten Erbguts garantiert. Keimzelltumoren zeigen demnach nach Schädigung der DNA eine höhere Bereitschaft zum Zelltod als zur Reparatur der Schäden. Verschiedene Prozesse können vor diesem Hintergrund die Neigung zur Sensitivität begünstigen und stellen bei Versagen gleichzeitig potenzielle Resistenzmechanismen dar (siehe 1.2.4).

Auffällig erschien in vorangegangenen Studien an KZT, dass die Wirkung von Cisplatin abhängig vom Zellzyklus war. Nach Cisplatin-Behandlung erfolgte ein Zellzyklusarrest im G2/M Stadium. Sowohl die Schadenserkennung, als auch die Initiierung und die Ausführung der Apoptose fanden in diesem Stadium statt. Ein Durchlaufen der G1/S-Phase war nicht nötig, außerdem reagierten die Zellen in G2/M empfindlicher auf die Behandlung. (Mueller, Schittenhelm et al. 2006) Demnach ließe sich postulieren, dass durch pharmakologische Mittel, welche Zellen zum G2/M-Arrest führen, die Wirkung von Cisplatin potenziert werden könnte, zumindest bei Zelllinien mit intaktem Tumorsupressorgen p53.

Das Tumorsuppressorgen p53 und das hiervon kodierte Protein TP53 gelten als wichtige Determinanten im Rahmen der Apoptose. In Studien an neoplastischen Keimzelltumorlinien wurde jedoch beobachtet, dass sowohl p53-abhängige als auch -unabhängige Wege bestehen, um die Apoptose einzuleiten. Ist der Transkriptionsfaktor p53 aktiv, kann dieser entweder über einen mitochondrialen Weg mittels Bax (ein proapototisches Mitglied der Bcl 2-Famile), Cytochrom c, APAF-1 ("Apoptotic protease activating factor 1"), Caspase 9 und Effektorcaspasen Apoptose induzieren, oder alternativ durch Aktivierungen verschiedener Gene (p21, RB) zum Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase führen und somit die Reparatur des Schadens ermöglichen. (Mueller, Schittenhelm et al. 2006) In weiteren Experimenten zeigte unabhängiger Apoptosevorgang nach Cisplatinanwendung sich ein p53 durch Phophorylisierung zweier MAP ("Mitogen-Activated Protein")-Kinasen (MEK und ERK), die die Aktivierung von Caspase 3 zur Folge hatte. Diese Effektorcaspase spaltet zelluläre Polypeptide, um letztendlich Apoptose herbeizuführen. Dieser Vorgang war p53 unabhängig, da er in NTERA 2-Zellen mit Wildtyp p53 auftrat, sowie in NCCIT-Zellen, die ein mutiertes und somit inaktives p53 aufweisen. (Schweyer, Soruri et al. 2004) Dementsprechend ließe sich schlussfolgern, dass die Apoptoseinduktion nicht auf einen einzigen Weg angewiesen ist, sondern, dass verschiedene Faktoren die Apoptoseneigung begünstigen.

Ca. 20% aller KZT weisen Resistenzen gegenüber Cisplatin auf. Bezüglich ihrer Entwicklung sind intrinsische (primäre) und erworbene (sekundäre) Resistenzen zu unterscheiden. Ersteres beschreibt ein Ausbleiben des Ansprechens auf die Therapie von Anfang an. Reife Teratome besitzen beispielsweise eine intrinsische Resistenz gegenüber Chemotherapie. In 30-40% der nicht-seminomatösen Resttumoren, die nach Therapie verbleiben, finden sich Teratomelemente. (Mayer, Honecker et al. 2003) Reife Teratome entsprechen somatisch

ausdifferenzierten Geweben und teilen somit die Eigenschaften gesunder Körperzellen. Daher kann eine systemische Chemotherapie diese Zellen nicht spezifisch abtöten. (Rübben 2009) Interessant ist diese Resistenz im Gegensatz zur allgemeinen Hypersensitivität invasiver KZT, obwohl in den zugrunde liegenden Zellen genetisch kein grundsätzlicher Unterschied auszumachen ist. Hier bestehen Unterschiede in der Genexpression während der somatischen Ausdifferenzierung im Sinne epigenetischer Regulation. Beispielsweise zeigen sich Auffälligkeiten bei der Biosynthese der Zellzyklus assoziierten Proteine p21 und pRB. Während p21 und pRB von reifen Teratomen exprimiert werden, findet man dies bei übrigen invasiven KZT nicht. Im Falle eines DNA-Schadens den regulieren Tumorsuppressorgen und -protein p53 das Protein p21. Eine Anhäufung von p21 führt konsekutiv zum Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase, sowie zur Inhibition des pRB- Proteins und zur Initiierung von Reparatursystemen. Im Gegensatz zu invasiven KZT zeigen Teratome außerdem ein sehr niedriges Bax:Bcl-2 Verhältnis. Während Bax zu den proapoptotisch Faktoren zählt, gelten Bcl-2-Proteine als antiapoptotisch. Eine erhöhte Expression von Bcl-2 korrelierte in Teratomen und in anderen Tumoren mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie (z.B. beim kleinzelligen Bronchial-Ca). (Strohmeyer, Reissmann et al. 1991; Mayer, Honecker et al. 2003; Boublikova, Buchler et al. 2013) Dies lässt vermuten, dass Teratome aus DNA-Schädigung wahrscheinlich mit einem Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase und nicht mit einer Bax-getriggerten Apotose reagieren, was zumindest teilweise ihre Resistenz gegenüber platinhaltiger Chemotherapie erklären könnte. Darüber hinaus exprimieren Teratome verschiedene ABC-Transporter und verfügen zudem über hohe GST-Aktivität, was bei intrazellulären Entgiftungsprozessen zum Tragen kommen dürfte. (Rübben 2009) (siehe 1.2.4)

Auch Veränderungen der Genexpression anderer Proteine kann die Chemosensitivität von Tumoren herabgesetzen. Erleidet die DNA durch Cisplatin einen Schaden, spielen Proteine bei der Erkennung und der Abwägung der Schwere des Schadens eine Rolle. Durch die Konkurrenz zwischen einerseits Apoptose-induzierenden und andererseits Reparatur anregenden Proteinen, kann die Zytotoxizität von Cisplatin determiniert werden. Über 20 Proteine stehen im Verdacht Knicke und Verdrehungen der DNA zu registrieren, die durch Cisplatin induzierte 1,2-Intrastrangverknüpfungen ausgelöst werden.

 Proapoptotisch: Proapoptotisch wirken u.a. die Proteine hMSH2-Protein und HMutS∝- des humanen DNA-MMR (miss-match repair) - Systems, das High-Mobility-Group-Box1-Protein und das High-Mobility-Group-Box2-Protein (HMGB1 und 2), der nukleoläre Transkriptionsfaktor hUBF (human RNA polymerse I transcription 'upstream binding factor') und der Transkriptionsfaktor TBP (TATA binding protein). (Siddik 2003) Das HMGB1 und das HMGB2 sind chromosomale Proteine, welche eine "High Mobility Group Domäne" tragen und normalerweise bei regulatorischen Prozessen auf DNA-Ebene, wie Transkription, Replikation, Rekombination und Chromatin-Remodeling wirken. Sie besitzen die Fähigkeit an Einzel- oder Doppelstrang-DNA, so auch Cisplatin-DNA-Addukte, zu binden und damit Reparaturmechanismen zu verhindern. Eine zweite Theorie besagt, dass sie in der Lage sind, den Zellzyklus zu modulieren und dadurch Apoptose einzuleiten. Beides erhöht die Sensitivität gegenüber Cisplatin. (Cepeda, Fuertes et al. 2007; Todd and Lippard 2009) Der DNA-Schaden aktiviert weitere Proteine, die proapoptotisch wirken. Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl ("cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog"), welche durch DNA-Schäden stimuliert wird, trägt vermutlich zur Apoptoseinduktion bei. In Studien zeigte sich, dass die Sensitivität auf Cisplatin in murinen Fibroblastenzellen stark vom c-Abl-Expressionslevel abhing. Die Kinase phosphoryliert das Produkt der Tumorsuppressorgene p53, sowie p73, welches p53 in Struktur und Funktion ähnelt. Beide können beim Auslösen von Apoptose partizipieren. (Yuan, Shioya et al. 1999) Außerdem hemmt es vermutlich die Phosphorylierung der AKT (s.u.).

 Antiapoptotisch: Eine Möglichkeit, die Zytotoxizität von Cisplatin abzuwenden, stellen Reparatur anregende Proteine dar. Beispielsweise schützt die Serin/Threoninkinase AKT (Proteinkinase B) Zellen vor dem programmierten Zelltod, indem es Proteine moduliert. Es fördert das Zellüberleben zum Beispiel durch Stabilisierung von XIAP ("X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein"), ein Inhibitor der Apoptose, indem es diesen vor der Ubiquitinierung bewahrt. Desweiteren sagt man AKT eine Aktivierung des NF-kB ("nuclear factor 'kappalight-chain-enhancer' of activated B-cells") nach, ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation spielt.

1.2.4 Resistenzmechanismen

Es existieren Tumoren mit erworbenen Resistenzen, die sich erst nach einem initialen Ansprechen entwickeln. Theoretisch existieren verschiedene Mechanismen, die zur Resistenzentstehung gegenüber Cisplatin führen können.

Verminderung der intrazellulären Cisplatin-Konzentration

Cisplatin überwindet über Transporter passiv und aktiv die Zellmembran und äußerste Schutzbarriere der Zellen. Wahrscheinlich spielen Kupfertransporter dabei eine Rolle. Eine Abnahme der Wirkstoffkonzentration resultiert bei verminderter Aufnahme (Influx) oder erhöhtem Efflux von Cisplatin. Mutationen, die diese Transporter betreffen, z.B. den Influx-Transporter (CTR1), oder die Efflux-Transporter

(ATP7A und B), wurden als mögliche Ursache stärkerer Cisplatinresistenz beschrieben. Desweiteren kann eine Überexpression von ABC-Transportern ("ATPbinding cassette superfamily of transporters") eine Resistenz verursachen. Darüber hinaus entsteht eine Effektabschwächung bei zytosolischer Inaktivierung von Cisplatin durch sulfhydrylhaltige Verbindungen wie Glutathion und Metallothionin. Diese sind fähig Cisplatin zu binden und so zur Detoxifikation beizutragen. (Cepeda, Fuertes et al. 2007; Rübben 2009)

Erhöhung der DNA-Reparatur

Durch Fehler bei der Erkennung des Schadens oder einer Verstärkung von DNA-Reparaturmechanismen erhöht sich die Toleranz der Zelle gegenüber gesetzten DNA-Schäden. Es existieren verschiedene Reparatursysteme die Cisplatin-DNA-Addukte im Zellzyklusarrest beheben können. Beim NER (engl. "nucleotide excisition repair") -Protein handelt sich um einen ATP-abhängigen Proteinkomplex, der vor allem 1,2-Intrastrangverknüpfungen erkennt und exzidiert. Eine DNA-Polymerase füllt die entstandene Lücke anschließend auf. Eine verstärkte Aktivität des NER-Systems führt damit zur Resistenzentwicklung. Weitere Reparatursysteme stellen das MMR (engl. "miss match repair") -Protein und die DNA-abhängigen Proteinkinasen dar. (Cepeda, Fuertes et al. 2007)

Störung der Schadenserkennung und Apoptoseinduktion

Auch ein Versagen bei der Einleitung der Apoptosekaskade hebt die Wirkung von Cisplatin auf. Sollten die entstandenen Addukte, Brüche und Verdrehungen nicht erkannt oder nicht als letal bewertet werden, resultiert hieraus eine Resistenzentwicklung. Ein Beispiel ist der Verlust von MMR-Proteinen, da sie proapoptotische Signale generieren. Dieses Reparatursystem erkennt G-G Intrastrangaddukte, entfernt diese aber nicht. Es tauscht die gegenüberliegende Base am nicht beschädigten Strang gegen eine neue passende Base aus. Es handelt sich im engeren Sinn nicht um einen Reparaturvorgang, da der Schaden nicht behoben wird, sondern durch ihn Apoptose generierende Signale erzeugt werden. Ein Verlust der MMR-Proteine verursachte demnach durch das Versagen, einen Schaden zu erkennen und Apoptose einzuleiten, eine Resistenz. Für KZT wurden 2009 ein Defekt im MMR-System, sowie eine erhöhte Rate an Mikrosatelliteninstabilität und BRAF-Mutationen bei resistenten Tumoren beschrieben. (Honecker, Wermann et al. 2009) Ein ähnliches Szenario stellt sich bei Funktionsverlust der HMGB1/2-Proteine ein, die DNA-Addukte vor Reparaturmechanismen schützen. (Perez 1998)

> Störung der Ausführung der Apoptosekaskade

Defekte innerhalb der Signalkaskade z.B. im mitochondrialen Apoptoseweg durch Verluste einzelner Caspasen oder Überexpression antiapoptotischer Proteine der BCL-2-Familie stellen eine weitere Möglichkeit der Resistenzentstehung dar. (Rübben 2009) Durch Inhibierung der Effektorcaspase-9, die auch bei niedrigen Cisplatindosen die Sensitivität gegenüber Cisplatin zu beeinflussen scheint, kann die Ausführung de Apoptose verhindert werden. (Mueller, Voigt et al. 2003)

1.2.5 Nebenwirkungen

Cisplatin hat neben der gewünschten antitumorösen Wirkung auch dosislimitierende unerwünschte Effekte. Dazu zählen Übelkeit und Erbrechen, Haarverlust, Nephro-, Neuround Ototoxizität. (Wang and Lippard 2005; Cepeda, Fuertes et al. 2007) Vor allem die Nephrotoxizität stellt einen dosisimitierenden Faktor dar und führt am häufigsten zur Änderung des Therapieregimes. Dieser dosisabhängigen Toxizität liegen der Schaden und Untergang tubulärer Zellen durch Apoptose und Nekrose zugrunde. (Jiang and Dong 2008) Daher wird Cisplatin fast immer im Rahmen von Kombinationstherapien angewandt. Hintergrund hierbei ist das Potenzieren der Wirkungen, nicht aber der Nebenwirkungen.

1.3 Aurorakinaseinhibitoren

1.3.1 Zellteilung und Zellzyklus

Alle höheren Organismen bestehen aus mehreren Zellen. Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung stellt die Teilung bestehender Zellen dar. Die wiederkehrende Abfolge von Zellteilungen (Mitosen) und Zellreifungen (Interphasen) bezeichnet man als Zellzyklus. In Eukaryonten ist dies ein kompliziert geregelter Prozess, der gewährleistet, dass genetisches Material, Zellorganellen und Zentrosomen gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt werden. Die Ereignisse eines Zellzyklus lassen sich in 4 Phasen unterteilen: die M- (Mitose und Zytokinese), die G₁-, die S- (Synthesephase) und die G₂-Phase.



Abb. 1: Zellzyklus



Abb. 2: Schematische Darstellung der Mitosestadien und Zellteilung von tierischen Zellen, (Gray and Lewis 1918) Den Abschnitt zwischen zwei Mitosen bezeichnet man als Interphase. Die M-Phase kann in verschiedene Stadien gegliedert werden: die Prophase, die Prometaphase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase. Während der Mitose erfolgt die Kernteilung in zwei Tochterkerne, die identisches Genmaterial erhalten. Die zuvor verdoppelten DNA-Moleküle werden durch den Spindelapparat mit den entfernten Polen verbunden. (Graw 2006) In der Prophase kondensiert das Chromatin. Es entstehen transportfähige Chromosomen, die auch lichtmikroskopisch sichtbar sind. Jedes Chromosom besteht aus zwei Chromatiden, die über einen Proteinkomplex (Kohäsin) miteinander verbunden sind. Ebenfalls in der Prophase separieren sich die Zentrosomen und wandern zu den entgegengesetzten Spindelpolen. Der Spindelapparat besteht aus sich überlappenden Proteinpolymeren, den Mikrotubuli, deren Hauptkontaktpunkt die Kinetochoren an den Chromosomen und die Spindelpole sind. In der Metaphase befinden sich die maximal kondensierten Chromosomen im äquidistanten Abstand zu den Polen in der sog. Metaphasenplatte. Durch die Dynamik der Spindelfasen erreichen sie diesen Zustand. Die Trennung der ausgerichteten Chromosomen erfolgt in der Anaphase durch den Zug der sich kontrahierenden Mikrotubuli zu den entgegengesetzten Polen. Der Proteinkomplex Kohäsin wurde gespalten. Freie, nicht gebundene Chromosomen inhibieren die Progression in die Anaphase. In der Telophase dekondensieren die Chromosomen. Kernmembran, Kernhülle und Zellorganellen bilden sich neu. Die Pol-Mikrotubuli verbleiben als Zentralspindel zwischen den Tochterzellen bestehen. Ein kontraktiler Ring aus Aktinfilamenten gewährleistet die Bildung einer Teilungsfurche. (Chen, Tang et al. 2005) Schließlich persistiert eine letzte Verbindung, der Mittelkörper, zwischen

den sich trennenden Tochterzellen. In ihm sind die parallelen Mikrotubuli der Zentralspindel angeordnet. Durch die Auflösung der Spindel im Mittelköper wird die Zytokinese vollendet.



Abb. 3: Schematische Darstellung eines Metaphasen-Chromosoms mit Zentromer und Kinetochor. Das Zentromer ist unabdingbar für die Chromosomenaufteilung. Es besteht aus dem Kinetochor und darunterliegendem Chromatin. Das Kinetochor liegt an der Außenseite und besteht aus verschiedenen Schichten. Die innere Platte wird aus Chromatin enthaltenden Nukleosomen, dem Protein CENP-A (centromeric protein A), einer Histon-H3 Variante, Hilfsproteinen und DNA gebildet. Die äußere Platte besteht aus den Motorproteinen der Mikrotubuli. Zwischen den

Schwesterkinetochoren liegt die innere Domäne des Zentromers. Hier befinden sich die chromosomalen Passenger Proteine INCENP ("inner centromeric protein"), Aurora-B, Survivin und Borealin/Dasra, sowie CLiPs (chromatid linking proteins), sowie die Kohäsin Untereinheit RAD21 und Aurora-C. (Parra, Gomez et al. 2006) Quelle: (Purves 2004)

Die G₁-Phase (G engl. für gap) beginnt nach vollendeter Zellteilung und erstreckt sich bis zum Beginn der Replikation. Hier befindet sich ein wichtiger Restriktionspunkt, an dem die Teilungsrate einer Zelle reguliert wird. Zellen, die ihre Vermehrung einstellen, treten in eine Ruhephase, die sog. G₀-Phase, ein. In der Synthesephase (S-Phase) erfolgt die Produktion von RNA, Proteinen und die Replikation der Zentrosomen und des Genoms, welches am Ende der S-Phase tetraploid ist. Die G₂-Phase ermöglicht weiteres Wachstum der Zelle und eine Kontrolle der verdoppelten DNA auf Schäden. Sie gilt als Vorbereitungsphase auf die nächste Mitose. Biochemische Fixpunkte, sog. Kontrollpunkte, überprüfen die zeitliche Abfolge und räumliche Ordnung während des Zellzyklus, um eine fehlerfreie Progression in das nächste Stadium zu gewährleisten. Mutationen oder Überexprimierung von am Kontrollpunkt beteiligten Proteinen können durch Veränderung des DNA-Gehaltes daher zur Tumorgenese führen. Es existieren ein G₁-Kontrollpunkt am Ende der G₁-Phase, ein G₂-Kontrollpunkt am Ende der G₂-Phase und ein Spindel-Kontrollpunkt, der in der Metaphase liegt und sicherstellt, dass nur Zellen mit korrekt angeordneten Metaphasenchromosomen in die Anaphase voranschreiten. (Kollareddy, Dzubak et al. 2008)

1.3.2 Aurorakinasen

Die Mitose stellt einen präzise regulierten Prozess dar, der mit Hilfe des Mitosespindelapparats die genaue Aufteilung der replizierten DNA auf die Tochterzellen garantiert. Fehler während der Mitose können die Quelle genomischer Instabilität sein und Tumorigenese initiieren. Verschiedene Kinasen regulieren mittels Proteinphosphorylierungen den Zellzyklus. Die Familie der Aurorakinasen stellen Hauptregulatoren dieses Vorgangs dar. Sie gehören zu den Serin/Threoninkinasen, da sie die Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren. Sie werden von proliferierenden Zellen exprimiert und erweisen sich als unverzichtbar für den Progress des Zellzyklus und der Mitose. Sie

unterstützen hierbei nicht nur die Ausbildung des bipolaren Spindelapparates, die Zentrosomenverdopplung und die Ausrichtung und Separation der Chromosomen, sondern vermitteln auch die Zytokinese und sind Teil der Spindelkontrollpunkte. (Ulisse, Arlot-Bonnemains et al. ; Nigg 2001; Keen and Taylor 2004) So sollte es nicht überraschend sein, dass Fehlregulationen der Aurorakinasen mit chromosomaler Instabilität und Tumorigenese in Zusammenhang stehen. In Tumorzellen sind sie häufig überexprimiert. (Nigg 2001) In menschlichen Zellen sind bislang drei Aurorakinasen bekannt, Aurora-A, -B und -C, die sich in Lokalisation, Substraten und molekularer Funktion während der Mitose unterscheiden. Im Folgenden sollen die Aurorakinasen näher beleuchtet werden.

