

# Universität Rostock



Traditio et Innovatio

**Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration**

**Direktor: Prof. Dr. med. A. Rolfs**

„Die antineoplastische Potenz des Indolylmaleimids PDA66 –  
eine Studie zu Wirkmechanismen, Aktivität in verschiedenen Zellmodellen und  
Verträglichkeit im Tiermodell“

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Christian Eisenlöffel  
aus Greifswald

Rostock, 07. Juli 2014

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Andreas Wree

Institut für Anatomie, Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Alexander Storch

Klinik für Neurologie, Technische Universität Dresden

Datum der Einreichung: 07.06.2014

Datum der Verteidigung: 09.06.2015

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 07. Juli 2014

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
1.1 Krebserkrankungen – Epidemiologie und Grundlagen	1
1.2 Tubulin als Angriffspunkt zytostatischer Therapien	2
1.2.1 Grundlagen	2
1.2.2 Spindelgifte	4
1.2.3 Mechanismus der Wirkung von Spindelgiften	6
1.2.4 Resistenzen gegen Spindelgifte	8
1.2.5 Nebenwirkungen von Therapien mit Spindelgiften	10
1.3 Indole in natürlichen und synthetischen Verbindungen	11
1.4 Gezielte Krebstherapien	13
1.5 GSK3 $\beta$ als Ziel von Chemotherapien	14
<b>2 Zielstellung</b>	<b>17</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Materialien	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Chemikalien	18
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze	18
3.1.5 Antikörper	19
3.1.6 Reaktionskits	19
3.1.7 Software	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Zellkultur	19
3.2.1.1 Kultur der humanen neuralen Progenitorzellen	20
3.2.1.2 Kultur der A549-Zellen	21
3.2.1.3 Kultur der SW480-Zellen	21
3.2.1.4 Kultur der Hep G2-Zellen	21
3.2.1.5 Kultur der Jurkat-Zellen	21
3.2.1.6 Kultur der MCF-7-Zellen	22
3.2.2 Experimente zur Zellproliferation	22
3.2.2.1 Proliferationskinetiken	23
3.2.2.2 Expositionszeit	23
3.2.2.3 Vergleich in verschiedenen Krebszelllinien	23
3.2.3 Bestimmung der metabolischen Aktivität mit dem WST1-Versuch	23
3.2.3.1 WST1-Spaltung in proliferierenden Zellen	24

## Inhaltsverzeichnis

3.2.3.2 WST1-Spaltung bei Mediumwechsel	24
3.2.3.3 WST1-Spaltung in differenzierten Zellen	24
3.2.4 Proteinbestimmungen	25
3.2.4.1 Proteinquantifizierung	25
3.2.4.2 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	25
3.2.5 Immunhistochemie	25
3.2.6 Durchflusszytometrie	26
3.2.6.1 Zell-Zyklus-Messung mit Propidium-Iodid	26
3.2.6.2 Bestimmung apoptotischer Zellen mit Annexin V	27
3.2.7 Tubulin-Polymerisation	28
3.2.7.1 Video-Mikroskopie nach Allen	28
3.2.7.2 Bestimmung der optischen Dichte	29
3.2.8 Akut-Toxizitäts-Studie	30
3.2.8.1 Klinische Beobachtung	30
3.2.8.2 Histopathologische Begutachtung	31
3.3 Statistische Analyse	31
<b>4 Resultate</b>	<b>32</b>
4.1 Die Wirkung von Indolylmaleimiden auf neurale Progenitorzellen	32
4.1.1 Proliferation und Vitalität	32
4.1.2 Zellmetabolismus	34
4.1.3 Metabolismus in differenzierten Zellen	35
4.1.4 Zellzyklus	36
4.1.5 Apoptose	37
4.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus	39
4.2.1 Veränderungen des Zytoskeletts in hNPZ	39
4.2.2 Tubulin-Polymerisation in vitro	41
4.2.3 Gesamt $\beta$ -catenin-Gehalt unter PDA66-Behandlung	44
4.2.4 Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit von SB216763 und IM-12	44
4.3 PDA66 als Zytostatikum	46
4.3.1 Proliferation in Krebszell-Linien	46
4.3.2 Antiproliferative Potenz im Vergleich mit etablierten Spindelgiften	47
4.3.3 Toxizität in differenzierten hNPZ im Vergleich mit Paclitaxel	49
4.3.4 Akut-toxische Nebenwirkungen im Mausmodell	50
4.4 Antiproliferative Effekte weiterer Indolylmaleimide	52
4.4.1 SB216763 und IM-12	52
4.4.2 Derivate PDA377; 396; 397-1/2; 398; 66E	54