1.3.2.1 Aurorakinase-A

Die Aurorakinase-A (STK15) spielt bei der Zentrosomenreifung und der Anordnung des Spindelapparates eine Rolle. Außerdem kontrolliert sie den Eintritt in die Mitose. Das Enzym befindet sich während der Interphase an den Zentrosomen und wandert in der Mitose zu den Spindelpolen. Das Aurora-A-Gen liegt auf Chromosom 20q13.1. Die Regulation der Aurorakinase-A ist komplex. Die Expression erreicht in der Prometaphase den Höchstwert. Das Enzym phosphoryliert verschiedene Substrate. Dazu zählen Proteine, die mit den Mikrotubuli assoziiert sind (u.a. Eg5 und TACC) und die durch Phosphorylierung an den Zentrosomen rekrutiert werden. Auch das Tumorsuppressorprotein Lats2 ("Large tumor suppressor homolog 2") wird durch Aurorakinase-A-Phosphorylierung an Zentrosomen verlagert. Bei Funktionsverlust der Aurorakinase-A ordnen sich daher Komponenten der Zentrosome falsch an. Desweiteren beeinflusst Aurorakinase-A die Lokalisation der Aurorakinase-B. Über Phosphorylierung von CENP-A ("centromeric protein A") in der Prometaphase vermittelt die Aurorakinase-A die Anhäufung von Aurorakinase-B an den Zentromeren der Schwesterchromatide. Somit entstehen eine Überschneidung der Funktionen der beiden Kinasen und eine gewisse Abhängigkeit der Aurorakinase-B von der Aurorakinase-A in der Mitoseregulation. Außerdem bindet und phosphoryliert Aurorakinase-A BCRA1 ("breast cancer associated antigen ") und reguliert dessen Funktion. Darüber hinaus scheint die Aurorakinase-A Einfluss auf den Progress des Zellzyklus zu haben. Das Tumorsuppressorgen p53 induziert in Zellen, die einem Stressor ausgesetzt waren, einen Wachstumsstopp oder Apoptose. Die Aktivität und Stabilität des Tumorsuppressorgens p53 wird durch posttranslationale Phosphorylierung beeinflusst. Aurorakinase-A kann derartige Phosphorylierungen vollziehen. Ist die Genexpression der Aurorakinase-A vermindert oder erloschen, zum Beispiel durch RNA-Interferenz, findet diese Phosphorylierung nicht statt. Konsekutiv wird p53 stabilisiert und die Zelle tritt in einen G₂/M-Zellzylusarrest ein. (Andrews 2005, Katayama 2004) Dies bedeutet, dass bei Funktionsverlust der Aurorakinase-A ein G₂/M-Zellzyklusarrest resultieren kann.

1.3.2.2 Die Aurorakinase-B

Die Expression des Gens, welches für die Aurorakinase-B codiert, sowie die Aktivität des Enzyms sind zellzyklusabhängig. Die höchste Expression erfolgt am Übergang zwischen G2-Stadium und Mitose. Die Kinaseaktivität erreicht ihr Maximum zwischen Metaphase und Telophase, also später als Aurorakinase-A. (Carmena and Earnshaw 2003; Soncini, Carpinelli et al. 2006) Die Aurorakinase-B bildet mit drei weiteren nicht-enzymatischen Proteinen INCENP ("inner centromer protein"), Survivin und Borealin/Dasra-B den "chromosomal passenger complex" (CPC). Diese drei Proteine sind essentiell für die Funktion der Aurorakinase-B. Sie determinieren die Aktivität, Lokalisation, Stabilität und wohlmöglich auch die Substratspezifität des Enzyms. Der Komplex koordiniert verschiedene mitotische Prozesse. (Vader, Maia et al. 2008) Die CPC-Proteine zeigen eine charakteristische Variabilität ihrer Lokalisation. In der frühen Mitose (Prometaphase) befinden sich Aurorakinase-B und die anderen Proteine an die Zentromere gebunden. Im weiteren Verlauf der Mitose (Anaphase und Telophase) wandern sie an die Mikrotubuli der Zentralspindel und verbleiben in der Teilungsrille/furche bis zur vollzogenen Zytokinese. Auf seiner Wanderung während der Mitose agiert Aurorakinase-B mit verschiedenen Substraten und erfüllt unterschiedliche Funktionen. Das Enzym unterstützt vor allem das bipolare Anheften der Mikrotubuli an die Kinetochoren der Schwesterchromatide. (Vader, Maia et al. 2008) Diese Funktion realisiert Aurorakinase-B durch Phosphorylierung von CENP-A, einer Variante des Histon H3. Nachdem CENP-A während der Prophase durch Aurorakinase-A phosphoryliert wurde, beruht das Beibehalten dieses Zustandes in den späteren Phasen der Mitose auf Aurorakinase-B. (Fu, Bian et al. 2007) Fehler während dieser Phase des Zellzyklus führen zu syntelisch oder merotelisch verbundenen Kintochoren. Aurorakinase-B kann diese Verbindungen wieder lösen. (Hauf and Watanabe 2004) Außerdem wird auch MCAK ("mitotic centromer-associated kinesin") durch Aurorakinase-B phosphoryliert wird. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Orientierung der Kinetochore zu den entgegengesetzt angeordneten Spindelpolen, der Chromosomenanordnung und der Chromosomenseparation während der Anaphase. Durch die MCAK-Phosphorylierung bleiben bipolare Verbindungen zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli stabil. Freie Kinetochoren und Mikrotubuli hingegen werden depolymerisiert, um neue Verbindungen zu knüpfen. (Fu, Bian et al. 2007) Außerdem wird in diesem Rahmen der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert. Auch Histon H3 wird durch Aurorakinase-B in der Prophase modifiziert. Dieses ist bei der Kondensation der Chromosomen und den Eintritt in die Mitose essentiell. Desweiteren beeinflusst Aurorakinase-B den Zusammenhalt der Chromosomen, beteiligt sich am Aufbau der Zentralspindel und sorgt für die ordnungsgemäße Ausführung der Zytokinese. (Keen and Taylor 2004) Bei Erschöpfung schlägt die Zellteilung fehl und führt zur Polyploidie, da der verdoppelte Chromosomensatz nicht aufgeteilt wurde. (Gautschi,

Heighway et al. 2008) Weitere Substrate, denen bei mitotischen Prozessen Bedeutung zukommt, stellen beispielsweise die Proteine des mitotischen Kontrollpunktes Mad2 ("mitotic arrest deficient 2") und BubR1 ("mitotic checkpoint serine/threonin protein kinase Bub1beta")dar, die in aktiviertem Zustand den Progress in die Anaphase verzögern. Weitere Beispiele sind die zytoskelettalen Proteine Vimentin, Desmin, das GFAP ("glial fibrillary acidic protein") und das MRLC ("myosin II regulatory light chain") sowie die Topoisomerase II und das mgcRacGAP ("male-germ-cell Rac GTPase-activating protein"). (Andrews 2005; Carvajal, Tse et al. 2006)



Abb. 4: Funktionen und Substrate der Aurorakinasen A und B während des Zellzyklus. Quelle: (Gautschi, Heighway et al. 2008)

1.3.2.3 Die Aurorakinase-C

Die Aurorakinase-C ähnelt der Aurorakinase-B und gehört ebenfalls zur Gruppe der "chromosomal passenger proteins". Im Gegensatz zu den zwei anderen Kinasen, die fast in allen Geweben, besonders in mitotisch aktiven, sich teilenden Zellen, vorkommen, findet man die Aurorakinase-C vor allem im Hoden in meiotisch aktiven Keimzellen. Vermutlich lagert das Enzym am Ende der Mitose an den Zentrosomen. Dort spielt es eine Rolle bei der Chromosomenseparation und später bei der Zytokinese. (Carmena and Earnshaw 2003; Chen, Tang et al. 2005)

1.3.3 Aurorakinaseinhibitoren

Die Aurorakinasen werden vor allem von Zellen exprimiert, die sich in der Teilungsphase befinden. Da Tumorzellen allgemein als sehr teilungsaktiv gelten, erschien es wirksam, die Aurorakinasen als ein therapeutisches Ziel der Antitumortherapie zu definieren. Ein Zusammenhang zur Onkogenese geht außerdem aus experimentellen Daten hervor, die bezeugen, dass abnorm hohe oder niedrige Expressionslevel der Aurorakinasen mit genetischer Instabilität assoziiert sind. (Gautschi, Heighway et al. 2008) Genetische Instabilität fördert Tumorentstehung. Dies zeigte sich in malignen Zellen verschiedener Tumorentitäten, wie Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinome, in denen ebenfalls eine Überexpression der Aurorakinasen vorlag. (Soncini, Carpinelli et al. 2006) Auch in postpubertalen Keimzelltumoren konnte eine Aurora-B-Expression nachgewiesen werden. (Esposito, Libertini et al. 2009). 2010 zeigten Baldini et al., dass die Expression der Aurorakinasen-A, -B und -C in Seminomzellen verändert ist und schlussfolgerten, dass diese Kinasen eine Rolle bei der Tumorigenese dieser Entitäten spielen könnten. (Baldini et al, 2010) Im gleichen Jahr studierten Burum-Auensen et al. Cis-Zellen der TKZT mit aneuploider DNA. Sie konnten in eine Überexpression der Aurorakinase-A nachweisen und vermuteten daraufhin einen Zusammenhang mit dem Progress zum invasiven Tumorgewebe. (Burum-Auensen et al, 2010) 2003 untersuchte die Arbeitsgruppe um Mayer et al. unter anderem die Bedeutung der Aurorakinase-A (STK15) in aneuploiden TKZT. Aneuploidie, als Zeichen genetischer Instabilität, war zuvor mit einer Zunahme der Zentrosome, auch in Kombination mit einer Überexpression der Aurorakinase-A, assoziiert worden. (Zou at al, 1998) Die Arbeitsgruppe von Mayer et al. konnte zunächst in Seminomen, Nichtseminomen, sowie CIS-Zellen und Keimzellen mit gestörter Spermatogenese eine Zunahme der Zentrosome feststellen. Eine in allen vier Zellarten einheitliche Veränderung der STK15-Expression (Amplifikation oder Überexpression) konnte jedoch nicht gezeigt werden. (Mayer et al, 2003) Die Arbeitsgruppe um Chieffi et al. befasste sich 2004 vor allem mit der Aurorakinase-B, deren Expression in Seminomen erhöht ist. Daher sind sie der Ansicht, dass die Aurorakinase-B ein adäquates Ziel für eine Antitumortherapie darstellen könnte. (Chieffi et al, 2004)

Bisher sind verschiedene Aurorakinase-Inhibitoren entwickelt worden, die in präklinischen und teilweise bereits klinischen Studien antitumoröse Effekte zeigten. Dazu zählen u.a. ZM-447439 (Georgieva, Koychev et al. 2010), VX-680 (MK-0457) (Ulisse, Arlot-Bonnemains et al. 2010), VE-465 (Lin,Hey-Chi, et al. 2009), AZD 1152 (Aihara, Tanaka et al. 2009), PHA-680632 (Soncini, Carpinelli et al. 2006), MLN8054 (Dees et al. 2008), Alisertib (MLN8237) (Matulonis et al. 2012; Cervantes et al. 2012; Dees et al. 2012) und Danusertib (PHA-739358). Sie unterscheiden sich in ihren Wirkspektren.

1.3.3.1 Danusertib (PHA-739358)



Abb. 5: Struktur von Danusertib , Quelle: www.selleckchem.com

Danusertib (PHA-739358) (C₂₆H₃₀N₆O₃), die in dieser Arbeit untersuchte Substanz, gehört zu einer neuen Klasse von Aurorakinaseinhibitoren. Dieses 3-Aminopyrozolderivat wirkt über eine potente Blockade aller drei Aurorakinasen (A, B und C), wodurch fehlerhafte Chromosomenaufreihung, eine Schwächung des mitotischen Kontrollpunktes, Polyploidie und schließlich kontrollierter Zelltod resultieren. (Steeghs, Mathijssen et al.) Danusertib hemmt die Aurorakinasen A, B und C mit IC₅₀-Werten von 13, 79 und 61 nmol/L. Danusertib wurde präklinisch in vitro an einer Reihe verschiedener Tumorzelllinien als auch in vivo an mehreren Xenograft-Modellen erforscht. (Carpinelli, Ceruti et al. 2007; Meulenbeld et al. 2012) Der Wirkstoff zeigt antiproliferative Effekte auf verschiedene Tumorentitäten (Kolon-, Mamma-, Prostata-, Bronchial- und Ovarial-Karzinomzellen) mit IC₅₀-Werten zwischen 28 und 300 nmol/l. (Carpinelli, Ceruti et al. 2007) Des Weiteren wurden Affinitäten zu anderen Kinasen nachgewiesen, die an der Entstehung von verschiedenen Tumorentitäten beteiligt sind (z.B: CML, ALL, Schilddrüsen-, Prostata- und Mammakarzinom). Dazu gehören das RET-Protoonkogen, Trk-A (engl. auch: "neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1") und FGFR-1 (engl. "fibroblast growth factor receptor")(Carpinelli, Ceruti et al. 2007), sowie die Imatinib-resistente Abl-Tyrosinkinase, die eine T315I-Mutation aufweist. In einer Studie wurden durch Danusertib antiproliferative Effekte auf BCR-ABL positive und negative murine Leukämiezelllinien nachgewiesen. Danusertib bewirkte bei der BCR-ABL negativen Linie (BaF3) eine Vervielfältigung des DNA-Gehalts durch Endoredublikation, während es in anderen BCR-ABL positiven Zelllinien (BaF3-p210, BaF3-M351T, BaF3-T315I) dosisabhängig zum G2/M-Arrest führte. (Gontarewicz, Balabanov et al. 2008) Ähnliche Effekte wurden auch an hepatozellulären Karzinomzellen beobachtet. (Benten, Keller et al. 2009)

Danusertib wurde eine der ersten Aurorakinase-Inhibitoren, deren antiproliferative Wirkung klinisch sowohl in Phase I- als auch in Phase II-Studien untersucht wurde. (Meulenbeld et al. 2012; Meulenbeld et al. 2013; Cohen et al. 2009; Steeghs et al. 2009;) Klinischen Phase-I-Studien zufolge, in denen die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen

Eigenschaften sowie das Nebenwirkungsprofil von Danusertib evaluiert wurde, beträgt die Plasma-Clearance Rate 10-59 l/h und die Eliminationshalbwertszeit durchschnittlich ca. 30 Stunden. Hierbei erhielten 50 Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren intravenös Danusertib. Auftretende Toxizitäten waren dosisabhängig. Vor allem eine Neutropenie stellte eine dosislimitierende Nebenwirkung dar. Des Weiteren klagten Patienten über Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust, Müdigkeit und Durchfall. (Steeghs, Eskens et al. 2009) Bei Verabreichung extrem hoher Dosen oder Infusionsraten unter 1 Stunde treten zusätzlich Kardio- und Nephrotoxizitäten auf. (Cohen, Jones et al. 2009) In beiden Phase I-Studien, die Patienten mit unterschiedlichen refraktären soliden Tumoren einschlossen, war die Antitumoraktivität von Danusertib nicht primärer Endpunkt der Studie. wurde jedoch als sekundärer Endpunkt mit beleuchtet. Bei nur einem Patienten mit refraktärem kleinzelligem Lungenkarzinom konnte ein objektives Ansprechen des Tumors aufgezeigt werden. Da 42% und 23,7% der Patienten eine Stabilisierung ihrer Erkrankung erreichten, 13 % und 9,5 % für > 6 Monate, schlossen die Autoren jedoch eine antitumoröse Aktivität der Substanz nicht aus und empfahlen weiterführende Phase II Studien. Insgesamt fiel eine sehr hohe Variabilität der pharmakokinetischen Parameter zwischen den einzelnen Patienten auf. Ob sich dieses Phänomen auf Unterschiede der Transportproteine oder des Metabolismus zurückführen lässt, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. (Steeghs, Eskens et al. 2009) 2013 wurden die Effektivität und Toxizität von Danusertib erstmalig in einer klinischen Phase II Studie untersucht. Dabei wurde Danusertib als i.v.-Monotherapie 81 Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostata-Karzinom (CRPC), die nach Gabe von Docetaxel eine Tumorprogression zeigten, verabreicht. Diese Studie konnte nur minimale Effekte des Wirkstoffs nachweisen. Bei nur 2 Patienten fiel der PSA-Wert nach 4 Wochen um > 50 % zum Ausgangswert (primärer Endpunkt der Studie). Eine objektives Ansprechen des Tumors nach den Kriterien der "modified RECIST" und "PSA Working group" konnte bei keinem Patienten erreicht werden. 13,6% der Patienten zeigten eine Stabilisierung ihrer Krankheit für > 6 Monate. Die Behandlung mit Danuseritib wurde gut vertragen. Die häufigste Nebenwirkung > Grad 3 nach der CTC ("common toxicity criteria") stellte auch hier die Neutropenie dar. Darüber hinaus litten die Patienten unter anderem an gastrointestinalen Nebenwirkungen (Nausea, Diarrhoe, Appetitlosigkeit) sowie Müdigkeit und neutropenischem Fieber. Es gab keine Todesfälle, die auf die Behandlung mit Danusertib zurückzuführen waren. (Meulenbeld 2013)

1.4 Fragestellung

Keimzelltumore nehmen aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Chemotherapie eine besondere Stellung ein. Besonders seit der Einführung von Cisplatin gelten sie als gut therapierbare Entität, bei der sogar noch in metastasierten Stadien hohe Heilungsraten

erzielt werden können. Leider werden dem Therapieerfolg durch die Entstehungen von Resistenzen Grenzen gesetzt. Um diesem Problem Herr zu werden, steht die Entwicklung neuer Therapiekonzepte, basierend auf der Identifikation neuer Medikamente, im Mittelpunkt der klinischen Forschung. Durch die Identifikation neuer Substanzen, die die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöhen, könnten Resistenzmechnismen außer Kraft gesetzt werden. Vor diesem Hintergrund scheint es von besonderem Interesse, dass die Cisplatinwirkung in Studien an Keimzelltumorlinien eine Abhängigkeit vom Zellzyklus zeigte. Die Schadenserkennung, die Initiierung und auch die Ausführung der Apoptose fanden im G2/M-Stadium statt. Zudem reagierten die Zellen in G2/M empfindlicher auf die Behandlung. (Mueller, Schittenhelm et al. 2006) Demnach lässt sich postulieren, dass pharmakologische Mittel, die die Zelle zum G2/M-Arrest führen, diese für eine Cisplatinbehandlung sensibilisieren können. Die Familie der Aurorakinasen stellen Hauptregulatoren des Zellzyklus dar. In diesem Zusammenhang erscheinen die Ergebnisse zu den Aurorakinaseinhibitoren an einigen Leukämielinien relevant, bei denen ein G₂M-Arrest nach PHA-Behandlung beobachtet wurde. (Gontarewicz, Balabanov et al. 2008) Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Wirkungsweise von PHA-739358 an Nichtseminomzelllinien zu erforschen und darüber hinaus seine Eigenschaften als möglichen Kombinationspartner für Cisplatin zu charakterisieren. Zunächst sollte das Wachstumsverhalten der Zellen unter alleiniger PHA-Anwendung untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob eine Relation zur Dauer der Anwendung und der Dosis besteht. Es sollte die Konzentration, die das Zellwachstum um 50% reduziert (sogenannte IC₅₀) für eine 48-stündige Inkubation bestimmt werden. Hierzu wurden MTT- und Proliferationsassays mit sowohl Cisplatin-sensitiven, also auch -resistenten Zellen durchgeführt. Interessant war, ob Unterschiede zwischen den Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellen zu beobachten wären, oder ob die Resistenzmechanismen die Wirkung der Aurorakinaeinhibitoren nicht beeinflussten. Dies wäre ein denkbares Szenario im Falle einer sogenannten "Multi-drug resistance" gewesen. Hierbei behindern Resistenzmechanismen die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika. Anschließend sollte die Wirkung von PHA-739358 mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) charakterisiert werden, um den Einfluss auf den DNA-Gehalt und die Verteilung im Zellzyklus zu analysieren. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich die Behandlung im Endeffekt für die Zelle als fatal erweist und der Zelltod (Apoptose) eingeleitet wird. Dazu wurde anhand von Western Blots untersucht, ob Charakteristika der Apoptose zu beobachten sind. Abschließend galt es zu prüfen, welche Bedeutung PHA als Kombinationspartner für Cisplatin zukommt, und ob durch eine Kombination der Medikamente deren Wirkung potenziert wird und somit ein Synergismus zwischen den Substanzen nachzuweisen ist. Hierzu wurden ebenfalls 48h-Proliferationsassays unter einer Kombinationsbehandlung durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Es wurden drei verschiedene humane nichtseminomatöse Zelllinien verwendet, die sensitiv auf Cisplatin reagieren. Des Weiteren kamen resistente Zelllinien zur Anwendung, die in unserem Labor zuvor aus diesen parentalen Zelllinien generiert worden waren. (Oechsle et al. 2011; Port et al. 2011) Dafür war der Zellkultur über einen Zeitraum von 18 Monaten Cisplatin in subletalen Dosen, beginnend mit der IC₁₀, zugesetzt worden. Bei Erreichen einer 50%-igen Letalität war die Behandlung ausgesetzt und eine Erholungsphase von drei Passagen eingeschaltet worden. Es handelt sich bei allen Zelllinien um adhärent wachsende Zellen.

2.1.1 2102EP und 2102EP-R

Diese nullipotente Zelllinie mit Charakteristika eines Embryonalkarzinoms entstammt einem humanen testikulären Nichtseminom mit Teratokarzinom- und Dottersacktumoranteilen. Die adhärend wachsenden Tumorzellen wurden von Peter Andrews aus Sheffield, UK, isoliert und unserem Labor freundlicherweise von Leendert Looijjenga aus Rotterdamm, NL, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 NTERA2 und NTERA2-R

Es handelt sich um pluripotente Zellen eines testikulären Teratokarzinoms, die ebenfalls Charakteristika eines Embryonalkarzinoms aufweisen. Diese adhärend wachsenden Tumorzellen weisen sichtbare Einlagerungen (Granula) auf. *In vitro* zeigen sie, z.B. unter Alltrnas-Retinolsäure (ATRA) die Fähigkeit zur Differenzierung. Diese Zelllinie wurde von der DSMZ in Braunschweig bezogen.

2.1.3 NCCIT und NCCIT-R

Diese pluripotente Nichtseminomzelllinie mit Charakteristika eines Embryonalkarzinoms entstammt ebenfalls einem Teratokarzinom. Dieser Keimzelltumor zeichnete sich durch eine primär extragonadale (mediastinale) Lage aus. Die adhärent wachsenden Tumorzellen weisen im Gegensatz zu den anderen Zelllinien eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 auf. Diese Zelllinie wurde von der amerikanischen Zelllinienbank ATCC bezogen.

2.2 Zellbiologische Verfahren

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter einer Hera*safe*-Sterilbank (Heraeus). Es kamen verschiedene Medien und Zusätze zur Anwendung, die zuvor gekühlt (4°C) gelagert und vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurden. Für die Zellinie NTERA2 wurden

dem Medium DMEM +GlutaMAXTM-I 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. 2102EP und NCCIT wurden in DMEM/F-12 (1:1) kultiviert, dem 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, sowie 1% L-Glutamin 200mM zugegeben wurde. Das Ansetzen der Medien fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen nach Abnahme des Überstandes aus der Zellkulturflasche vorsichtig mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 37°C warmem Trypsin, welches im Brutschrank für 2 Minuten einwirken konnte, lösten sich die adhärenten Zellen vom Boden. Durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflaschen wurde dieser Vorgang gefördert. Die Reaktion des Enzyms wurde mit Medium gestoppt. Schließlich wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 1500 U/min und 20°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet im Verhältnis 1:4 oder 1:5 verdünnt ("gesplittet") und erneut in Medium ausgesät.

2.2.2 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch 2-minütiges Erwärmen im Wasserbad und anschließende Zugabe von 5 ml Medium. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei 20°C und 1500 U/min, wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in einer 25 cm²- Zellkulturflasche ausgesät. Da die Zellen mit 10% DMSO, welches bei Temperaturen über 0°C zytotoxisch wirkt, eingefroren waren, wurde auf zügiges Arbeiten geachtet.

2.2.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Aufbewahrung der Zellen erfolgte das Einfrieren nach maximal 10facher Passage in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurde die aus einer Zellkulturflache gelöste Zellsuspension 5 Minuten bei 20°C und 1500 U/Min zentifugiert, der Überstand verworfen, mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation die Zellzahl bestimmt. 1-3 x 10⁶ Zellen wurden mit Zusatz eines Einfriermediums aus 90% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfid) in Kryoröhrchen überführt und in einem "Cryo 1°C Freezing Container" (Nalgene, Roskilde, Dänemark) bei -80°C eingefroren. Nach 24h wurden die Kyroröhrchen in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt. Das Lösungsmittel DMSO fungiert hier als Gefrierschutzmittel, da es die Eiskristallbildung in den Zellen verhindert. Da es in hohen Konzentrationen (>10%) zytotoxisch wirkt, muss beim Arbeiten auch hier auf eine schnelle Handhabung geachtet werden.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

2.3.4.1 Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 40 μ l Trypanblau (0,2% (w/v) in Milli-Q-H₂O) gemischt (1:5). Davon wurden 10 μ l in die Zählkammer appliziert. Trypanblau färbt die toten Zellen an, da lebendige Zellen den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren heraustransportieren können. So konnte die Vitalität der Zellen untersucht werden. Am Mikroskop wurden die Zellen in 4 Großquadraten der Zählkammer ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Die Zellkonzentration ergibt sich als Produkt aus der Zellzahl, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10⁴).

2.3.4.2 ViCell[™]Counter

Um eine halbautomatisierte Zellzahlbestimmung am ViCellTMCounter durchzuführen, wurde 1 ml der zu untersuchenden PBS-Zellsuspension gemessen. Das Gerät beurteilt 50 Bildeinstellungen pro Messprobe und kann enbenfalls mit der Trypanblau-Methode lebendige und tote Zellen unterscheiden. Die ermittelte vitale Zellmenge wird in Zellzahl x 10⁶/ml angegeben. Das Ergebnis muss schließlich mit der Zellsuspensionsmenge multipliziert werden.

2.3 Zytotoxizitätsassay (MTT)

Der Zytotoxizitätsassay MTT diente der Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen unter Behandlung von PHA-739358 in unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei kann die IC₅₀-Dosis, also die Konzentration des Medikamentes bestimmt werden, bei der nur noch 50% der Zellen überleben und metabolisch aktiv sind. Grundlage dieses Versuchs ist die enzymatische Reduktionsreaktion des schwach gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blauvioletten wasserunlöslichen Formazankristallen (1-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-3,5-Diphenylformazan). Dieser Prozess wird durch die Succinat-Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien lebendiger Zellen gewährleistet und ist irreversibel.

NADH + MTT ______ Formazan + NAD⁺

Daher spricht eine blauviolette Färbung für einen hohen Anteil vitaler Zellen. Die Absorption des Formazans wird photometrisch gemessen und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Der Assay wurde an allen drei Zelllinien sowie ihren Cisplatin-resistenten Sublinien nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit ansteigenden PHA-739358-Konzentrationen in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Well wurden am ersten Tag 4
x 10³ Zellen in 150 µl Medium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO2 folgte die Zugabe von 50 µl der entsprechenden PHA-Konzentrationen pro Well. Das Anfertigen einer 8-stufigen Konzentrationsreihe erfolgte mit PHA-739358 von 10 µM bis 0,078 µM, von 5 µM bis 0,039 µM bzw. von 2,5 µM bis 0,0195 µM. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden pro Well 50 µl Medikament zugegeben. Das Endvolumen betrug 200 µl pro Well. Jede Konzentrationsstufe wurde 6-fach angesetzt. Die Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel (DMSO) von PHA-358 behandelt. Die Menge von DMSO richtete sich nach dem Anteil in der höchsten Konzentration des in DMSO gelösten Wirkstoffs PHA im Assay. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 200 µl einer MTT- Medium-Lösung von 0,5 mg/ml zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von 3 Stunden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO2, folgte das vorsichtige Absaugen der MTT-Medium-Lösung, die durch 100µl DMSO ersetzt wurde. DMSO führt zum Lösen der Formazankristalle. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 570 nm im Wallac 1420 Victor² Mulilabel Reader (Perkin-USA) gemessen. Unter Verwendung der CalcuSyn-Software Elmer, Waltham, (www.biosoft.com) wurde die Information verarbeitet und graphisch dargestellt.

MTT Stocklösung	:	5 mg/ml in PBS;
		sterilfiltriert mit 0,22 μM Spritzenfilter
MTT-Medium-Mix:		2,4 ml MTT Stocklösung + 21,6 ml Medium

Konzentrationsreihe :



Abb.6 Anfertigung einer Konzentrationsreihe. Das erste Falcontube wurde mit 5 ml (10µM) gefüllt, die anderen mit 2,5 ml Medium. Nun wurden jeweils 2,5 ml des Gemischs entnommen und in das nächste Tube übertragen. Ein Falcontube blieb frei von Medikament. Da in der Mikrotiterplatte schon 150 µl enthalten waren, mussten in den 50 µl, die noch zugefügt wurden die 4fache Konzentration enthalten sein, also an Stelle 10 µM 40 µM.

2.4 Proliferationsassays

2.4.1 Monotherapie mit PHA-739358

Beim Proliferationsassay wurde das Wachstumsverhalten der sechs verschiedenen Zelllinien unter einer Monotherapie mit PHA-739358 nach 24 und 48 Stunden geprüft. Hierzu erfolgte die Aussaat von 1 x 10⁶ Zellen der Cisplatin-sensiblen, bzw. 3 x 10⁵ Zellen der Cisplatinresistenten Zelllinien in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm mit 5 ml Medium. Die Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen war nötig, da, wie Vorexperimente zeigten, unter diesen Voraussetzungen ähnliche Zellkonfluenzen erreicht werden konnten. An Tag 2 erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe von PHA-739358 in 50 ml-Falcontubes, sowie bei gleicher Konfluenz der beiden Zelllinien die Behandlung mit 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 µM PHA-739358. Das Endvolumen in der Schale betrug 10 ml. Aufgrund der Verdünnung musste die zugegebene Konzentration (5 ml) doppelt so hoch sein, wie die gewünschte. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dem Medium der Kontrollzellen wurde DMSO, das Lösungsmittel von PHA-739358, zugegeben. Die Menge des Lösungsmittels richtete sich nach der höchsten Konzentration von PHA-739358 im Assay. Nach Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, CO2 erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels 95% Luftfeuchtigkeit und 5% Trypanblaufärbung und Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden sämtliche Überstände in 50ml Falcontubes aufgefangen. Das Lösen der adhärent wachsenden Zellen wurde durch die Zugabe von 250 µl Trypsin und einer anschließenden Applikation von 5 ml Medium pro Kulturschale zum Stoppen der Enzymreaktion erreicht.

2.4.2 Kombinationstherapie

Um das Wachstumsverhalten der sechs Zelllinien unter Kombination von PHA-739358 und Cisplatin zu untersuchen, erfolgte zunächst die Aussaat von 2 x 10⁵ vitalen Zellen in 6-Well-Platten in 3 ml Medium pro Well. Am nächsten Tag wurden die durch frühere Experimente (Port et al. 2011) mittels MTT ermittelten Konzentrationen IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ von Cisplatin und entweder 0,025, 0,05, 0,1 oder 0,2 µM von PHA-739358 hinzugegeben. Jede der Einzelkonzentrationen wurde mit jeder anderen Einzelkonzentration in Dreifach-Ansätzen kombiniert. Es wurden zudem folgende Kontrollen angesetzt: unbehandelt, unbehandelt mit DMSO, Monotherapie Cisplatin und Monotherapie PHA-739358 in den entsprechenden Konzentrationen der zwei Substanzen. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen per ViCell[™]Counter gezählt.

- Cisplatin Stocklösung: 1 mg/ml (3333 µM); 1:100 Verdünnung = 100 µl Cis + 9900 µl Medium
- PHA-739358 Stocklösung: 10 mM; 1:1000 Verdünnung = 10 µl PHA + 9990 µl Medium

2.4.2.1 2102EP /-R

Diese Zelllinien wurden mit der gemessenen IC_{50} sowie den abgeleiteten Konzentrationen IC_{25} und IC_{10} der sensitiven Zellen für Cisplatin behandelt. Diese liegen bei 0,8 µM, 0,36 µM und 0,14 µM. Diese Konzentrationen wurden mit 0,1, 0,05 und 0,025 µM PHA-739358 kombiniert, was ebenfalls der IC_{50} sowie den abgeleiteten Konzentrationen IC_{25} und IC_{10} für PHA-739358 entspricht.

2.4.2.2 NTERA2 /-R

Auch diese Zelllinien wurden mit der gemessenen IC_{50} , sowie den abgeleiteten Konzentrationen IC_{25} und IC_{10} der sensitiven Zellen für Cisplatin behandelt. Diese liegen bei 0,4 µM, 0,2 µM und 0,08 µM. Diese Konzentrationen wurden mit 0,1, 0,05 und 0,025 µM PHA-739358 kombiniert, was ebenfalls der IC_{50} sowie den abgeleiteten Konzentrationen IC_{25} und IC_{10} für PHA-739358 entspricht.

2.4.2.3 NCCIT/-R

Auch hier erfolgte die Behandlung mit der Cisplatin IC_{50} für die sensitiven Zellen für 48 h von 1.7 µM, sowie den abgeleiteten IC_{25} von 0,85 µM, und der abgeleiteten IC_{10} von 0,34 µM. Als Kombinationspartner diente PHA-739358. Es wurde mit 0,1, 0,05 und 0,025 µM behandelt, was ebenfalls der IC_{50} sowie den abgeleiteten Konzentrationen IC_{25} und IC_{10} für PHA-739358 entspricht.

2.5. Durchflusszytometrie

2.5.1. Propidium-lodid- (PI-) Messung

Ziel der Durchflusszytometrie ist die Analyse von Zellen aufgrund ihrer lichtstreuenden Eigenschaften. Es können der DNA-Gehalt und physikalische Eigenschaften der Zellen charakterisiert werden. Die Messung wurde an einem FACSCalibur Durchflusszytometer (FACS: fluorescence activated cell sorting) der Firma Becton Dickenson, Heidelberg, durchgeführt. Hierfür passieren die zu untersuchenden Zellen in einer Suspension, angesaugt durch eine Kapillare, einzeln einen Argonlaserstrahl, der zur Lichtemission bei 488 nm anregt. Zuvor sind die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen worden. Die Streuung des Lichtes ist abhängig von der Beschaffenheit und den physikalischen Eigenschaften der Zelle. Dies zeigt sich in der Streuung im Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. "forward scatter"), welche vom Volumen der Zelle abhängt und der Streuung im Seitwärtsstreulicht (SSC = engl. "sideways scatter"), welche durch die Granularität der Zelle bestimmt wird. Die Messung erfolgt mittels Detektoren, nachdem das emittierte Licht nochmals gefiltert wurde. Der verwendete Farbstoff Propidium-Iodid (PI: $C_{27}H_{34}N_4I_2$) durchdringt die Zellmembran permeabilisierter Zellen und interkaliert in die DNA, so dass aus

der gemessenen Helligkeit auf den DNA-Gehalt geschlossen werden kann. Der DNA-Gehalt variiert bei Zellen während des Zellzyklus. Daher kann durch die Durchflusszytometrie auf die Phase des Zellzyklus geschlossen werden, in der sich die zu untersuchende Zellen bei ihrer Fixierung befand: G0/1: diploider Chromosomensatz (2n); S-Phase: Replikation der DNA: Chromosomensatz zwischen diploid und tetraploid (2n – 4n); G2: tetraploider Chromosomensatz (4n). Beim Einsatz von Danusertib kommt es zur Polyploidisierung des DNA-Gehaltes, da bei ungehemmter Mitoseaktivität die Zytokinese, d.h. die Zellteilung nicht korrekt vollzogen wird. Diese DNA-Vervielfältigungen können als weitere G2-Peaks (4n, 8n, usw.) detektiert werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

2.5.1.1 Behandlung der Zellen

Analog zu den Proliferationsassays wurden 1 x 10^6 Zellen der Cisplatin-sensiblen, bzw. 3 x 10^5 Cispaltin-resistenten Zelllinien in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) in 5ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe sowie bei gleicher Konfluenz der beiden Zelllinien die Behandlung mit 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 μ M PHA-739358 in Triplikaten. Aufgrund der Verdünnung musste die zugegebene Konzentration (5 ml) doppelt so hoch sein wie die gewünschte. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Kontrolle wurde das Lösungsmittel (DMSO) von PHA-739358 in höchster Konzentration zugesetzt. Nach Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO2 erfolgte die Präparation der Zellen wie unten angegeben.

2.5.1.2. Präparation der Zellen

- 1. Waschen der behandelten Zellen mit PBS
- 2. Zentrifugation und Absaugen des Überstandes
- 3. Fixierung der Zellen mit 70%-igem eiskalten Ethanol (-20°C)
- 4. Ggf. Lagerung bei -20°C bis zur Analyse
- 5. Erneutes Waschen der Zellen mit PBS
- Anfertigung einer Propidium-Iodidlösung bestehend aus: Propidium-Iodid 0,02% (v/v) und RNase 0,01% (v/v) in PBS (in 5 ml PBS 20μl PI-Stammlösung und 50 μl RNase)
- 7. Resuspendieren des Zellpellets durch Zugabe von 200µl dieser DNA-Färbelösung und Überführen in FACS-Röhrchen
- 8. 30-minütige Inkubation

- 9. Zugabe von 100-200 µl PBS pro Röhrchen
- 10. Messung am FACSCalibur, minimmal 20.000 Counts

2.6 Proteinchemische Verfahren

2.6.1 Behandlung der Zellen und Proteinisolation für Western Blot Analyse

Zunächst erfolgte die Aussaat der Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 9cm). Pro Versuch wurden vier Schalen pro Zelllinie benötigt. Am Folgetag wurden die Zellen in zwei Schalen mit der IC₅₀ von PHA-739358 behandelt. Die IC₅₀-Werte wurden mittels vorausgehender Proliferationsassays bestimmt. Die Zellen der zwei anderen Schalen fungierten als Kontrollzellen (Behandlung mit DMSO). Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Kontrollzellen einer Schale und die PHA-behandelten Zellen einer zweiten Schale samt Medium gesammelt, zentrifugiert (1500 rpm), dann der Überstand abgesaugt und ein Western Blot Lyse-Puffer hinzugegeben. Bei dem Puffer handelte es sich um einen RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1% Nonidet P-40 (v/v), 0,25% Na-Desoxycholat (10%) (w/v), 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1mM Natriumorthovanadat (Na₃VO₄), 1 Tablette / 10 ml "complete protease inhibitors" (Aprotinin/Leupeptin)). Den verbleibenden Zellkulturschalen (1x Kontrollzellen, 1 x behandelte Zellen) wurde vorsichtig das Medium entnommen und dreimal mit PBS gespült, bevor 10 ml frisches Medium ohne Zugabe von Medikament oder DMSO zugegeben wurde. Die Zellen verblieben weitere 48 Stunden medikamentenfrei im Brutschrank. Dann wurden die Zellen auch hier nach oben geschildertem Schema geerntet. Die Proben wurden zunächst für eine Stunde auf Eis gegeben. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C. Vor der Weiterverwendung wurden die Zelllysate bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt.

2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Methode)

Ziel dieser Messung ist die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lysaten. Hintergrund der Methode stellt die Bildung blauer Komplexe aus Proteinen und Coomassie Brilliant Blue G-250 in einem pH-Bereich von 0 – 1 und deren photometrische Messung dar. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Eichreihe von 0-10 µg/µl Protein mit Hilfe einer BSA-Stocklösung (100 mg/ml). Dazu wurden zwei Lösungen hergestellt (Lösung A und B), die in unterschiedlichen Verhältnissen zusammengefügt wurden. Der verwendete Lysepuffer entsprach dem Puffer, der auch den Zellproben zugegeben wurde.

- Lösung A: 100 µl BSA-Stammlösung + 900 µl Lysepuffer
- Lösung B: 100 μl H₂O + 900 μl Lysepuffer

Eichreihe:

Konzentration	10	8	6	4	2	1	0.5	0
µI Lösung A	100	80	60	40	20	10	5	0
µI Lösung B	0	20	40	60	80	90	95	100

Die Aufbereitung der Zellproben und Eichlösungen erfolgte in 2 Schritten. Zunächst mussten die Proben mit Hilfe von 0,1 M HCI, welches mit destilliertem Wasser 1:9 verdünnt wurde, angesäuert werden (pH 0-1). Dazu wurden 3 µl der Proben mit 27 µl des verdünnten HCI und schließlich 875 µl der filtrierten und 1:5 verdünnten Bradford-Lösung (Protein Assay Reagent, BIORAD) zusammengefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte die Messung im Photometer bei 595 nm.