<b>5 Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1 Die Wirkung von Indolylmaleimiden auf neurale Progenitorzellen	56
5.1.1 Wachstum, Metabolismus und Zellzyklus	56
5.1.2 Induktion der Apoptose	58
5.2 Wirkmechanismus	59
5.2.1 Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik durch PDA66	59
5.2.2 Einfluss auf den $\beta$ -catenin-Spiegel in hNPZ	60
5.2.3 SB216763 und IM-12 als Tubulin-Inhibitoren	61
5.3 PDA66 als Zytostatikum in Krebszelllinien	62
5.4 Toxische Nebenwirkungen von PDA66	66
5.4.1 Akuttoxizität im in vivo Modell	66
5.4.2 Neurotoxizität im in vitro Modell	67
5.5 Untersuchung weiterer Derivate	68
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>7 Thesen</b>	<b>71</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>I</b>
9.1 Tabellen und Abbildungen	II
9.2 Danksagungen	VII
9.3 Publikationen	VIII
9.3.1 Originalarbeiten	VIII
9.3.2 Vorträge	VIII
9.3 Lebenslauf	IX

**Abkürzungen / englische Begriffe**

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>μ</b>	Mikro
<b>ABC</b>	ATP-Bindung-Cassette
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ALL</b>	Akute lymphatische Leukämie
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>APC/C</b>	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
<b>APL</b>	Akute promyelozytische Leukämie
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATRA</b>	All-trans-Retinalsäure
<b>AVEC DIC</b>	Allen's Video Enhanced Contrast Differential Interference Contrast
<b>B27</b>	Zellmedium
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>Bcl</b>	B-cell-lymphoma 9 protein
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>well</b>	Kavität
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CDK</b>	Cyclin-Dependent-Kinase
<b>CDKI</b>	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor
<b>CHOP</b>	Cyclophosphamid-Hydroxydaunorubicin-Oncovin Prednison
<b>CIPN</b>	Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie
<b>CML</b>	Chronisch Myeloische Leukämie
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EC<sub>50</sub></b>	Effektive Konzentration 50
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
<b>FBS</b>	Fetales Kälberserum
<b>g</b>	Erdbeschleunigung; 9,81m/s <sup>2</sup>
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GF</b>	Growth Factors

## Abkürzungsverzeichnis

<b>GSK-3</b>	Glykogen-Synthase-Kinase-3
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>IAP</b>	Inhibitor of Apoptosis
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibitorische Konzentration 50
<b>fold increase</b>	Vielfaches des Ausgangswertes (0h)
<b>h</b>	human, Stunden
<b>HCC</b>	Hepatozelluläres Karzinom
<b>HE</b>	Haematoxylin-Eosin
<b>HBS</b>	Hepes-gepufferte-Kochsalzlösung
<b>HBSS</b>	Hanks balanced salt solution
<b>hNPZ</b>	humane Neurale Progenitorzellen
<b>HSR</b>	Hypersensitivitätsreaktion
<b>IAP</b>	Inhibitor of Apoptosis
<b>K-RAS</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>M-Phase</b>	Mitose-Phase
<b>Max</b>	Maximal
<b>MCC</b>	Mitotic Checkpoint Complex
<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>min</b>	Minuten
<b>MW</b>	Mediumwechsel
<b>n</b>	Nano
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NHL</b>	Non Hodgkin Lymphome
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>RAR<math>\alpha</math></b>	Retinalsäure-Rezeptor-alpha
<b>RBC</b>	Red Blood Cells
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>SAC</b>	Spindle-Assembly-Checkpoint
<b>sIRNA</b>	small inhibiting RNA
<b>TPA</b>	Tetradecanoylphorbol-Acetat
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>OECD</b>	Organisation for Economic Cooperation and Development
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI</b>	Propidium Iodid



#### Abkürzungsverzeichnis

<b>PLT</b>	Platelets
<b>PTX</b>	Paclitaxel
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>t</b>	Zeit
<b>V</b>	Geschwindigkeit
<b>V50</b>	halbmaximale Geschwindigkeit
<b>VDA</b>	Vascular Disrupting Agent
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WBC</b>	White Blood Cells

## **1 Einführung**

### **1.1 Krebserkrankungen – Epidemiologie und Grundlagen**

Bösartige Neubildungen stellen mit steigender Tendenz nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt 2011). Unter diesen waren bei Männern Neoplasien der Lunge, des Darmes und der Prostata; bei Frauen Neoplasien der Mamma, des Darmes und der Lunge die häufigsten Krebserkrankungen mit tödlichem Ausgang 2007/2008 (Robert-Koch-Institut 2012).