2.6.3 Western Blot Analyse

Eine Western Blot Analyse dient dem Nachweis bestimmter Proteine, die hierzu zunächst in einem Gel in einem elektrischen Feld nach Masse und Ladung aufgetrennt und anschließend ebenfalls mittels eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen werden. Erster Schritt ist die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches in einem Acrylamidgel. Bei der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Trägermembran bleibt das unter der elektrophoretischen Auftrennung entstandene Muster erhalten. Die Identifikation der gesuchten Proteinbanden erfolgt anhand spezifischer Antikörper, die in verdünnter Lösung auf die Membran gegeben werden. Die Visualisierung dieser Antikörper wird durch Sekundärantikörper erreicht, die sich gegen die Fc-Region des Primärantikörpers richten, sowie der anschließenden Chemilumineszenzdetektion.

2.6.3.1. Herstellung der Gele

Als Trennmedium wurden Polyacrylamidgele verwendet. Der Gelherstellung liegt eine Polymerisation von Acrylamid zugrunde. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyethylendiamin (TEMED) gestartet, da hier freie Radikale gebildet werden, die mit freien Acrylamidmonomeren reagieren und Polymere bilden. Bisacrylamid dient, um diese zu vernetzen. Letztendlich entsteht ein komplexes, flexibles, dreidimensionales Netzwerk. Das Ausmaß der Hohlräume, also die effektive Porengröße, die über den Trenncharakter des Gels entscheidet, ist umgekehrt proportional zur eingesetzten Menge an Acrylamid. Durch SDS (Natrium-Dodecrylsulfat) in Verbindung mit schwefelbrückenspaltenden Thiolverbindungen (z.B. DTT, Dithiothreitol), werden Proteine denaturiert und zerlegt. Daraufhin werden die Polypeptidketten gleichmäßig mit negativ geladenem SDS beladen. Dies überlagert die Eigenladung der Proteine, so dass diese ausschließlich nach der Größe aufgetrennt werden. (Eckert and Kartenbeck 1997)

Trenngel 12% ig für 6 Gele:

	Menge
Volumen gesamt	60 ml
dH ₂ O	20,1 ml
Acrylamid 30%	24 ml
1,5M Tris/HCI pH 8,8	15 ml
SDS 20%	300 µl
APS 10%	300 µl
TEMED	60 µl

Sammelgel 4%ig für 6 Gele:

	Menge
Volumen gesamt	30 ml
dH ₂ O	18,3 ml
Acrylamid 30%	4 ml
0,5M Tris/HCI pH 6,8	7.5 ml
SDS 20%	150 µl
APS 10%	150 µl
TEMED	30 µl

2.6.3.2. Eindimensionale (1D)-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ziel dieses Versuchs ist die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Hierzu wurden die Proben zunächst in einem Verhältnis 1:4 mit Ladepuffer (20% Glycerol (v/v), 1% DTT (w/v), 20% 1M Tris-HCl pH 7,6 (v/v), 0.08% Bromphenolblau (v/v)) gemischt, für 5 min bei 99°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Vor der Weiterverwendung wurden die Proben kurz zentrifugiert, da durch den Erhitzungprozess innerhalb des Eppendorf-Gefäßes eine Volumenreduktion durch Verdampfung und Ablagerung am Deckel stattfinden kann.

- Einspannen der 12%-igen Gele in die Laufkammern
- > Auffüllen mit SDS-Laufpuffer
- > Auftragen des Rainbowmarkers (20µl) (GE Healthcare,Uppsala, Schweden)

- > Auftragen der Proben (max. 30 µl pro Kammer)
- > Spannung 70 V für 30 min zum Einlaufen der Proben in die Sammelgele
- > Spannung 120 V für 1-3 h zur Auftrennung der Proteine

Gegen Ende der Auftrennung muss darauf geachtet werden, dass die Kontrollbanden weit genug getrennt wurden, um später die einzelnen Proteinbanden voneinander differenzieren zu können.

2.6.3.3. Immunblot

Beim Western Blot wird das Proteinmuster der SDS-Gele durch Elektrophorese auf eine PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dies geschieht mit Hilfe einer Trans-Blot-SD (Semi-Dry) Elektrophorese-Kammer. Dabei muss die Membran zunächst 15 s mit Methanol aktiviert, dann 2 min in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich 5 min in kaltem Semi-Dry-Transfer-Puffer (Tris 0,6% (w/v), Glycin 0,3% (w/v), SDS 0,04% (w/v), MeOH 20% (v/v)) äquilibriert werden. Für den Transfer wurde die Nitrozellulosemembran unter das Acrylamidgel gelegt, begrenzt von zwei mit Transfer-Puffer durchtränkten Filterpapieren (Whatman Paper). Der Transfer erfolgte bei 20 V für 30 min. Durch das elektrische Feld wandern die Proteine aus dem Gel in die Membran und bleiben dort aufgrund hydrophobischer Wechselwirkungen haften.



Abb.7 Aufbau Immunoblot

2.6.3.4. Antikörper

Der Nachweis des gesuchten Proteins auf der Membran erfolgt mittels eines spezifischen Antikörpers. Direkt nach dem Blot wurde die Membran zunächst für 15 s in Methanol getaucht und dann 1h bei Raumtemperatur in 5%igem BSA in TBS/Tween inkubiert. Dieser als Blocken bezeichneter Vorgang soll unspezifische Bindungen des Antikörpers an andere Proteine vermindern. Der verdünnte Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Anwendung der Primärantikörper erfolgte die Inkubation der entsprechenden Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten immer drei Waschschritte mit TBS/Tween à 5 min.

Ziel dieses Versuchs war der Nachweis des proteolytischen Abbaus von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) als Nachweis von Apoptose. PARP fungiert als DNA-Reparaturenzym. Apoptotische Zellen zeigen eine Spaltung (engl. cleavage) von PARP (116 kDa) durch Caspasen in zwei Fragmente (89 kDa und 24 kDa Einheit). Diese Spaltung kennzeichnet einen irreversiblen Punkt des abgelaufenden Zelltods. Ziel war der Nachweis der 89 kDa Einheit bei behandelten Zellen und das Ausbleiben dieser Einheit bei Kontrollzellen. Diese Konstellation charakterisert ein Apoptose-induzierendes Ereignis. Daher wurde ein polyklonaler Primärantikörper gegen PARP (Cell signaling, Danvers, Massachussetts, Antikörper # 9542) verwendet, der sowohl das ursprüngliche Protein, als auch gespaltenes PARP bindet. Der Antikörper wurde 1:1000 verdünnt und über Nacht inkubiert. Zur Detektion wurde ein Anti-Rabbit-Sekundärantikörper (1:5000) benutzt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (Verdünnung 1:10000, Inkubationszeit 1 h bei Raumtemperatur). Dieses ubiquitär vorkommende Enzym der Glykolyse hat eine Größe von ca. 36 kDa. Als Sekundärantikörper gegen GAPDH wurde ein Anti-Mouse-Antikörper (Verdünnung 1:5000) benutzt.

2.6.3.5. Chemolumineszenzdetektion

Der Sekundärantikörper wurde mit Hilfe des Pierce[©]ECL-Detektions-Kits (Thermo, Rockford, USA) sichtbar gemacht. Hierbei führt das im Kit befindliche Luminol zur Oxidation der Meerrettichperoxidase an den Sekundärantikörpern. Diese Reaktion bewirkt eine Lichtemission, welche zur Schwärzung eines Röntgenfilms (Amersham HyperfilmTM ECL, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) führt und so detektiert werden kann. Die Röntgenfilme wurden nach Entwicklung eingescannt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxizitätsanalyse

Um die zytotoxische Potenz von PHA-739358 analysieren zu können, wurde wie unter 2.4 beschrieben ein MTT-Assay durchgeführt. Ziel ist die Ermittlung der IC_{50} -Werte für eine 48 h-Behandlung. Bei der IC_{50} handelt es sich um die Konzentration des Medikamentes, bei der 50% der Zellen noch leben und metabolisch aktiv sind. Besonderes Interesse galt dabei einem Vergleich der Cisplatin-sensiblen und Cisplatin-resistenten Zelllinien miteinander.

Zelllinie	IC $_{50}$ von PHA in μM
2102EP	0,21 (+/-0,12)
2102EP-R	0,21 (+/-0,11)
NTERA2	0,1 (+/-0,08)
NTERA2-R	0,09 (+/-0,01)
NCCIT	0,21 (+/-0,08)
NCCIT-R	0,18 (+/-0,02)

Tab. 1: Übersicht IC $_{50}$ -Werte nach 48h PHA-Behandlung, ermittelt durch MTT.

3.1.1 2102EP und 2102EP-R







Abb.9 Dosis-Effekt-Kurve für 2102EP-R, IC $_{50}$ = 0,21 μ M für 48h-Behandlung mit PHA-739358

Die Zelllinien 2102EP und /-R reagieren beide sensibel auf die Behandlung mit PHA. Im Vergleich ist der Anstieg der Cisplatin-resistenten Zelllinie minimal steiler als bei der sensiblen Entität. IC₅₀-Werte von 0,17 und 0,21 µM deuten auf keinen deutlichen Unterschied hin (p=0,98). Ein Plateau wird bei der sensiblen Zelllinie ab ca. 0,75 µM erreicht, bei der resistenten Zelllinie deutet sich eine Plateauentwicklung ab ca. 0,6 µM an, wird in diesem Diagramm jedoch nicht vollständig erreicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien können auch auf Schwankungen innerhalb der Messmethode zurückzuführen sein. Vor allem bei den Messungen an der resistenten Linie 2102EP-R deutet die große Standardabweichung von 0,11 auf Schwankungen innerhalb der Messmethode hin.

3.1.2 NTERA2 und NTERA 2-R



Abb.10 Dosis-Effekt-Kurve für NTERA2 , IC $_{50}$ = 0,1 μ M für 48h-Behandlung mit PHA-739358



Abb.11 Dosis-Effekt-Kurve für NTERA2-R, IC 50 = 0,09 µM für 48h-Behandlung mit PHA-739358

Die Zelllinien NTERA2 und/-R reagieren von allen Zelllinien am sensibelsten auf die Behandlung mit

PHA-739358. Die Graphen im direkten Vergleich miteinander zeigen einen sehr ähnlichen

Verlauf. Ähnliche IC₅₀-Werte von 0,1 und 0,09 μ M bestätigen dies. Eine statistische Signifikanz zeichnet sich nicht ab (p=0,91). Eine Plateauentwicklung ist bei NTERA-2 ab 0,5 und bei NTERA-2-R ab 0,6 μ M auszumachen. Insgesamt scheint es keinen Unterschied

zwischen sensitiven und resistenten Zellen zu geben. Die Standardabweichung der Messungen an der Cisplatin-sensiblen Zelllinie NTERA-2 ist mit 0,08 relativ groß.



3.1.3 NCCIT und NCCIT-R

Abb.11 Dosis-Effekt-Kurve für NCCIT, IC 50 = 0,21 µM für 48h-Behandlung mit PHA-739358



Abb.12 Dosis-Effekt-Kurve für NCCIT-R, IC 50 = 0,18 µM für 48h-Behandlung mit PHA-739358

Die Zelllinien NCCIT und /-R reagieren beide sensibel auf die Behandlung mit PHA. Verglichen mit der Cisplatin-sensiblen Zelllinie ist der Anstieg der resistenten Zelllinie wieder etwas steiler. Ähnliche IC_{50} -Werte von 0,21 und 0,18 μ M deuten auf keinen deutlichen

Unterschied hin (p=0,61). Ein Plateau wird bei der sensiblen Zelllinie ab ca. 1,0 µM erreicht, bei der resistenten Zelllinie deutet sich eine Plateauentwicklung ab ca. 1,25 µM an, wird in diesem Diagramm jedoch nicht vollständig erreicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien können wieder auf Schwankungen innerhalb der Messmethode zurückzuführen sein. Vor allem bei den Messungen an der resistenten Linie NCCIT-R deutet die große Standardabweichung von 0,08 auf Fehlerquellen innerhalb des Versuchs hin.

3.2 Proliferationsassays

3.2.1 Monotherapie mit PHA-739358

Beim Proliferationsassay wurde das Wachstumsverhalten der verschiedenen sensiblen und resistenten Zelllinien unter Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen der Substanz PHA-739358 (0,025 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,2 μ M; 0,4 μ M; 0,8 μ M) über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Behandlungsbeginn untersucht.



3.2.1.1 2102EP

Abb. 13 Proliferation der Zelllinie 2102EP unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrollen des entsprechenden Tages. *Unterschied statistisch signifikant

Die Zelllinie 2102EP reagiert dosis- und zeitabhängig sensibel auf die Behandlung mit PHA-739358. Ab einer Konzentration von 0,05 µM kommt es nach 24 und 48 Stunden Behandlung zu einer hochsignifikanten (p< 0,01 24h; p< 0,01 48h) Proliferationshemmung. Die errechnete IC₅₀ nach 24h Behandlung betrug 0,07 μ M, nach 48h Behandlung mit PHA-739358 0,05 μ M.



3.2.1.2 2102EP- R

Abb. 14 Proliferation der Zelllinie 2102EP- R unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages. * Unterschied statistisch signifikant

Die Cisplatin-resistente Zelllinie 2102EP-R reagiert auf die Behandlung mit PHA-739358 zeit- und dosisabhängig. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit einer Konzentration von 0,025 und 0,05 μ M zeigen sich signifikante (p=0,034, 24h; p=0,031, 48 h), ab 0,05 μ M (p<0,01) hochsignifikante Proliferationsveränderungen. Die IC₅₀ nach 24 Stunden liegt bei ca. 0,07 μ M. Nach einer 48-stündigen Behandlung resultiert ab einer Konzentration von 0,025 μ M eine hochsignifikante Proliferationshemmung (p<0,01). Die IC₅₀ für 48h liegt unter 0,025 μ M (ca. 0,022 μ M). Im Gegensatz zum MTT-Assay reagieren die Cisplatin-resistenten Zellen im Proliferationsversuch nach 48-stündiger Behandlung sensibler auf PHA als die Cisplatin-sensiblen Zellen.



Abb. 15 Proliferation NTERA2 unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages. * Unterschied statistisch signifikant

Die Zelllinie NTERA2 zeigt auf die Behandlung mit PHA-739358 ein zeit- und dosisabhängiges Ansprechen. Durch eine 24-stündigen Behandlung konnten bei insgesamt relativ großen Standardabweichungen ab einer Konzentration von 0,1 μ M hochsignifikante Proliferationshemmungen erzielt werden (p<0,01). Die IC₅₀ liegt hier bei 0,08 μ M. Nach einer 48-stündigen Behandlung ergeben sich ab einer PHA-739358 Konzentration von 0,025 μ M signifikante (p=0,012), ab 0,05 μ M (p<0,01) hochsignifikante Proliferationsveränderungen. Die IC₅₀ liegt hier bei 0,04 μ M.



Abb. 16 Proliferation NTERA2- R unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages. * Unterschied statistisch signifikant

Die Zelllinie NTERA2-R zeigt auf die Behandlung mit PHA-739358 ein zeit- und dosisabhängiges Ansprechen. Durch eine 24-stündigen Behandlung konnten bei der Konzentration 0,025 μ M eine signifikante Proliferationshemmung erzielt werden (p = 0,023). Bei den anderen Konzentrationen zeigte die Hemmung sogar einen hochsignifikanten Rückgang, p<0,01). Die IC₅₀ nach 24-stündiger Inkubation betrug 0,03 μ M. Nach einer 48-stündigen Behandlung ergaben sich ab einer PHA-739358 Konzentration von 0,05 μ M (p<0,01) hochsignifikante Proliferationsveränderungen. Die IC₅₀ liegt hier bei 0,03 μ M.



Abb. 17 Proliferation NCCIT unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages. * Unterschied statistisch signifikant

Die Zelllinie NCCIT reagiert dosisabhängig sensibel auf die Behandlung mit PHA-739358. In den höheren Konzentrationen zeichnet sich auch eine zeitabhängige Komponente ab. Ab einer Konzentration von 0,1 μ M kommt es nach 24 Stunden Behandlung zu einer hochsignifikanten (p<0,01) Proliferationshemmung. Nach 48 Stunden Behandlung zeigt sich bei der Konzentration von 0,05 μ M eine signifikante (p=0,015), ab 0,1 bis 0,8 μ M eine hochsignifikante Proliferationshemmung (p<0,01). Die IC₅₀ nach 24h betrug 0,08 μ M, nach einer 48h-Behandlung mit PHA-739358 0,07 μ M.



Abb. 18 Proliferation NCCIT- R unter ansteigenden PHA-Konzentrationen. Darstellung in Prozent der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages. * Unterschied statistisch signifikant

Die Zelllinie NCCIT-R reagiert dosisabhängig sensibel auf die Behandlung mit PHA-739358. Ein zeitabhängiger Rückgang der Proliferation zeigt sich erst bei höheren Konzentrationen. Durch eine Behandlung mit allen Konzentrationen kommt es nach 24 Stunden Behandlung zu einer signifikanten (p<0,05) Proliferationshemmung. Ab 0,2 μ M zeigt sich nach 24 Stunden ein hochsignifikanter Rückgang der Proliferation. Nach 48 Stunden Behandlung kommt es ab 0,05 μ M zu einer hochsignifikanten Proliferationshemmung (p<0,01). Die IC₅₀ nach 24h Behandlung betrug ca. 0,075 μ M, nach 48h Behandlung 0,07 μ M.

3.2.2 Kombinationstherapie

Der unter 2.6.2 beschriebene Kombinationsassay diente der Analyse der Proliferation unter PHA-739358- und Cisplatin-Monotherapie sowie deren Kombination nach 48 Stunden Behandlung. Hierbei stand die Frage im Mittelpunkt, ob durch die Kombination synergistische Effekte zu beobachten sind. Dies würde die Schlussfolgerung zulassen, dass PHA die Zellen für die Cisplatinbehandlung sensibilisiert. Gleichzeitig wird die Frage aufgeworfen, ob dies auch für die resistenten Linien zutrifft und sich somit ein besonders effektiver Behandlungsansatz für Tumoren mit Cispaltinresistenz abzeichnet. Daher wurde dieser Assay mit sensiblen und resistenten Zellen durchgeführt. Da die resistenten Zellen

eine Restsensibilität gegenüber Cisplatin besitzen, also durchaus noch auf eine Behandlung reagieren (allerdings erst bei einer erhöhten IC_{50} im Vergleich zu den sensiblen Zellen), sollten eventuell vorhandene synergistische Effekte auch hier gezeigt werden. Um die Potenz der Kombinationsbehandlung zu klären, mussten die jeweiligen Einzelsubstanzen in Monotherapie als Vergleich angewandt werden. Durch diesen Vergleich lässt sich beurteilen, ob die gezeigten Effekte auf ein einzelnes Medikament oder eine gemeinsame Wirkung zurückzuführen sind. Daher wurden alle Zelllinien 48 Stunden mit der IC_{10} , IC_{25} und IC_{50} der sensiblen Zellen für Cisplatin und mit verschieden Konzentrationen (ebenfalls in etwa der IC_{10} , IC_{25} und IC_{50}) von PHA-739358 behandelt.

3.2.2.1 2102EP



Abb.19 Proliferation 2102EP, 48 h nach PHA-Behandlung mit 0,025 μ M, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen, und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung der Zelllinie 2102EP zeigt nach 48 h Behandlung mit der niedrigsten Konzentration von PHA bereits eine hochsignifikanten Reduktion der Proliferation auf 80% (p=0,008) (violett). Da diese Zelllinie auch auf Cisplatin sensibel reagiert, lässt sich ein hochsignifikanter, dosisabhängiger Rückgang des Wachstums beobachten (p<0,01) (dunkelblau). Durch die Kombination von 0,025 μ M PHA mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin lässt sich kein zusätzlicher (signifikant besserer) Effekt erzielen (hellblau).



Abb. 20 Proliferation 2102EP, 48 h nach PHA-Behandlung mit 0,05 μ M, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, *Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung mit 0,05 μ M PHA zeigt nach 48 h Behandlung ebenfalls einen hochsignifikanten Rückgang der Proliferation auf 56% (p<0.1). Durch die Kombination von 0,05 μ M PHA mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin lässt sich auch hier kein zusätzlicher Nutzen erkennen. Der beobachtete Rückgang der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ist durch die Wirkung der jeweiligen Einzelsubstanz zu erklären. Es liegt somit kein Synergismus vor.



Abb.21 Proliferation 2102EP, 48 h nach Behandlung mit 0,1 µM PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 µM, c

10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC_{10} , IC_{25} und IC_{50} der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung mit 0,1 µM PHA zeigt nach 48 h Behandlung einen hochsignifikanten Rückgang der Proliferation auf 39% (p<0.1). Durch die Kombination von 0,1 µM PHA mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin lässt sich auch hier kein zusätzlicher Nutzen erkennen. Der beobachtete Rückgang der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ist durch alleinige PHA-Effekte zu erklären.

3.2.2.2 2102EP-R



Abb.22 Proliferation 2102EP-R, 48 h nach Behandlung mit 0,025 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch die Behandlung von 2102EP-R mit 0,025 μ M PHA (violett) ist bereits eine signifikante (p=0.015) Wachstumshemmung (ca. 59%) im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Auch die Cisplatinbehandlung (dunkelblau) zeigt gewisse Effekte in allen drei Konzentrationen (p<0.05), die jedoch erwartungsgemäß geringer sind als bei 2102EP. Behandlung mit Cisplatin als Monosubstanz mit der IC₅₀ der sensiblen Zellen erzielt eine ca. 50% ige Reduktion der Zellzahl in den sensiblen, aber nur eine ca. 20% ige Reduktion in den resistenten Zellen. Außerdem unterscheiden sich die Auswirkungen der drei Cisplatindosen kaum und zeigen einen Plateaueffekt bei diesen Konzentrationen (81%, 82%, 78% der Kontrolle). Die Kombination der Substanzen zeigt keine nennenswerte zusätzliche Zellzahlreduktion im Vergleich zur PHA-Kontrolle (hellblau). Die Effekte sind auf eine alleinige PHA- Wirkung zurückzuführen.



Abb.23 Proliferation 2102EP-R, 48 h nach Behandlung mit 0,05 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, *Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch die Behandlung von 2102EP-R mit 0,05 µM PHA (violett) ist bereits eine hochsignifikante (p<0,01) Wachstumshemmung (ca. 39%) im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Die Effekte bei der Kombinationsbehandlung sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.



Abb.24 Proliferation 2102EP-R, 48 h nach Behandlung mit 0,1 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch die Behandlung von 2102 EP-R mit 0,1 µM PHA (violett) konnte eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung (ca. 29%) im Vergleich zur Kontrolle bewirkt werden. Die Effekte bei der Kombinationsbehandlung sind jedoch auf eine alleinige PHA- Wirkung zurückzuführen.

Diese Versuche bestätigen für die Zelllinien 2102EP/-R, wie bereits in den Proliferationsassays für die Monotherapie gezeigt, dosisabhängige Effekte einer Behandlung mit PHA-739358. Eine nennenswerte zusätzliche Zellzahlreduktion konnte durch die Kombinationstherapie der Substanz mit Cisplatin bei beiden Linien nicht erreicht werden.

NTERA2 vorbehandelt mit 0,025 μM PHA 358 120 Zellzahl in % zur Kontrolle * * 100 p 0.025 80 Ι 60 c10 40 ■ c 25 20 c 50 0 P0.025c20 P0.025c25 P0.025-50 p 0.025 c 10 P0.025 ⁵⁰ 50 ్రస ■ p 0.025 c 25 p 0.025 c 50 PHA 358 in μ M/ Cisplatin IC₁₀, IC₂₅, IC₅₀

3.2.2.3 NTERA2

Abb.25 Proliferation NTERA2, 48 h nach Behandlung mit 0,025 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NTERA2 mit 0,025 μ M PHA (violett) bewirkt eine signifikante Wachstumshemmung (p = 0,049) im Vergleich zur Kontrolle. Die Cisplatinbehandlung (dunkelblau) zeigt in der niedrigsten Konzentration keine signifikanten Effekte. Dies wird erst ab einer Behandlung mit der IC₂₅ und IC₅₀ erreicht (p<0.05 und p<0.01). Die Kombinationstherapie von PHA 0,025 μ M und Cisplatin bewirkt keine signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Monotherapie (hellblau).



Abb.26 Proliferation NTERA2, 48 h nach Behandlung mit 0,05 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NTERA2 mit 0,05 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationstherapie von PHA 0,05 μ M und Cisplatin bewirkt auch hier keine signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Monotherapie (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.



Abb.27 Proliferation NTERA2, 48 h nach Behandlung mit 0,1 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin

Die Behandlung von NTERA2 mit 0,1 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationstherapie von PHA 0,1 μ M und Cisplatin bewirkt auch hier keine signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Monotherapie (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.

3.2.2.4 NTERA2-R



Abb.28 Proliferation NTERA2-R, 48 h nach Behandlung mit 0,025 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination , * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NTERA2-R mit 0,025 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Cisplatinbehandlung (dunkelblau) werden bei dieser resistenten Zelllinie nur durch die IC₅₀ signifikante Effekte erreicht (p=0.04), die jedoch erwartungsgemäß deutlich geringer sind als bei der sensiblen Zelllinie NTERA2. Behandlung mit Cistlatin als Monosubstanz mit der IC50 der sensiblen Zellen erzielt eine ca. 40% Reduktion der Zellzahl in den sensiblen, aber nur eine ca. 20% Reduktion in den resistenten Zellen. Die Kombinationstherapie von PHA 0,025 μ M und Cisplatin bewirkt keine weitere signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Monotherapie (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.



Abb.29 Proliferation NTERA2-R, 48 h nach Behandlung mit 0,05 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NTERA2-R mit 0,05 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationstherapie von PHA 0,05 μ M und Cisplatin bewirkt auch hier keine signifikante Zellzahlreduktion (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.



Abb.30 Proliferation NTERA2-R, 48 h nach Behandlung mit 0,1 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NTERA2-R mit 0,1 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationstherapie von PHA 0,05 μ M und Cisplatin bewirkt keine signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Monotherapie (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.

Diese Versuche bestätigen für die Zelllinien NTERA2 /-R dosisabhängige Effekte einer Behandlung mit PHA-739358. Eine signifikante zusätzliche Zellzahlreduktion konnte durch die Kombinationstherapie der Substanz mit Cisplatin allerdings bei keiner der Linien erreicht werden.



3.2.2.5 NCCIT

Abb.31 Proliferation NCCIT, 48 h nach Behandlung mit 0,025 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch eine Behandlung der Zelllinie NCCIT nach 48 h Behandlung mit der niedrigsten Konzentration konnte keine signifikante Zellzahlreduktion erreicht werden (violett). Die Behandlung mit Cisplatin bewirkt signifikante, dosisabhängige Abnahmen des Wachstums (dunkelblau). Durch die Kombination von 0,025 µM PHA mit Cisplatin konnte kein zusätzlicher signifikanter Effekt erzielt werden (hellblau). Die Effekte sind auf die Behandlung mit Cisplatin zurückzuführen.



Abb.32 Proliferation NCCIT, 48 h nach Behandlung mit 0,05 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch eine Behandlung der Zelllinie NCCIT nach 48 h Behandlung mit 0,05 μ M PHA konnte eine hochsignifikante Zellzahlreduktion (p<0.01) erreicht werden (violett). Die Behandlung mit Cisplatin bewirkt ebenfalls hochsignifikante (p<0.01), dosisabhängige Abnahmen des Wachstums (dunkelblau). Einzig durch die Kombination von 0,05 μ M PHA mit der IC₅₀ von Cisplatin lässt sich eine weitere signifikante Zellzahlreduktion (p<0.05) erzielen (hellblau).



Abb.33 Proliferation NCCIT, 48 h nach Behandlung mit 0,1 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, *Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 μ M, c

10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC_{10} , IC_{25} und IC_{50} der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Durch eine Behandlung der Zelllinie NCCIT nach 48 h Behandlung mit 0,1 μ M PHA konnte eine hochsignifikante Zellzahlreduktion (p<0.01) erreicht werden (violett). Die Behandlung mit Cisplatin bewirkt ebenfalls eine hochsignifikante (p<0.01), dosisabhängige Wachstumsreduktion (dunkelblau). Durch die Kombination von 0.1 μ M PHA mit ansteigenden Konzentrationen von Cisplatin lässt keine weiteren signifikanten Effekte erzielen (hellblau). Die hier erreichten Effekte sind auf eine reine PHA-Wirkung zurückzuführen.



3.2.2.6 NCCIT-R

Abb.34 Proliferation NCCI-R, 48 h nach Behandlung mit 0,025 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.025 entspricht PHA 0,025 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NCCIT-R mit 0,025 μ M PHA (violett) bewirkt keine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Cisplatinbehandlung (dunkelblau) zeigt in der niedrigsten Konzentration keine signifikanten Effekte. Dies wird erst ab einer Behandlung mit der IC₂₅ erreicht. Im Vergleich zu den sensitiven Zellen sind die Effekte von Cispaltin geringer. Behandlung mit als Monosubstanz mit der IC₅₀ erzielt in sensiblen Zellen eine ca. 50% Reduktion der Zellzahl, und eine ca. 40% Reduktion in den resistenten Zellen. In niedrigeren Konzentrationsstufen (z.B. IC₁₀) ist der Unterschied ausgeprägter. Die Kombinationstherapie von PHA 0,025 μ M mit Cisplatin bewirkt keine weitere signifikante Zellzahlreduktion (p>0.05) (hellblau). Die Effekte sind auf die Behandlung mit Cisplatin zurückzuführen.



Abb.35 Proliferation NCCIT-R, 48 h nach Behandlung mit 0.05 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.05 entspricht PHA 0,05 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NCCIT-R mit 0,05 μ M PHA (violett) bewirkt eine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Cisplatinbehandlung (dunkelblau) zeigt in der niedrigsten Konzentration keine signifikanten Effekte. Dies wird erst ab einer Behandlung mit der IC₂₅ erreicht. Im Vergleich zu den sensiblen Zellen sind die Effekte aber deutlich geringer. Die Kombinationstherapien von PHA 0,05 mit der IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ von Cisplatin bewirken keine signifikante Zellzahlreduktion (p<0.05) (hellblau) im Vergleich zur PHA-Kontrolle.



Abb. 36 Proliferation NCCIT-R, 48 h nach Behandlung mit 0,1 μ M PHA, Cisplatin in ansteigenden Konzentrationen und jeweils der angegebenen Kombination, * Signifikanz, Kombinationsbehandlung sind nur dann mit * markiert, wenn im Vergleich zu beiden Monotherapien ein signifikanter Unterschied zu sehen war. (p 0.1 entspricht PHA 0,1 μ M, c 10, c 25 und c 50 entsprechen den errechneten IC₁₀, IC₂₅ und IC₅₀ der sensiblen Zellen für Cisplatin)

Die Behandlung von NCCIT-R mit 0,1 μ M PHA (violett) bewirkt eine hochsignifikante (p<0.01) Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationstherapie von PHA 0,1 μ M und Cisplatin bewirkt keine weitere signifikante Zellzahlreduktion (hellblau). Die Zellzahlreduktion ist auf die alleinige PHA-Wirkung zurückzuführen.

3.3 Analyse des DNA-Gehaltes mit PI-Färbung

3.3.1 2102EP und 2102EP-R

3.3.1.1 Behandlung der Zelllinie 2102EP für 24h



Abb.37 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie 2102EP.

Die Kontrolle zeigt zwei Gipfel ("peaks") in der Messung. Der erste stellt Zellen dar, deren DNA-Gehalt zweifach vorhanden ist (2n) Der DNA-Gehalt ist folglich diploid, d.h. der DNA-gehalt ist nicht repliziert (G0/G1). Der zweite kleinere Peak repräsentiert Zellen mit tetraploidem DNA-Gehalt (4n), d.h. Zellen, die sich nach der S-Phase vor der Zellteilung (G2/M) befinden. Das Plateau zwischen den peaks repräsentiert Zellen, die in der S-Phase sind. Aufgrund der logarithmischen Darstellung ist diese Population schwer zu beurteilen. Die logarithmische Einstellung wurde gewählt, um im Verlauf der Behandlung mit PHA-739358 polyploide Zellen (8n, 16n...), die durch eine sog. Endoredublikation entstanden sind, zu veranschaulichen. Beim Einsatz von Danusertib kommt es zur Polyploidisierung des DNA-Gehaltes, da bei ungehemmter Mitoseaktivität die Zytokinese, d.h. die Zellteilung nicht korrekt vollzogen wird. Dies wird durch das Auftreten weiterer peaks (s.u.) repräsentiert.

Durch die Behandlung mit 0,025 µM PHA ändert sich die relative Höhe der beiden peaks zueinander. Der Anteil der Zellen mit 2n wird kleiner, der mit 4n nimmt zu. Ab einer Konzentration von 0,05 µM manifestiert sich ein dritter peak als Zeichen einer Endoredublikation. Es handelt sich um Zellen mit achtfachem DNA-Gehalt (8n). Auch hier verliert der 2n-Peak weiter an Höhe. Ab einer Konzentration von 0,1µM nimmt der 8n-Peak weiter an Größe zu, die zwei ersten verschwinden beinahe gänzlich. Dies bedeutet, dass fast alle Zellen über einen polyploiden DNA-Satz verfügen. Der Anteil toter Zellen (M1) im sogenannten prä-G0/G1-Bereich nimmt mit steigender PHA-Konzentration zu.



3.3.1.2 Behandlung der Zelllinie 2102EP für 48 h

Abb.38 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 48 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, und 0,1 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie 2102EP. Es wurden 80.000 Zellen pro Messung gezählt.

Wie oben zeigt die Kontrolle zwei peaks. Der erste stellt wiederum diploide Zellen (2n) dar (G0/G1). Der zweite peak repräsentiert Zellen mit tetraploidem DNA-Gehalt (4n), nach der S-Phase kurz vor der Zellteilung (G2/M). Auch hier ist die S-Phase aufgrund der logarithmischen Einstellung nicht sicher zu beurteilen. Durch die Behandlung mit 0,025 μ M PHA ändert sich die relative Höhe des ersten Peaks im Sinne eines G2/M-Arrests. Der Anteil der diploiden Zellen nimmt ab. Ab einer 48-stündigen Behandlung mit 0,05 μ M manifestiert sich ein dritter peak mit polyploiden Zellen (8n). Die zwei anderen peaks nehmen ab, der Anteil toter Zellen (M1) nimmt zu (auf 7,5%). Bei einer Konzentration von 0,1 μ M werden die

zwei ersten peaks nochmals kleiner, der 8n-peak bleibt nachweisbar und es erscheint ein neuer peak, der 16n-Zellen repräsentiert. Ab 0,4 und 0,8 µM nimmt der Anteil toter Zellen weiter zu.



3.3.1.3 Behandlung der Zelllinie 2102EP-R für 24 h

Abb.39 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie 2102 EP-R

Die Kontrolle zeigt ebenfalls zwei peaks (2n und 4n). Durch die Behandlung mit 0,025 μ M PHA manifestiert sich bereits ein dritter peak, der Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt (8n) repräsentiert, als Zeichen für Endoredublikation. Dies entspricht den Ergebnissen der Proliferationsassays, in denen ebenfalls schon geringe PHA-Konzentrationen gute Effekte zeigen. Der Anteil der diploiden und tetraploiden Zellen nimmt hingegen ab. Bei einer Behandlung mit 0,05 und 0,1 μ M setzt sich diese Tendenz fort, der 8n-Peak bleibt dabei dominant. Ab 0,4 und 0,8 μ M nimmt der Anteil toter Zellen stark zu. Die Messung der 48-

stündig behandelten Zellen war aufgrund der starken Einschränkung der Vitalität der Zellen durch die Behandlung nicht mehr möglich.

3.3.2 NTERA 2 und NTERA 2-R

3.3.2.1 Behandlung der Zelllinie NTERA 2 für 24h



Abb.40 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NTERA 2

Die Kontrolle für die 24-stündige Behandlung lässt auch hier zwei peaks erkennen (2n und 4n), (entsprechend G0/G1 und G2/M). Ab einer Behandlung mit 0,025 μ M PHA gewinnt der G2/M-Peak an Deutlichkeit und stellt den größten Ausschlag dar. Durch eine Behandlung mit 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 μ M manifestiert sich ein dritter peak, der Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt (8n) als Zeichen einer Endoredublikation repräsentiert, während der 2n peak stetig kleiner wird und schließlich nicht mehr zu sehen ist. Der Anteil toter Zellen steigt an (M1). Insgesamt dominieren Zellen im G2/M-Stadium als Zeichen eines G2/M-Arrests.


Abb. 41 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 48 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NTERA 2

Die Messung der Kontrollzellen zeigt zwei peaks, die diploide (2n) (G0/G1) und tetraploide Zellen (4n) (G2/M) repräsentieren. Nach einer 24stündigen Behandlung mit 0,025 μ M PHA lässt sich eine Größenverschiebung der Ausschläge zugunsten der G2/M-Zellen beobachten. Unter einer Behandlung mit 0,05 und 0,1 μ M manifestieren sich ein dritter und vierter peak, die jeweils Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt als Ergebnis einer Endoredublikation (8n und 16n) repräsentieren. Bei höheren Konzentrationen (0,4 und 0,8 μ M) sind die 2n- und 4n-peaks nicht mehr vorhanden.



Abb.42 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NTERA 2-R

Die Kontrolle zeigt zwei peaks (2n) (G0/G1) und (4n) (G2/M). Die S-Phase ist aufgrund der logarithmischen Einstellung nicht sicher zu beurteilen. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit 0,025 μ M PHA, ist der G0/G1-Peak (2n) bereits nicht mehr zu sehen. Die Zellen befinden sich im G2/M-Stadium, außerdem zeichnet sich ein weiterer peak ab aus Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt (8n). Auch die Behandlung mit 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 μ M bewirkt eine Endoredublikation, repräsentiert durch das Erscheinen eines dritten und vierten peaks aus Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt (8n + 16n). Ab einer Behandlung mit 0,1 μ M sind der erste und der zweite peak (2n + 4n) nicht mehr nachzuweisen.



Abb.43 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 48 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NTERA 2-R. Um die Endoredublikation deutlich zu zeigen, wurde die mit 0,05 µM PHA behandelte Probe erneut gemessen, indem statt 20.000 50.000 Zellen (events counted) gezählt wurden. Hier ist die Größe de der Peaks nicht mit der Kontrollmessung vergleichbar.

Die Kontrollmessung verzeichnet zwei peaks (2n) (G0/G1) und (4n) (G2/M). Nach einer 48stündigen Behandlung mit 0,025 μ M PHA lässt sich kein Hinweis auf eine Zunahme des DNA-Gehaltes erkennen. Die Behandlung ab 0.05 μ M bewirkt eine Endoredublikation, repräsentiert durch das Erscheinen weiterer Ausschläge aus Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt (8n, 16n und 32n). Bei einer Behandlung mit 0,1, 0,4 und 0,8 μ M sind die ersten peaks (2n und 4n) ist nicht mehr nachweisbar.

3.3.2 NCCIT und NCCIT-R

3.3.2.1 Behandlung der Zelllinie NCCIT für 24h



Abb. 44 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NCCIT

Die Kontrolle zeigt zwei peaks. Der erste stellt diploide Zellen (2n) dar (G0/G1). Der zweite peak repräsentiert Zellen mit tetraploidem DNA-Gehalt(4n) nach der S-Phase kurz vor der Zellteilung (G2/M). Eine 24-stündige Behandlung mit 0,025 μ M PHA verändert am DNA-Gehalt der Zellen nichts. Ab einer Behandlung mit 0,05 μ M werden beide Ausschläge kleiner und ein dritter peak von Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt manifestiert sich (8n.) Bei 0,1, 0,4 und 0,8 μ M setzt sich diese Tendenz weiter fort. Der 4n-peak nimmt an Größe zu, der 2n-peak nimmt konsekutiv ab. Dies entspricht einem G2/M-Arrest.



Abb.45 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 48 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NCCIT

Die Kontrolle zeigt zwei Peaks. Der erste repräsentiert Zellen mit diploidem DNA-Gehalt (2n)(G0/G1), der zweite mit tetraploiden DNA-Gehalt (4n), nach der S-Phase kurz vor der Zellteilung (G2/M). Eine 48stündige Behandlung mit 0.025 µM PHA ändert am DNA-Gehalt der Zellen nichts. Ab einer Behandlung mit 0.05 µM wird der erst Ausschlag deutlich kleiner, der zweite größer. Es befinden sich also mehr Zellen in der G2/M-Phase. Durch eine 0.1 µM-Behandlung nehmen die 2n und 4n-Peaks weiter an Höhe ab, außerdem lassen sich ein dritter und vierter Peak aus polyploiden Zellen als Zeichen einer Endoredublikation erkennen (8n und 16n). Dies wird bei 0.4 und 0.8 µM noch deutlicher. Der erste Peak verschwindet, der zweite ist sehr klein. Bei den drei Peaks handelt es sich um Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt 8n und 16n.