Die Behandlung von Krebserkrankungen stützt sich auf die Grundpfeiler der onkologischen Chirurgie, der Bestrahlung und der medikamentösen Therapie, welche die Bereiche der zytostatischen und der antihormonellen Behandlungen umfasst.

Der Begriff Chemotherapie als Beschreibung für Substanzen, die toxische Effekte selektiv auf Bakterien zeigen, wurde von Paul Ehrlich geprägt. Für diese Substanzgruppen hat sich später der Begriff Antibiotika etabliert, wohingegen der Begriff Chemotherapie heute eher Substanzen mit antineoplastischer Aktivität meint. Während Antibiotika die Hoffnung der selektiven Wirkung erfüllt haben und spezifisch das Bakterienwachstum hemmen, sind die in der antineoplastischen Chemotherapie verwendeten Substanzen in ihrer Wirkung unspezifisch. Die initial aus der Kriegsindustrie stammenden Substanzen (Gross und Lambers 1958) waren hochtoxisch und inhibierten wie die heute üblichen klinisch verwendeten Zytostatika das Zellwachstum. Durch diese unspezifische Wirkungsweise werden neben sich schnell teilenden Tumorzellen auch physiologische Gewebe, vor allem solche mit einer hohen Teilungsrate geschädigt. Aus den unspezifischen, z.T. zytotoxischen, Effekten auf die Normalgewebe des Körpers erwachsen damit auch die häufigsten Nebenwirkungen von Chemotherapien: die Immunsuppression infolge toxischer Effekte auf das Knochenmark sowie die Schädigung von Epithelien. Neurotoxische Effekte in Form von Paraesthesien und Dysästhesien sind eine bekannte Nebenerscheinung der Behandlung mit antimitotischen Substanzen wie den Taxanen (Argyriou et al. 2008).

Die Substanzen entstammen einer Vielzahl von chemischen Klassen, ihre zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind jedoch in pharmakologischen Lehrbüchern zu einer kleinen Zahl von Interaktionen auf unterschiedlichen Ebenen der Zelle zusammengefasst (Mutschler 2012):

Die in der Chemotherapie verwendeten Substanzen wirken teils auf DNS-Ebene über die Inhibition der Synthese (Antimetabolite) oder durch direkte Schädigung der DNS-Struktur (Alkylanzien, Topoisomerase-Inhibitoren, Anthrazykline). Weiterhin wirken Chemotherapeutika auf Proteinebene durch Inhibition der Proteinsynthese (Hormonantagonisten, Enzyme) oder durch Interaktion mit Struktur und Funktion der Proteine (zu dieser Gruppe gehören Substanzen, welche zu einer Störung der Mikrotubuli-Funktion führen). Dabei lassen sich die aufgeführten Klassen anhand ihrer Wirkungsmechanismen in Bezug auf den Zellzyklus in jene ohne Abhängigkeit vom Zellzyklus (zyklusunspezifische), an die Aktivität des Zellzyklus jedoch nicht an spezifische

## 1 Einleitung

Phasen (zyklusspezifische) gebundene und jene mit Abhängigkeit von bestimmten Zellzyklusphasen (phasenspezifische) einteilen.

Zyklusunspezifische Zytostatika wie Nitrosoharnstoffe wirken auch in der G<sub>0</sub>-Phase, also in ruhenden Zellen. Zyklusspezifische Zytostatika wie Alkylanzien und Platin-Derivate sind in teilungsaktiven Zellen während der Dauer des gesamten Zellzyklus aktiv. Die Effektivität dieser Substanzen hängt vor allem von der eingesetzten Konzentration ab und führt auch in höheren Dosen zu keiner Plateaubildung in der Inhibierung des Zellwachstums (Scheffold et al. 2010).

Die Wirksamkeit phasenspezifischer Zytostatika wie Mitoseinhibitoren ist an das Durchlaufen einer bestimmten Zellzyklusphase und damit ebenfalls an die Teilungsaktivität der Zellen gekoppelt: die erzielten Effekte sind umso größer, je mehr Zellen des Tumors die sensible Zellzyklusphase durchlaufen. Aus diesem Grunde hängt der Behandlungserfolg phasenspezifischer Zytostatika in stärkerem Maße von der Behandlungsdauer als von der verwendeten Konzentration ab und ist in Tumoren mit einem größeren Anteil an proliferierenden Zellen größer (Scheffold et al. 2010).