Abb.46 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NCCIT-R

Die Messung der Kontrollzellen zeigt zwei Ausschläge erkennen (2n und 4n). Bereits eine 24-stündige Behandlung mit 0,025 µM PHA verändert den DNA-Gehalt der Zellen. Es zeigt sich ein 8n-Peak, während der 2n Peak nicht mehr zu sehen ist, als Anzeichen einer Endoredublikation. Dies setzt sich nach Behandlung mit höheren Konzentrationen weiter fort.



Abb.47 Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse mittels Propidium-Iodid- (PI-) Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit PHA-739358 in den Konzentrationen 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 µM versus Kontrolle bei der Zelllinie NCCIT-R

Die Kontrolle für die 48stündige Behandlung lässt auch hier zwei Peaks erkennen (2n und 4n), (G0/G1 und G2/M). Nach einer 48stündigen Behandlung mit 0,05 μ M PHA zeigt sich ein 8n-Peak, während der 2n Peak nicht mehr zu sehen ist. Ab einer Behandlung mit 0,1 μ M erscheint ein weiterer Peak aus polyploiden Zellen (16 n) als Zeichen einer Endoredublikation. Auch bei höheren Konzentrationen (0,4 und 0,8 μ M) zeigen sich Ausschläge, die polyploide Zellen repräsentieren (4n, 8n, 16n).

3.4 Western Blotting (Immunoblots)

3.4.1 Induktion von Apoptose mittels Nachweis einer Spaltung von PARP (PARP Cleavage)

3.4.1.1 2102EP und 2102EP-R



Abb. 48: 2102EP und 2102EP-R: 48h Negativkontrolle und behandelt mit PHA-739358 IC ₅₀, darunter GAPDH-Ladungskontrolle; rechts nach weiteren 48 h ohne Medikament und Negativkontrolle und GAPDH-Kontrolle darunter.



3.4.1.2 NTERA2 und NTERA2-R

Abb. 49: NTERA2 und NTERA2-R: 48h Negativkontrolle und behandelt mit PHA-739358 IC ₅₀, darunter GAPDH-Ladungskontrolle; rechts nach weiteren 48 h ohne Medikament und Negativkontrolle und GAPDH-Kontrolle darunter.

3.4.1.3 NCCIT und NCCIT-R



Abb. 50: NCCIT und NCCIT-R: 48h Negativkontrolle und behandelt mit PHA-739358 IC 50, darunter GAPDH-Ladungskontrolle; rechts nach weiteren 48 h ohne Medikament und Negativkontrolle und GAPDH-Kontrolle darunter.

Bei allen Zelllinien konnte die Spaltung von PARP als Nachweis einer klassischen Apoptoseinduktion nach einer 48stündigen Behandlung mit PHA-739358 gezeigt werden. Die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP (116 kDa) in zwei Fragmente (89 kDa und 24 kDa Einheit), kennzeichnet einen irreversiblen Punkt des geplanten Zelltodes. Dieser Effekt hält bei allen Zelllinien nach 48-stündiger Vorbehandlung auch noch 48 Stunden nach Wegnahme der Substanz an. Bei NTERA2 und NCCIT-R tritt der gewünschte Effekt nach 48 Stunden Inkubation ohne Medikament sogar besonders deutlich hervor. Die Beobachtung, dass auch bei den Kontrollzellen in einigen Fällen nach 48 h Inkubationszeit ebenfalls eine diskrete 89kDa Bande zu verzeichnen war, ist dem spontanen Auftreten von Apoptose bei den Zellen zuzuschreiben. Insgesamt befanden sich die Zellen am Ende des Versuchs kontinuierlich sechs Tage in Kultur, da ein Splitten und Umsetzen der Zellen aufgrund des adhärenten Wachstumsverhaltens eine größere Beeinträchtigung des Versuchs dargestellt hätte.

4 Diskussion

Testikuläre Keimzelltumore sind einige der wenigen Krebserkrankungen, die auch im metastasierten Stadium noch kuriert werden können. Sie leiten sich von entwicklungs- und differenzierungsgestörten frühen Urkeimzellen ab. Häufig zeichnen sich die Tumorzellen durch die Eigenschaft der Pluripotenz aus, die es ihnen ermöglicht, weiter zu differenzieren. Dadurch kann eine große Bandbreite unterschiedlicher Gewebetypen entstehen. Diese Tumoren stehen somit an der Schnittstelle zwischen Embryo- und Tumorigenese. KZT gelten als sehr empfindlich für eine Cisplatin-basierte Chemotherapie. Diese Eigenschaft ergibt sich durch den erhaltenen embryonalen Charakter ihrer Vorläuferzellen, den primordialen Keimzellen und die damit verbundene erhöhte Apoptosebereitschaft. (Boublikova, Buchler et al. 2014) Seminome reagieren auch auf eine Strahlentherapie sensitiv. Beide Sensitivitäten sind unter anderem Ausdruck der Teilungsfreudigkeit, der Pluripotenz und einer besonders niedrigen Apoptoseschwelle dieser Zellen. Die Einführung von Cisplatin hat das Therapieregime für KZT revolutioniert. Seit Ende der 70iger Jahre des vorigen Jahrhunderts stellt Cisplatin die Basis der Kombinationschemotherapie dar, in der synergistische Effekte von drei Substanzen (Cislatin, Etoposid und Bleomycin) genutzt werden. Es werden Heilungsraten von über 80% bei metastasierten Tumoren erreicht. Dies ist bei anderen Tumorentitäten bisher unerreicht. Leider wird dieser Erfolg durch zwei Probleme limitiert. Dazu zählen das vereinzelt letale Nebenwirkungsprofil der Kombinationstherapie und insbesondere die Resistenzentwicklung. Bei 10-30% der Patienten mit metastasiertem Keimzelltumor verhindert ein unzureichendes Ansprechen des Tumors oder ein Rezidiv die Heilung. (Mayer, Honecker et al. 2003) Für die verschiedenen Resistenzmechanismen können sowohl erworbene als auch intrinsische Resistenzen verantwortlich sein (siehe 1.2.3 und 1.2.4). Der intrinsischen Resistenz von Teratomen gegenüber Chemotherapie liegt wohlmöglich die Fähigkeit zum Zellzyklusarrest im G1/S-Phase und die Initiierung von DNA-Reparatursystemen zugrunde. Dieser Zellzyklusarrest wird vermutlich durch eine gesteigerte Expression der Proteine p21 und pRB vermittelt. Außerdem weisen Teratomzellen ein hohes Bcl-2-Expressionslevel auf, was mit einer Chemotherapieresistenz assoziiert wird. (Boublikova, Buchler, 2014) In Laboruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Cisplatinwirkung eine Abhängigkeit vom Zellzyklus aufweist. Cisplatin-behandelte Zellen reagierten mit einem Arrest im G2/M-Stadium, in dem die Schadenserkennung, die Initiierung und auch die Ausführung der Apoptose stattfanden. (Mueller, Schittenhelm et al. 2006) Ein Durchlaufen der G1/S-Phase war nicht erforderlich, zudem reagierten die Zellen in G2/M empfindlicher auf die Behandlung. Aufgrund dieser Erkenntnisse, stellt sich die Frage, ob durch Substanzen, die einen G2/M-Arrest provozieren, die Wirkung von Cisplatin potenziert werden kann. Diese Frage bildete neben der Erfassung der Aktivität des Aurorakinseinhibitors Danusertib (PHA-

739358) als Monosubstanz die Grundlage dieser Arbeit. So galt es zu erforschen, ob durch eine Behandlung mit Danusertib ein G2/M-Arrest erreicht und dieser in Kombination mit Cisplatin zur Sensibilisierung der Zellen genutzt werden kann. Diese Hypothese wiederum basierte auf der bekannten Rolle der Aurorakinasen beim Progress des Zellzyklus und der Mitose. So unterstützen Aurorakinasen die Bildung des bipolaren Spindelapparates, die Zentrosomverdopplung, die Ausrichtung und Separation der Chromosomen und die Zytokinese und sind darüber hinaus Teil der Spindelkontrollpunkte. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Blockade der Kinasen Einfluss auf den Zellzyklus genommen werden kann. Da Aurorakinasen vor allem von proliferierenden Zellen exprimiert werden, kann man sich diese Eigenschaft bei der Antitumortherapie zunutze machen. Durch den Einsatz der Aurorakinasen wird chromosomale Instabilität in Form von Polyploidie provoziert. Dabei unterscheiden sich die Kinasen A, B und C in Lokalisation, Zeitpunkt ihrer höchsten Expression, ihren Substraten und daher in ihren Funktionen. (siehe 1.3.2). Eine Blockade der Aurorakinasen wird normalerweise von Zellen nicht gut toleriert. Danusertib hemmt alle drei Aurorakinasen. In der Literatur sind jedoch, abhängig von der Blockade der entsprechenden Kinasen, unterschiedliche Effekte beschrieben worden. Bei Blockade von Aurora-A resultiert ein verspäteter Mitoseeintritt. Des Weiteren treten Fehler bei der Separation der Zentrosome auf, die zu unipolaren Spindelapparaten führen, sowie Defizite bei der Zytokinese. Es resultiert Polyploidie und ein G2/M-Arrest. Die betroffene Zelle muss zwei Zellzyklus-Kontrollpunkte durchlaufen, den Spindel-Kontrollpunkt, sowie den postmitotischen-(G1)-Kontrollpunkt. Je nach Schwere des Schadens aktiviert die Zelle die Apoptoseinduktion, oder aber es schließt sich ein weiterer Zellzyklus an, wodurch der DNA-Gehalt abermals vervielfacht wird. Einer Blockade von Aurorakinase-B folgen Elimination des mitotischen Kontrollpunktes, fehlerhafte Verbindungen zwischen Mikrotubuli und Kinetochoren, inkorrekte Orientierungen der Chromosomen und eine inkomplette Zytokinese. Dies führt wieder zur Polyploidie, die durch den fehlenden Kontrollpunkt jedoch nicht in Apoptoseinduktion mündet, so dass die Zellen trotz fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Verbindung in die Mitose eintreten. (Carvajal, Tse et al. 2006)

Durch die Rolle der Aurorakinasen beim Progress des Zellzyklus und der Mitose werden diese Enzyme vor allem von proliferierenden Zellen exprimiert, die sich in der Teilungsphase befinden. Die Expression der Aurorakinase A erreicht in der Prometaphase den Höchstwert, die der Aurorakinase B später in der Mitose in der Meta- bis Telophase. Je teilungsaktiver eine Zelle ist, desto mehr Aurorakinasen werden gebildet. In den meisten adulten Geweben ist das Expressionsniveau der Aurorakinasen durch die niedrige Proliferationsrate dieser Zellen sehr niedrig oder fehlt. (Bischoff, Anderon et al. 1998; Goldenson, Crispino 2014) KZT, wie andere Tumorentitäten auch, gelten als sehr teilungsaktiv. Verschiedene Arbeiten haben vor diesem Hintergrund die Genexpressionslevel von Aurorakinasen in KZT und

Vorstufen untersucht. Da Aurorakinasen die Chromosomenaufteilung und die Zytokinese regulieren, ist es nicht verwunderlich, dass eine Änderung der Expressionslevel dieser Kinasen mit der malignen Transformation von Zellen assoziiert ist. (Baldini et. al 2010) Dass dies auch für KZT zutreffend ist, zeigten Chieffi et al. bereits 2004 anhand einer erhöhten Exprimierung der Aurorakinase B in Semiomen. (Chieffi et al. 2004) 2010 wurden erhöhte Expressionslevel der drei Aurorakinasen A, B und C in Seminomzellen durch Baldini et al. nachgewiesen. (Baldini et al. 2010) Burum-Auensen et al. fanden im selben Jahr erhöhte Level der Aurorakinase A in TKZT-Zellen und sowie in deren Vorstufen den Cis-Zellen. (Burum-Auensen et al. 2010) Diese Entdeckungen geben Anlass, die Aurorakinasen als Ziel einer Antitumortherapie von KZT zu benennen und zu erforschen.

Die Wirkung des Aurorakinaseinhibitors Danusertib (PHA-739358) wurde in dieser Arbeit an drei verschiedenen Nichtseminom-Zelllinien analysiert und mit der Wirksamkeit in drei resistenten Sublinien verglichen. Da die Zelllinie NCCIT ein mutiertes p53 aufweist, bot sich die Möglichkeit, einen Vergleich der Wirksamkeit des Medikamentes in Abhängigkeit des p53-Status der Zelllinien zu ziehen. Ziel war es weiterhin zu eruieren, ob die Behandlung mit PHA-739358 einen G2/M-Arrest provoziert und in Kombination mit Cisplatin additive oder synergistische Effekte erzeugt werden können.

Zunächst wurde die Zytotoxizität der Danusertib-Monotherapie in verschiedenen Konzentrationsstufen an allen sechs Zelllinien mittels MTT untersucht. Hierbei zeigte sich bei allen Zelllinien eine dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität. Es konnten die verschiedenen IC₅₀-Werte für die einzelnen Zelllinien eruiert werden. Die Konzentration der Substanz, die eine 50% ige Reduktion der Zellviabilität hervorruft, lag zwischen 90 und 210 nM (0.09 - 0.21 µM). Die Unterschiede zwischen Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellen erwiesen sich hierbei als relativ gering (2102EP und /-R: 0.21 und 0.21 µM; NTERA-2 und /-R: 0.1 und 0.09 µM; NCCIT und /-R: 0.21 und 0.18 µM). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung des Aurorakinaseinhibitors durch die Resistenzentstehung gegenüber Cisplatin nicht beeinflusst wird, d.h. dass keine Kreuzresistenzen zwischen beiden Substanzen in vitro bestehen. Dies impliziert weiter, dass die effektive Beeinträchtigung der Zellviabilität von nichtseminomatösen Zelllinien durch PHA-739358 durch einen anderen Mechanismus verursacht wird, als durch Cisplatin. Die Schwankungen der Messung sind wahrscheinlich auf Limitationen der eingesetzten Messmethode zurückzuführen. Beim MTT-Assay wird ein Farbstoff durch vitale Zellen mittels mitochondrialer Enzyme reduziert, der anschließend durch die photometrische Messung eines ELISA-Readers beurteilt wird. Der Test setzt sich aus vielen Einzelschritten zusammen und stellt hohe Ansprüche an die technische Durchführung. Zu bemängeln ist weiterhin, dass der Test die mitochondriale Aktivität misst, die mit der Viabilität der Zellen gleichgesetzt wird. Vitale Zellen, die eine verminderte

Enzymaktivität aufweisen, werden nicht spezifisch erfasst und könnten das Ergebnis verfälschen. Daher wurden zusätzlich zu den MTT-Untersuchungen auch Proliferationsassays (Zellzählungsversuche) durchgeführt, um das Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien unter PHA-Behandlung zu charakterisieren. Dies hat zudem den Vorteil, dass die Zellen auch im zeitlichen Verlauf beurteilt werden können, der Zustand der kultivierten Zellen am Mikroskop beurteilbar ist. Die Proliferationsassays, die über 24 und 48 Stunden durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls einen dosisabhängigen und zeitabhängigen signifikanten Rückgang der Proliferation. Insgesamt reagierten alle Zelllinien in diesen Versuchen empfindlicher auf die Behandlung als im MTT-Assay. Die Konzentrationen, die nach 48 Stunden Behandlung eine 50% ige Reduktion der Zellvitalität hervorruft, lagen bei diesem Assay zwischen 22 und 70 nM (0.022 - 0.07 µM). Im Einzelfall wurden folgende Ergebnisse erzielt: IC₅₀ in µM: 2102EP: 24h: 0.07, 48h: 0.05; 2102EP-R: 24h:0.07, 48h: 0.022; NTERA-2: 24h: 0.08, 48h: 0.04; NTERA2-R: 24h: 0.03, 48h: 0.03; NCCIT: 24h: 0.08, 48h: 0.07; NCCIT-R: 24h: 0.075, 48h: 0.07. Die Cisplatin-resistenten Linien zeigten auch in diesem Assay keine Kreuzresistenz gegen PHA, vielmehr weisen sie eine gleich hohe oder sogar leicht erhöhte Sensibilität gegenüber der Substanz als die Cisplatin-sensitiven parentalen Zellen auf. Besonders die Zelllinie 2102EP-R reagierte im Vergleich zu 2102EP und den anderen Zelllinien nach 48 Stunden Behandlung besonders sensitiv. Die Zelllinien NCCIT und NCCIT-R benötigen hingegen die höchsten IC₅₀-Werte und scheinen am wenigsten zeitabhängig zu reagieren. Die spiegelt sich in einem sehr trägen Abfall der IC₅₀ nach weiteren 24 Stunden wider. Diese Tendenz hat sich auch in den MTT-Assays angedeutet. Da diese Zelllinie ein mutiertes p53 aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass hier ein noch weiter zu charakterisierender Zusammenhang bestehen könnte. Wie oben beschrieben, existieren nach Cisplatinanwendung p53-abhängige und -unabhängige Wege, um den Zelltod einzuleiten. So könnten auch nach PHA-Behandlung die Zelllinien NCCIT und /-R im Gegensatz zu den anderen Zelllinien Apoptose über einen p53-unabhängigen Weg, z.B. über MAP-Kinasen einleiten. In der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) wurden anschließend die Effekte auf den Zellzyklus und den DNA-Gehalt dargestellt. Bei allen Zelllinien zeigten sich entweder Veränderungen im Sinne eines G2/M-Arrests, bei der sich ein großer 4n-Peak darstellte, oder Anzeichen für eine Endoredublikation (mit einem DNA-Gehalt > 4n). In Einzelfällen konnten polyploide Zellen bis 32n aufgezeigt werden. Die Zellzyklusprofile ergaben Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Ein Zusammenhang zum p53-Status ist dabei aber nicht zu erkennen. Bei allen Zelllinien konnten Zeichen einer Endoredublikation im Sinne einer Polyploidisierung > 4n schon nach 24 Stunden Behandlung nachgewiesen werden. Bei den resistenten Zelllinien NTERA2-R, 2102EP-R und NCCIT-R konnte bereits nach 24 Stunden ab einer Konzentration von 0.025 µM eine Endoredublikation nachgewiesen werden. Eine 48 Stunden Behandlung verminderte

die Vitalität der besonders sensitiv reagierenden 2102EP-R-Zellen enorm (siehe Zellzählung), so dass eine durchflußzytometrische Messung nicht mehr möglich war. Der Anteil toter Zellen war zu groß. Ein G2/M-Arrest konnte nur nach 24 Stunden Behandlung bei den Zelllinien NCCIT und NTERA2 nachgewiesen werden, der nach 48 Stunden nicht mehr zu sehen war. Dennoch waren auch dort einige polyploide Zellen als 8n-peak erkennbar. Die Zelllinien 2102EP und 2102EP-R, sowie NTERA2-R und NCCIT-R zeigten Zeichen einer Endoredublikation, jedoch keinen G2/M-Arrest. Es kann vermutet werden, dass die Aurorakinaseinhibitoren den Zellzyklus nicht auf Dauer hemmen. Dies ist gut am Beispiel von NTERA2 und NCCIT zu beobachten. Nach 24 Stunden Behandlung gehen die Zellen in einen G2/M-Arrest. Nach weiteren 24 Stunden durchlaufen die Zellen eine weitere Mitose ohne Kernteilung, so dass sie ihr erneut Genom verdoppeln und polyploid werden. Alternativ sterben sie, wahrscheinlich durch Initiierung des programmierten Zelltod, im sog. Pseudo-G1-Stadium, wenn die Konzentration der Substanz zu hoch und die Auswirkungen zu stark werden. Dies bezeichnet man auch als mitotische Katastrophe. Um diese Vermutung zu stützen und die Wirkung des Aurorakinaseinhibitors weiter zu charkaterisieren, sollte der qualitative Nachweis einer Apoptoseinduktion erbracht werden. Es folgten daher Western-Blots zum Nachweis der PARP-Cleavage. Durch Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP (Poly-(Adenosindiphosphat-ribose)-Polymerase) durch Caspasen wird die DNA-Reparatur unterbunden. (Takahashi, Alnemri et al. 1996) Bei allen Zelllinien konnte dies nach 48 Stunden PHA-Behandlung mit der IC₅₀ gezeigt werden. Das Erscheinen einer Proteinbande bei 89 kDa, die durch proteolytischem Abbau der ursprünglichen 116 kDa -Einheit entstanden ist, stellt einen Nachweis für Apoptoseinduktion dar. Lediglich bei NCCIT-R erscheint die Bande bei 89 kDa nur schwach. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation ohne Medikament verdeutlicht sich aber auch bei dieser Zelllinie der gewünscht Effekt. Dies bedeutet, dass die Auswirkungen von PHA, zumindest in diesem Zeitraum, nicht reversibel waren. Tatsächlich treten bei den Zelllinien NCCIT-R und NTERA2 nach 48 h Inkubationspause die Banden im Verhältnis zur Kontrolle noch stärker hervor. Dies impliziert, dass der induzierte Schaden von PHA bei einigen Zellen der Kultur nicht direkt, sondern erst nach weiterer Inkubation und somit protrahiert Apoptose auslöst. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass letztlich die Behandlung mit PHA abhängig von Dosis und Zeit nach Durchlaufen mehrerer Pseudo-G1-Stadien bei nichtseminomatösen Keimzelltumorzellen immer zu einem kontrollierten Zelltod führt.

Schließlich sollte durch eine Kombinationsbehandlung von PHA-739358 und Cisplatin die Frage nach einem möglichen additiven oder gar synergistischen Effekt der Einzelsubstanzen beantwortet werden. Hier ließen sich bei keiner Zelllinie durchgehend signifikante Effekte durch eine Kombination erzielen. Beide Einzelsubstanzen zeigten eine sehr effektive zellzahlreduzierende Wirkung. Die Cisplatin-resistenten Zellen reagierten auf Cisplatin

entsprechend weniger. Die erzielten Effekte bei der Kombinationsbehandlung sind auf die Wirkung einer Substanz, meist PHA-739358 alleine, zurückzuführen. Durch eine hochpotente PHA-Einzelwirkung wurden bereits effektive Zellzahlreduktionen erreicht. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine Dominanz der PHA-induzierten Endoredublikation dar, mit Folge einer mitotischen Katastrophe und Apoptoseinduktion, anstelle eines G2/M-Arrests. Aus diesem Grund ergab sich vermutlich keine potenzierende Wirkung von PHA-739358 hinsichtlich der Zellzyklusabhängigkeit des Cisplatins vom G2/M-Stadium. Die polyploiden Zellen befanden sich nach einer 48stündigen Behandlung nicht im Arrest sondern durchliefen Pseudo-G1-Stadien, wie die Zellzyklusanalyse ergeben hat. Der Nachweis einer PARP-Cleavage in allen Zelllinien als Apoptosenachweis nach PHA-Behandlung bekräftigt diese Theorie. Daher könnte für weiterführende Versuche eine Abwandlung des Versuchsaufbaus der Kombinationsassays hilfreich sein. Möglicherweise würde durch eine kürzere Kombinationsbehandlung, z.B. eine 24-stündige Inkubation, signifikante Effekte erzielt werden. Grundlage dieser Überlegung stellen die Ergebnisse der FACS-Analyse dar, hier konnten nach 24 Stunden G2/M-Arreste bei NCCIT und NTERA2 beobachtet werden. Des Weiteren wäre anstelle der Simultanbehandlung eine PHA-Vorbehandlung mit erst daran anschließender Cisplatinzugabe denkbar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Cisplatin gilt als Therapiestandard bei der Behandlung von Keimzelltumoren. Seit den 70iger Jahren des vorigen Jahrhunderts wird es im Rahmen einer Kombinationschemotherapie angewandt. Die dadurch erreichten signifikanten Heilungsraten von bis zu 80% im metastasierten Stadium werden leider durch Resistenzentwicklungen gegen Cisplatin beeinträchtigt. Die Charakterisierung des Wirkmechanismus von Cisplatin bereitet die Basis für weiterführende Studien mit dem Ziel, diese Resistenzmechanismen zu eliminieren oder zu durchbrechen. Da eine Abhängigkeit der Wirksamkeit von Cisplatin vom G2/M-Stadium des Zellzyklus nachgewiesen ist, findet sich hier ein möglicher Ansatzpunkt der Wirkungsteigerung durch Sustanzen, die eine entsprechende Akkumulation im Zellzyklus bewirken können. Aurorakinaseinhibitoren, wie Danusertib, wird diese Eigenschaft nachgesagt, da Aurorakinasen eine bedeutende Rolle für den Progress des Zellzyklus und der Steuerung der Mitose spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Wirkung des Aurakinaseinhibitors Danusertib auf das Proliferationsverhalten, die Zellzyklusprogression und die Zytotoxizität bei nichtseminomatösen Keimzelltumorlinien. Insbesondere sollte der Unterschied zwischen Cisplatin-sensiblen und -resistenten, sowie zwischen p53-mutierten und p53-profizienten Zelllinien herausgearbeitet werden. Schließlich sollte die Wirkung einer Kombinationstherapie der Substanzen Cisplatin und PHA-739358 untersucht werden. Zusammenfassend führte diese Arbeit zu folgenden Erkenntnissen:

- > PHA-739358 entfaltet gute antiproliferative Effekte auf nichtseminomatöse Zelllinien.
- > Diese Effekte sind unabhängig vom Resistenzstatus gegenüber Cisplatin.
- Die Wirkung von PHA-739358 zeigt keine eindeutige Abhängigkeit vom p53-Status der Zelllinien.
- PHA-739358 führt bei allen getesteten Zellinien zur Vermehrung des DNA-Gehaltes durch Endoredublikation.
- > PHA-739358 führt bei allen Zelllinien zur Induktion klassischer Apoptose.
- Durch Kombination von Cisplatin und PHA-739358 kann keine signifikant höhere Wirksamkeit erzielt werden.

Trotz des Versagens von PHA-739358 als Kombinationspartner von Cisplatin könnte Danusertib eine bedeutende Rolle bei der Behandlung von nichtseminomatösen KZT zuteil werden. Da es in präklinischen Untersuchungen gute antiproliferative Effekte sowohl auf Cispaltin-sensible als auch auf -resistente Zelllinien zeigt, sollte die Wirkung von PHA- 739358 z.B. in Mausmodellen mit sogenannten Xenograft-Tumoren untersucht werden. So kann seine Effektivität bei Cisplatinresistenz bei Keimzelltumoren weiter evaluiert und möglicherweise eine neue Therapieoption für diese Situation entwickelt werden. In klinischen Studien wurde die Wirkung von Danusertib auf KZT bisher nicht untersucht. Mit dem Ziel, einen verlässlichen und stabilen Wirkspiegel zu erreichen, sollten die pharmakokinetischen Eigenschaften, z.B. die Unterschiede der Transportproteine und des Metabolismus von Danusertib, genauer untersucht werden. Das gezeigte Nebenwirkungsprofil könnte so verbessert und die Wirksamkeit der Behandlung maximiert werden. Welchen Stellenwert der Wirkstoff damit zukünftig bei der Behandlung von KZT einnehmen könnte, sollten klinische Studien mit Patienten mit therapierefraktären KZT zeigen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	
ABC	engl: "ATP-binding cassette superfamily of transporters"	
AFP	α-Fetoprotein	
AKI	Aurorakinaseinhibitor	
AKT	Proteinkinase B	
ALL	Akute lymphatische Leukämie	
APAF-1	engl: "apoptotic protease activating factor 1"	
Bax	Protein der bcl-2 Familie, Kofaktor für Tumorsuppressorprotein p53, induziert Apoptose	
BCRA1	engl: "breast cancer associated antigen"	
Behandlg.	Behandlung	
ß-HCG	beta-Untereinheit des humanen Choriogonadotropin	
BCL-2	engl: "B-cell lymphoma 2"	
BubR1	engl: "mitotic checkpoint serine/threonin protein kinase Bub1beta"), Spindel-Kontrollpunkt-Protein	
CIS	carcinoma in situ	
c-Abl	engl: "cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1", physiologische Tyrosinkinase	
CENP-A	engl: "centromeric protein A"	
c-KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor	
CLiPs	engl: "chromatid linking proteins"	
CML	Chronische myeloische Leukämie	
CPC	engl: "chromosomal passenger complex"	
CRPC	engl: "castration-resistant prostate cancer"	
CS	clinical stage	
СТ	Computertomographie	
стс	engl: "common toxicity criteria" nach der NCI-CTCAE (Version 3.0)	
d	Tag	

DD	engl: "death domain"		
DISC	engl: "death-inducing signaling complex"		
DMSO	Dimethylsulfid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
Eg5	Kinesin-Spindel-Protein 5 (auch Kinesin 5), Motorprotein, wichtig für Zellteilung		
FACS	engl: "fluorescence-activated cell sorting"		
FADD	engl: "fas-associated protein with death domain"		
FGFR 1	engl: "fibroblast growth factor receptor"		
G	Guanin		
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase		
G-CSF	engl: "granulocyte-colony stimulating factor"		
GM-CSF	engl: "granulocyte macrophage-colony stimulating factor"		
Gy	gray		
h	Stunde		
HDCT	Hochdosischemotherapie		
HMGB1/2	engl: "high-mobility-group-box" 1 und 2 -Protein		
hUBF	engl: "human RNA polymerse I transcription upstream binding factor", Transkriptionsfaktor		
IC ₅₀	engl: "inhibitory concentration 50", Konzentration, die zu einer 50%igen Proliferationshemmung führt		
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group		
INCENP	engl: "inner centromer protein"		
kDa	Kilo-Dalton		
KDCT	konventionell dosierte Chemotherapie		
KZT	Keimzelltumor		
Lats2	engl: "large tumor suppressor homolog 2", Serin/Threonin- Proteinkinase		
LDH	Laktatdehydrogenase		
LK	Lymphknoten		
Mad 2	engl: "mitotic arrest deficient 2", Spindel-Kontrollpunkt-Protein		

МАРК	engl: "mitogen activated protein kinase"		
MCAK	engl: "mitotic centromer-associated kinesin"		
min	Minuten		
MMR	engl: "miss match repair"		
MRT	Magnetresonanztomographie		
МТТ	3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid		
NCI-CTCAE	engl: "National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events"		
NER	engl: "nucleotid excision repair"		
NF-ĸB	engl: "nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B- cells", Transkriptionsfaktor		
NS	Nichtseminom		
OCT 3/4	engl: "octamer-binding transcription factor 3/4"		
p21	auch CDK-Inhibitor 1 (engl: "cyclin dependant kinase-inhibitor 1")		
p53; p73	Tumorsuppressorgen 53 bzw. 73		
PARP	engl: "poly-(adenosindiphosphat-ribose)-polymerase"		
PE	Kombination aus Cisplatin und Etoposid		
PEB	Kombination aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin		
PEI	Kombination aus Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid		
PBS	engl: "phosphate buffered saline"		
PGC	engl: "primordial germ cell"		
PI	engl: "propidium iodine"		
PLAP	Plazentare alkalische Phosphatase		
pRm+	partielle Remission mit positiven Tumormarkern		
pRm-	partielle Remission mit negativen Tumormarkern		
PVB	Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin		
RAD 21	Gen und Protein, involviert in Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen		
RB	Retinoblastom-Protein		
RET	Protoonkogen-Tyrosinkinaserezeptor		

RF	Risikofaktor		
RLA	retroperitoneale Lymphadenektomie		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl: "rotations per minute")		
RTR	Residualtumorresektion		
S	Seminom		
S	Sekunden		
sog.	sogenannt		
Tab.	Tabelle		
ТАСС	engl: "transformic acid coiled coil protein"		
ТВР	engl: "TATA binding protein", Transkriptionsfaktor		
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie		
ТКZТ	testikulärer Keimzelltumor		
TP53	Tumorsuppressorprotein 53		
TP73	Tumorsuppressorprotein 73		
Trk-A	engl: "neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1"		
u.a.	unter anderem		
UICC	Union internationale contre le cancer		
ÜR	Überlebensrate		
XIAP	engl: "x-linked inhibitor of apoptosis protein"		
z.B.	zum Beispiel		

7 Literaturverzeichnis

- Aihara, A., S. Tanaka, et al. (2010). "The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma." J Hepatol. 52 (1): 63-71. doi: 10.1016/j.jhep.2009.10.013. Epub 2009 Oct 29
- Albers, P., R. Siener, et al. (2003). "Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial." J Clin Oncol 21(8): 1505-12.
- Andrews, P. D. (2005). "Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon?" Oncogene 24(32): 5005-15.
- Baldini, E., Y. Arlot-Bonnemains, (2010). "Deregulation of Aurora kinase gene expression in humantesticular germ cell tumors" Andrologia 42 (4): 260-267.
- Benten, D., G. Keller, et al. (2009). "Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model." Neoplasia 11(9): 934-44.
- Biermann, K., F. Goke, et al. (2007). "c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma." J Pathol 213(3): 311-318.
- Bischoff J.R., L. Anderson et al. (1998). "A homologue of Drosphila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." EMBO J (17): 3052-3065.
- Bokemeyer, C., C. R. Nichols, et al. (2002). "Extragonadal germ cell tumors of the mediastinum and retroperitoneum: results from an international analysis." J Clin Oncol 20(7): 1864-73.
- Bokemeyer, C., N. Schleucher, et al. (2003). "First-line sequential high-dose VIP chemotherapy with autologous transplantation for patients with primary mediastinal nonseminomatous germ cell tumours: a prospective trial." Br J Cancer 89(1): 29-35.
- Boublikova, L., T. Buchler, et al. (2013) "Molecular biology of tesicular germ cell tumors: Unique features awaiting clinical application." Critcal Reviews in Oncology/Haematology 89(2014) 366-385.
- Burum-Auensen, E., R. I. Skotheim, et al., (2010). "Spindle proteins differentially expressed in the various histological subtypes of testicular germ cell tumors." Journal of Carcinogenesis 1 (1): 1-9.
- Bosl, G. J. and R. J. Motzer (1997). "Testicular germ-cell cancer." N Engl J Med 337(4): 242-53.
- Brown LM, LM Pottern, et al. (1986), "Testicular cancer in the United States: Trends in incidence and mortality. Int J Epidemiol 15: 164-170.
- Cantwell, B. M., P. G. Richardson, et al. (1991). "Gynaecomastia and extragonadal symptoms leading to diagnosis delay of germ cell tumours in young men." Postgrad Med J 67(789): 675-7.
- Carmena, M. and W. C. Earnshaw (2003). "The cellular geography of aurora kinases." Nat Rev Mol Cell Biol 4(11): 842-54.
- Carpinelli, P., R. Ceruti, et al. (2007). "PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer." Mol Cancer Ther 6(12 Pt 1): 3158-68.
- Carvajal, R. D., A. Tse, et al. (2006). "Aurora kinases: new targets for cancer therapy." Clin Cancer Res 12(23): 6869-75.
- Cervantes, A., E. Elez et al. (2012). "Phase I Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Study of MLN8237, an Investigational, Oral, Selective Aurora A Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors" Clin Cancer Res 18: 4764-4774.
- Cepeda, V., M. A. Fuertes, et al. (2007). "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity." Anticancer Agents Med Chem 7(1): 3-18.
- Chapple, A. and A. McPherson (2004). "The decision to have a prosthesis: A qualitative study of men with testicular cancer." Psychooncology 13(9): 654-664.

- Chen, H. L., C. J. Tang, et al. (2005). "Overexpression of an Aurora-C kinase-deficient mutant disrupts the Aurora-B/INCENP complex and induces polyploidy." J Biomed Sci 12(2): 297-310.
- Chieffi, P., G. Troncone, et al. (2004). "Aurora B expression in normal testis and seminomas." J Endocrinol 181(2):263-270.

Clark, A. T. (2007). "The stem cell identity of testicular cancer." Stem Cell Rev 3(1): 49-59.

- Cohen, R. B., S. F. Jones, et al. (2009). "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(21): 6694-701.
- Collins Dh, RC Pugh. (1964). "Classification and frequency of testicular tumours." Br J Urol 36 Suppl 1-11.
- Coupland, C. A., D. Forman, et al. (2004). "Maternal risk factors for testicular cancer: a population-based case-control study (UK)." Cancer Causes Control 15(3): 277-83.
- Crow, M. T., K. Mani, et al. (2004). "The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis." Circ Res 95(10): 957-70.
- Dees, E.C., R.B. Cohen, et al. (2012). "Phase I Study of Aurora A Kinase Inhibitor MLN8237 in Advanced Solid Tumors: Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Bioavailability of Two Oral Formulations" Clin Can Res 18: 4775-4784.
- Dees, E.C., J.R. Infante, et al. (2008). "Phase I study of MLN8054, a selective inhibitor of aurora A kinase." Eur J Cancer 6:12S (supp: abstr 281)
- Dieckmann, K. P. and U. Pichlmeier (2004). "Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors." World J Urol 22(1): 2-14.
- Eckert, W. A. and J. Kartenbeck (1997). Proteine : Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie : Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion. Berlin {[u.a.], Springer.
- Einhorn, L. H. (2002). "Curing metastatic testicular cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 99(7): 4592-5.
- Esposito, F., S. Libertini, et al. (2009). "Aurora B expression in post-puberal testicular germ cell tumours." J Cell Physiol 221(2): 435-439.
- Fossa, S. D., J. Chen, et al. (2005). "Risk of contralateral testicular cancer: a populationbased study of 29,515 U.S. men." J Natl Cancer Inst 97(14): 1056-1066.
- Fu, J., M. Bian, et al. (2007). "Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis." Mol Cancer Res 5(1): 1-10.
- Gautschi, O., J. Heighway, et al. (2008). "Aurora kinases as anticancer drug targets." Clin Cancer Res 14(6): 1639-48.
- Georgieva, I., D. Koychev, et al. (2010). "ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines." Neuroendocrinology 91(2): 121-130.
- Giannarini G., KP Dieckmann, et al. "Organ-sparing surgery for adult testicular tumours: a systematic review of the literature." Eur Urol 57: 780-790.
- Giwercman, A., J. Grindsted, et al. (1987). "Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study. J Urol 138: 1214-1216.
- Goldenson B., J.D. Crispino (2014). "The aurora kinases in cell cycle and leukemia." Oncogene advance online publication, 17 March 2014; doi:10.1038/onc.2014.14.
- Gontarewicz, A., S. Balabanov, et al. (2008). "Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I." Blood 111(8): 4355-64.
- Graw, J. (2006) "Genetik", Springer Verlag, 4. Auflage.
- Gray, H. and W. H. Lewis (1918). Anatomy of the human body. Philadelphia and New York,, Lea & Febiger.
- Hartmann, J. T., C. R. Nichols, et al. (2002). "Prognostic variables for response and outcome in patients with extragonadal germ-cell tumors." Ann Oncol 13(7): 1017-28.
- Hauf, S. and Y. Watanabe (2004). "Kinetochore orientation in mitosis and meiosis." Cell 119(3): 317-27.

Haughey, BP; S. Graham, et al. (1989). "The epidemiology of testicular cancer in upstate New York." Am J Epidemiol 130: 25-36.

Hautmann, R. and H. Huland (2006). "Urologie"; mit 176 Tabellen. Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.

- Heidenreich, A., C. Bokemeyer, et al. (2009). "[Stage-specific treatment for testicular germ cell tumours]." Urologe A 48(4): 377-85.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature 407(6805): 770-776.
- Hiddemann, W. and C. R. Bartram (2004). "Allgemeiner Teil : Epidemiologie, Pathogenese, Grundprinzipien der Therapie" ; mit 167 Tabellen. Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.
- Hilton, S. (2009). "Contemporary radiological imaging of testicular cancer." BJU Int 104(9 Pt B): 1339-1345.
- Hoei-Hansen, C. E., M. Holm, et al. (2003). "Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer." J Pathol 200(3): 370-374.
- Honecker, F., J. W. Oosterhuis, et al. (2004). "New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors." World J Urol 22(1): 15-24.
- Honecker, F., H. Wermann, et al. (2009) "Mikrosatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors" J Clin Oncol. 27(13): 2129-2136 doi: 10.1200/JCO.2008.18.8623. Epub 2009 Mar 16.
- Hou, X. M., X. H. Zhang, et al. (2009). "Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules." Nucleic Acids Res 37(5): 1400-10.
- Huddart, R. and V. Kataja (2008). "Testicular seminoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol 19 Suppl 2: ii49-51.
- International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG). (1997). "The International Germ CellConsensus Group: A prognostic factor based staging system for metastatic germ cell cancer." J Clin Oncol 15: 594-603.
- Jamieson, E. R. and S. J. Lippard (1999). "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts." Chem Rev 99(9): 2467-2498.
- Jiang, M. and Z. Dong (2008). "Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity." J Pharmacol Exp Ther 327(2): 300-307.
- Katayama, H., Sasai K., et al. (2004)."Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2mediated destabilisation and inhibition of p53." Nat Genet 36(1), 55-62.
- Keen, N. and S. Taylor (2004). "Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents." Nat Rev Cancer 4(12): 927-936.
- Kollareddy, M., P. Dzubak, et al. (2008). "Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 152(1): 27-33.
- Krege, S., J. Beyer, et al. (2008). "European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): part II." Eur Urol 53(3): 497-513.
- Lin, Z.-Z., H. Hey-Chi, et al (2009) "The Aurora kinase inhibitor VE-465 has anticancer effects
- in pre-clinical studies of human hepatocellular carcinoma." J Hepatol 50(3): 518-627. Lind, G. E., R. I. Skotheim, et al. (2007). "The epigenome of testicular germ cell tumors."

APMIS 115(10): 1147-1160.

- Lorch, A., C. Bascoul-Mollevi, et al. (2011) "Conventional-dose versus high-dose chemotherapy as first salvage treatment in male patients with metastaic germ cell tumors: evidence from a large international database." J Clin Oncol 29(16): 2178-2184. doi: 10.1200/JCO.2010.32.6678. Epub 2011 Mar 28.
- Matulonis U.A., S. Sharma et al. (2012) "Phase II study of MLN8237 (alisertib), an investigatinal Aurora A Kinase inhibitor, in patient with platinum-resistant or-refractory epithelial ovarian fallopian tube, or primary peritoneal tumor" Gynecol Oncol 127(1): 63-69.
- Mayer, F., F. Honecker, et al. (2003). "Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors." Ann Oncol 14(6): 825-832.

- Mayer, F., H. Stoop, et al. (2003). "Aneuploidy of human testicular germ cell tumors is associated with amplification of centrosomes" Oncogene 22 (25): 3859-3866.
- Meulenbeld,H. J.,R. H. Mathijssen, et al. (2012) "Danusertib, an aurora kinase inhibitor." Expert Opin Investigative Drugs 21(3): 383-393.
- Meulenbeld,H. J., J. P. Bleuse, et al. (2013). "Randomized phase II study of danusertib with metastatic castration-resistant prostate cancer after docetaxel failure" BJU Int 111 (1): 44-52.
- Mueller, S., M. Schittenhelm, et al. (2006). "Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro." Int J Oncol 29 (2): 471-479.
- Mueller, T., W. Voigt, et al. (2003). "Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer." Cancer Res 63(2): 513-521.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nat Rev Mol Cell Biol 2(1): 21-32.
- Oechsle, K., F. Honecker, et al (2011) "Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study." Annals of Oncology 22(12) 2654-2660.
- Olesen, I. A., S. B. Sonne, et al. (2007). "Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21(3): 462-478.
- Oosterhuis, J. W., H. Stoop, et al. (2007). "Why human extragonadal germ cell tumours occur in the midline of the body: old concepts, new perspectives." Int J Androl 30(4): 256-263; discussion 263-264.
- Parra, M. T., R. Gomez, et al. (2006). "A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain." PLoS Genet 2(6): e84.
- Peng, X., X. Zeng, et al. (2009). "The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review." PLoS One 4(5): e5591.
- Perez, R. P. (1998). "Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance." Eur J Cancer 34(10): 1535-1542.
- Port, M., S. Glaesener, et al. (2011). "Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines." Molecular Cancer 10: 52.
- Purves, W. K. (2004). "Life, the science of biology. Vol. 1. Cell and heredity" Sunderland, MA: Sinauer Associates; Gordonsville, VA: W.H. Freeman and Co. 7th ed.
- Rajpert-De Meyts, E. (2006). "Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects." Hum Reprod Update 12(3): 303-23.
- Richiardi, L., O. Akre, et al. (2004). "Fecundity and twinning rates as measures of fertility before diagnosis of germ-cell testicular cancer." J Natl Cancer Inst 96(2): 145-147.
- Rodriguez, E., J. Houldsworth, et al. (1993). "Molecular cytogenetic analysis of i(12p)negative human male germ cell tumors." Genes Chromosomes Cancer 8(4): 230-236.
- Rosen A., G. Jayram, et al. (2011), "Global trends in testicular cancer incidence and mortality." Eur Urol 60 (2): 374-379.
- Rübben, H. (2009). "Uroonkologie"; 5.,vollst. überarb. Aufl. Springer Berlin (Verlag). 978-3-642-01381-2 (ISBN)
- Rübben, H. (2014). "Uroonkologie"; 6. vollst. überarb. Aufl. Springer (Verlag) 978-3-642-35031-3 (ISBN)
- Schmoll, H. J. (2002). "Extragonadal germ cell tumors." Ann Oncol 13 Suppl 4: 265-272.
- Schweyer, S., A. Soruri, et al. (2004). "Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation." Br J Cancer 91(3): 589-598.
- Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." Oncogene 22(47): 7265-7279.
- Sökeland, J., H. Schulze, et al. (2004). "Urologie : verstehen lernen anwenden"; 46 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Soncini, C., P. Carpinelli, et al. (2006). "PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity." Clin Cancer Res 12(13): 4080-4089.

- Steeghs, N., F. A. Eskens, et al. (2009). "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the aurora kinase inhibitor danusertib in patients with advanced or metastatic solid tumors." J Clin Oncol 27(30): 5094-5101. doi: (HYPERLINK "http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10637-010-9405-7") Epub 2010 Feb 25.
- Steeghs, N., R. H. Mathijssen, et al. "Influence of pharmacogenetic variability on the pharmacokinetics and toxicity of the aurora kinase inhibitor danusertib." Invest New Drugs 29(5): 953-962
- Strohmeyer, T., P. Reissmann, et al. (1991). "Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 88(15): 6662-6666.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, et al. (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A 93(16): 8395-8400.
- Tang, D. and V. J. Kidd (1998). "Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis." J Biol Chem 273(44): 28549-28552.
- Todd, R. C. and S. J. Lippard (2009). "Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds." Metallomics 1(4): 280-291.
- Ulisse, S., Y. Arlot-Bonnemains, et al. (2010). "Inhibition of the aurora kinases suppresses in vitro NT2-D1 cell growth and tumorigenicity." J Endocrinol 204(2): 135-142.
- United Kingdom Testicular Cancer Study Group (1994). (1994). "Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise." BMJ 308 (6941): 1393-9.
- Vader, G., A. F. Maia, et al. (2008). "The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond." Cell Div 3: 10.
- Virtanen, H. E., R. Bjerknes, et al. (2007). "Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences." Acta Paediatr 96(5): 611-616.
- Vos, A., J. W. Oosterhuis, et al. (1990). "Cytogenetics of carcinoma in situ of the testis." Cancer Genet Cytogenet 46(1): 75-81.
- Wang, D. and S. J. Lippard (2005). "Cellular processing of platinum anticancer drugs." Nat Rev Drug Discov 4(4): 307-320.
- Winter, E.; S. Kliesch, et al. (2005) "Diagnostik des Hodentumors." Dtsch Ärztebl 102: A3021-A3025.
- Yuan, Z. M., H. Shioya, et al. (1999). "p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage." Nature 399(6738): 814-817.
- Zhou, H., Kuang J., et al (1998). "Tumour amplified kinase *STK15/BTAK* induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." Nat Genet 20 (2): 189–193.

8 Anhang

8.1 Tabellen

a. TNM-Klassifikation

TNM-Klassifikation für Testikuläre Keimzelltumoren				
(Modifiziert nach Sobin und Witterkind 2002)				
nT			Primärtumor	
pi	_	nTx	- kann nicht bewertet werden	
	_	pTX pT0	- Kein Nachweis eines Primärtumors	
	_	pTin	- Intratubuläre Keimzellneoplasie (TIN)	
	_	pT1	- Tumor ist auf Hoden/Nebenhoden begrenzt ohne	
		P	vaskuläre/lymphatische Invasion: Tumor darf Tunica albuginea	
			befallen, nicht iedoch Tunica vaginalis	
	-	pT2	- Tumor ist auf Hoden/Nebenhoden begrenzt mit	
		•	vaskulärer/lymphatischer Invasion, oder Tumor durchbricht	
			Tunica albuginea mit Befall der Tunica vaginalis	
	-	рТЗ	- Tumor befällt Samenstrang mit/ohne vaskuläre/lymphatische	
			Invasion	
	-	pT4	- Tumor befällt Hodensack (Scrotum) mit/ohne	
			vaskuläre/lymphatische Invasion	
			1	
Ν			Regionale Lymphknoten-klinisch	
	-	NX	- kann nicht bewertet werden	
	-	NU	- Kein Nachweis eines regionalen LK-Betalls	
	-	N1	- Befall eines Lymphknotens, der eine Große von 2 cm in der	
			groisten Ausdennung nicht überschreitet (<2cm), oder multipler	
			Lymphkholenberall, jedoch keiner großer als 2 cm (<2cm) in der	
		NO	Großlein Ausdernnung Refell eines Lymphknetens (2.5cm), oder multipler Refell (2.5cm)	
	-	INZ	- Lymphknotenmestastase, größer als 5cm (> 5cm)	
	_	N3		
рN			Regionale Lymphknoten-pathologisch	
	-	pNx	- regionaler LK kann nicht beurteilt werden	
	-	pN0	- Kein Nachweis eines regionalen LK-Befalls	
	-	pN1	- Befall von 1-5 Lymphknoten, deren Größe 2 cm in der größten	
		•	Ausdehnung nicht überschreitet (<2cm)	
	-	pN2	- Lymphknotenmetastasen, deren Größe 5 cm in der größten	
			Audehnung nicht überschreitet (<5cm), oder Nachweis	
			extragonadaler Ausbreitung	
	-	pN3	 Lymphknotenmetastase, größer als 5 cm (> 5 cm) 	
Μ			Distale Metastasen	
	-	рМх	- kann nicht bewertet werden	
	-	pM0	- kein Nachweis distaler Metastasen	
	-	рМ1	- distale Metastasen	
	-	pM1a	- nicht regionale LK, oder Lunge	
	-	מדואוק		
S			Serumtumormarker	
	-	Sx	- Kann nicht bewertet werden/nicht vorhanden	
	-	S0	- LDH (U/I), ß-HCG(mIU/mI), AFP (ng/mI) im Normalen	
	-	S1	- <1.5xN, <5000xN, <1000xN	

- S2 - S3	 1.5-10xN, 5000-50,000xN, 1000-10,000xN >10xN, >50,000xN, >10,000xN 		
Stadium IA: pT1 N0) M0 S0		
Stadium IB: pT2-4 N0 M0 S0			
Stadium IS: jedes p	o, N0 M0 S1-3	(Krege, Beyer et al. 2008)	

b. Lugano-Klassifikation

Lugano-Klassifikation für Testikuläre Keimzelltumoren					
Stadium I	 Primärtumor auf Hoden begrenzt Tumormarker nach Ochidektomie normal oder angemessen abfallend Bildgebung zeigt keine Metastasen 				
Stadium II A	- Retroperitoneale Metastasen < 2 cm				
Stadium II B	- Retroperitoneale Metastasen 2 - 5 cm				
Stadium II C	 Retroperitoneale Metastasen > 5 cm 				
Stadium III A	- Supraklaviculäre oder mediastinale Metastasen				
Stadium III B	- Lungenparenchymmetastasen:				
	Minimal: < 5 in jeder Lunge < 2 cm;				
	Fortgeschritten: > 5 in jeder Lunge > 2 cm				
Stadium III C	- Hämatogene Metastasen außerhalb der Lunge				
Ab Stadium II C wird zu	r Therapieplanung die IGCCCG-Klassifikation angewandt.				
	(Krege, Beyer et al. 2008)				

c. IGCCCG-KLassifikation

Г

 Hoden-/retroperitonealer Tumor und "good" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen Jede Primärlokalisation und jeder Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen Hoden-/retroperitonealer Tumor und "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
 keine (nichtpulmonalen) Metastasen Jede Primärlokalisation und jeder Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen Hoden-/retroperitonealer Tumor und "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
 Jede Primärlokalisation und jeder Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen Hoden-/retroperitonealer Tumor und "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
 - jeder Marker und - keine (nichtpulmonalen) Metastasen - Hoden-/retroperitonealer Tumor und - "intermediate" Marker und - keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
 keine (nichtpulmonalen) Metastasen Hoden-/retroperitonealer Tumor und "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
- Hoden-/retroperitonealer Tumor und - "intermediate" Marker und - keine (nichtpulmonalen) Metastasen			
 Hoden-/retroperitonealer Tumor und "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
 "intermediate" Marker und keine (nichtpulmonalen) Metastasen 			
- keine (nichtpulmonalen) Metastasen			
- keine (nichtpulmonalen) Metastasen			
- Jede Primärlokalisation und			
- jeder Marker und			
- (nichtpulmonale) viszerale Metastasen			
Poor Prognosis			
- Primär mediastinaler Tumor oder			
- Hoden-/retroperitonealer Tumor und			
- (nichtpulmonale) viszerale Metastasen			
oder			
- "poor" Marker			
00IU/I) und LDH <1,5 x N (Obergrenze Normalwert) 10000ng/ml (ca. 5000-50000IU/I) oder LDH 1,5-10 x N 000IU/I) oder LDH >10 x N			
0			

8.2 Statistische Methoden

8.2.1 T Test

Mithilfe des Student's T-Test werden Aussagen über die Konsistenz der Mittelwerte getroffen. Es kann getestet werden, ob zwei Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert stammen. Es wurde ein zweiseitiger Test für zwei Stichproben gleicher Varianz durchgeführt.

8.2.2 Statistik Proliferation Monotherapie

a. 2102EP

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
0.025	0.50	0.079
0.05	0.0086	0.0058
0.1	0.0014	0.00081
0.2	0.0013	0.00047
0.4	0.00036	0.00037
0.8	0.00026	0.00035

b. 2102EP-R

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
0.025	0.034	0.00055
0.05	0.031	0.000076
0.1	0.0003	0.000063
0.2	0.00029	0.000061
0.4	0.00011	0.000062
0.8	0.00019	0.000056

c. NTERA2

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
0.025	0.38	0.012
0.05	0.13	0.0002
0.1	0.00022	0.000065
0.2	0.0019	0.000037
0.4	0.00034	0.00013
0.8	0.0014	0.000077

d. NTERA2-R

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
0.025	0.023	0.103
0.05	0.0016	0.0043
0.1	0.0011	0.0018
0.2	0.00097	0.0017
0.4	0.0013	0.0017
0.8	0.0021	0.0019

e. NCCIT

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
0.025	0.74	0.31
0.05	0.11	0.015
0.1	0.00035	0.0007
0.2	0.00023	0.00041
0.4	0.00017	0.00045
0.8	0.0013	0.00067

f. NCCIT-R

ΡΗΑ (μΜ)	24 Stunden	48 Stunden
		100

0.025	0.0054	0.7
0.05	0.01	0.0032
0.1	0.016	0.000014
0.2	0.0006	0.00017
0.4	0.00069	0.00008
0.8	0.00031	0.00001

Abb. X T-Test der Effekte einer PHA-Monotherapie mit ansteigenden Konzentrationen auf die verschiedenen Zelllinien (a.-f.). Signifikante p-Werte (<0.05) sind rot dargestellt.

8.2.3 Statistik Proliferation Kombinationstherapie

a. 2102EP

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.008		
PHA 0.05	0.000088		
PHA 0.1	0.00002		
Cis 10	0.0005		
Cis 25	0.0000025		
Cis 50	0.00014		
P 0.025 C 10	0.00015	0.034	0.17
P 0.025 C 25	0.00076	0.015	0.74
P 0.025 C 50	0.000034	0.0014	0.75
P 0.05 C 10	0.00015	0.25	0.011
P 0.05 C 25	0.00021	0.057	0.029
P 0.05 C 50	0.000019	0.0031	0.089
P 0.1 C 10	0.000027	0.47	0.00065
P 0.1 C 25	0.000018	0.17	0.00025
P 0.1 C 50	0.000013	0.24	0.015

b. 2102EP-R

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.015		
PHA 0.05	0.0015		
PHA 0.1	0.00057		
Cis 10	0.029		
Cis 25	0.049		
Cis 50	0.022		
P 0.025 C 10	0.0071	0.43	0.0023
P 0.025 C 25	0.016	0.57	0.063
P 0.025 C 50	0.016	0.56	0.14
P 0.05 C 10	0.044	0.23	0.0063
P 0.05 C 25	0.0022	0.14	0.0013

P 0.05 C 50	0.00084	0.52	0.00028
P 0.1 C 10	0.00062	0.95	0.000078
P 0.1 C 25	0.00069	0.13	0.00014
P 0.1 C 50	0.001	0.071	0.00062

c. NTERA2

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.049		
PHA 0.05	0.00052		
PHA 0.1	0.00042		
Cis 10	0.072		
Cis 25	0.017		
Cis 50	0.0032		
P 0.025 C 10	0.028	0.19	0.056
P 0.025 C 25	0.0085	0.022	0.097
P 0.025 C 50	0.004	0.0041	0.42
P 0.05 C 10	0.00061	0.073	0.00012
P 0.05 C 25	0.00089	0.19	0.0013
P 0.05 C 50	0.00076	0.22	0.003
P 0.1 C 10	0.00037	0.93	0.000074
P 0.1 C 25	0.00038	0.49	0.00032
P 0.1 C 50	0.00045	0.073	0.0013

d. NTERA2-R

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.0014		
PHA 0.05	0.000013		
PHA 0.1	0.000023		
Cis 10	0. 48		
Cis 25	0.21		
Cis 50	0.000024		
P 0.025 C 10	0.00066	0.51	0.05
P 0.025 C 25	0.00092	0.160	0.15
P 0.025 C 50	0.000021	0.15	0.23
P 0.05 C 10	0.0000033	0.58	0.00019
P 0.05 C 25	0.0000034	0.93	0.0079
P 0.05 C 50	0.0000079	0.46	0.000057
P 0.1 C 10	0.0000032	0.6	0.00037
P 0.1 C 25	0.000034	0.91	0.0056
P 0.1 C 50	0.000035	0.5	0.0000044

e. NCCIT

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.49		
PHA 0.05	0.000019		
PHA 0.1	0.000029		
Cis 10	0.0027		
Cis 25	0.0034		
Cis 50	0.0014		
P 0.025 C 10	0.013	0.018	0.57
P 0.025 C 25	0.00011	0.0006	0.06
P 0.025 C 50	0.00023	0.00076	0.27
P 0.05 C 10	0.0000074	0.075	0.045
P 0.05 C 25	0.000088	0.0024	0.076
P 0.05 C 50	0.0000039	0.00048	0.011
P 0.1 C 10	0.0000074	0.51	0.00083
P 0.1 C 25	0.0000073	0.69	0.042
P 0.1 C 50	0.00000076	0.059	0.00024

f. NCCIT-R

Medikament (µM)	Zur Kontrolle	Zum PHA-Wert	Zum Cis-Wert
PHA 0.025	0.49		
PHA 0.05	0.015		
PHA 0.1	0.00014		
Cis 10	0.0017		
Cis 25	0.00038		
Cis 50	0.0005		
P 0.025 C 10	0.66	0.16	0.23
P 0.025 C 25	0.000038	0.00021	0.98
P 0.025 C 50	0.001	0.0015	0.18
P 0.05 C 10	0.000029	0.095	0.00094
P 0.05 C 25	0.00027	0.12	0.002
P 0.05 C 50	0.00012	0.17	0.061
P 0.1 C 10	0.000015	0.88	0.00016
P 0.1 C 25	0.000027	0.22	0.00055
P 0.1 C 50	0.0000068	0.6	0.0012

Abb. X T-Test der Effekte eine Kombinationstherapie mit ansteigenden Konzentrationen von PHA-7393589 und Cisplatin auf die verschiedenen Zelllinien (a.-f.). Signifikante p-Werte (<0.05) sind rot dargestellt.

9 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer, der die Voraussetzungen geschaffen hat, diese Arbeit zu ermöglichen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. med. Friedemann Honecker, der als Doktorvater mit viel Engagement und Einsatz die Betreuung der Promotionsarbeit übernommen hat. Seine Erfahrungen und Kenntnisse waren für das Gelingen dieser Arbeit ein sehr wichtiger Bestandteil. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Tina Rohlfing, Dr. rer. nat. Stefanie Gläsener, Dr. rer. nat. Christine Jacobsen und Dr. med. Artur Gontarewicz bedanken. Ihre konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen haben mich vor Rückschlägen bewahrt oder mich aus ihnen lernen lassen. Die Arbeit im Forschungslabor war eine lehrreiche Erfahrung. Über die Jahre haben sich Freundschaften entwickelt, für die ich sehr dankbar bin.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der hämatologischonkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die mich bei Labortätigkeiten unterstützt haben.

Meinem Ehemann, meinen Eltern, meinem Sohn und meiner Schwester möchte ich für ihren Beistand, ihre Entlastung, Ermutigung und Förderung während des Studiums und der Promotionszeit danken. Ihre Liebe und Rückhalt bilden die Basis jeglichen Schaffens.




11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Juliane Waskow