## **1.2 Tubulin als Angriffspunkt zytostatischer Therapien**

### **1.2.1 Grundlagen**

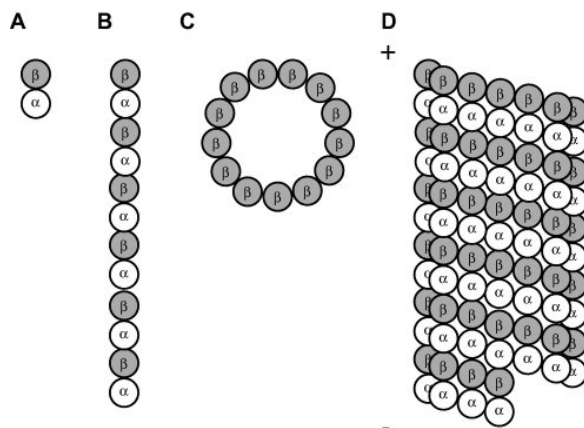
Die Entdeckung antineoplastischer Substanzen mit Einfluss auf die Mikrotubuli in Form von natürlichen Zellgiften der Catharanthen- und Eibengewächse liegt mehr als 40 Jahre zurück (Wani et al. 1971, Schiff et al. 1979, Noble et al. 1958). Antimikrotubuläre Zytostatika werden nach wie vor häufig in chemotherapeutischen Regimes in Einzel- oder Kombinationstherapien verwendet (Tomek 2000) und in einer Vielzahl klinischer Studien auf ihre Wirksamkeit in verschiedenen Neoplasien getestet und verglichen ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Besonders ihre grundlegende Funktion als Motor für die Teilung der Schwesterchromosomen während der Mitose macht die Mikrotubuli zu einem potenten und nach wie vor hochwertigen Ziel onkologischer Therapien (Giannakakou et al. 2000b).

Mikrotubuli sind universeller Bestandteil eukaryotischer Zellen und bilden gemeinsam mit Intermediär- und Aktinfilamenten das Zytoskelett der Zelle. Während Intermediärfilamente vor allem die Stabilität der Zelle gegenüber mechanischem Stress sicherstellen, erhalten Aktinfilamente die Zellform aufrecht. Die Funktionen der Mikrotubuli betreffen vor allem die Motilität der Zelle, die Position der Organellen in Interphase-Zellen, den Transport von Proteinen durch die Zelle und - für die Chemotherapie von herausragender Wichtigkeit - die Mitose. Grundlage dieser Funktionen ist die Mikrotubuli-Dynamik, die durch ein ständiges Wachsen und Schrumpfen der Polymere entsteht (Jordan und Wilson 2004).

Grundbaustein der Mikrotubuli ist Tubulin, welches in verschiedenen Unterformen, zumeist  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, auftritt. Neben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin existieren noch weitere, seltenere bzw. zum Teil nicht ubiquitär in Eukaryoten vorkommende Tubulintypen wie  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -Tubulin. Für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin werden je 6 Isoformen mit z.T. gewebespezifischer Expression unterschieden (Wade 2009, siehe auch Tabelle 9.1.2 im Anhang). Diese Proteine aggregieren

## 1 Einleitung

zunächst zu ( $\alpha\beta$ )-Heterodimeren und bilden nach Chaperon-abhängiger Faltung (Lopez-Fanarraga et al. 2001) lineare Ketten aus entgegengesetzt angeordneten Heterodimeren, sogenannten Protofilamenten. 13 Protofilamente bilden die Struktur eines röhrenartigen Tubulinzylinders, der durch ein dynamischeres (+)-Ende, auf dessen Seite  $\beta$ -Tubulin frei zum Zytoplasma liegt, und ein weniger bewegliches (-)-Ende, auf dessen Seite  $\alpha$ -Tubulin frei zum Zytoplasma liegt, gekennzeichnet ist (Risinger et al. 2009). Ab einer Temperatur von 30°C sind Tubulinuntereinheiten in der Lage, sich in Anwesenheit von Magnesium und GTP zusammenzulagern. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tubulin können GTP binden, wobei nur  $\beta$ -Tubulin eine hydrolysierbare Bindungsstelle besitzt. Für die Anlagerung an einen Tubulinzylinder muss zunächst GTP an die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit des Heterodimers gebunden sein und wird nach Anlagerung an den Strang zu GDP hydrolysiert. Die GDP- $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten des Tubulinzylinders sind zumeist durch mindestens eine oder mehrere GTP- $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten, ein sogenanntes „cap“, vor dem Abbau geschützt (Wade 2009).



**Abbildung 1.1 Aufbau der Mikrotubuli**

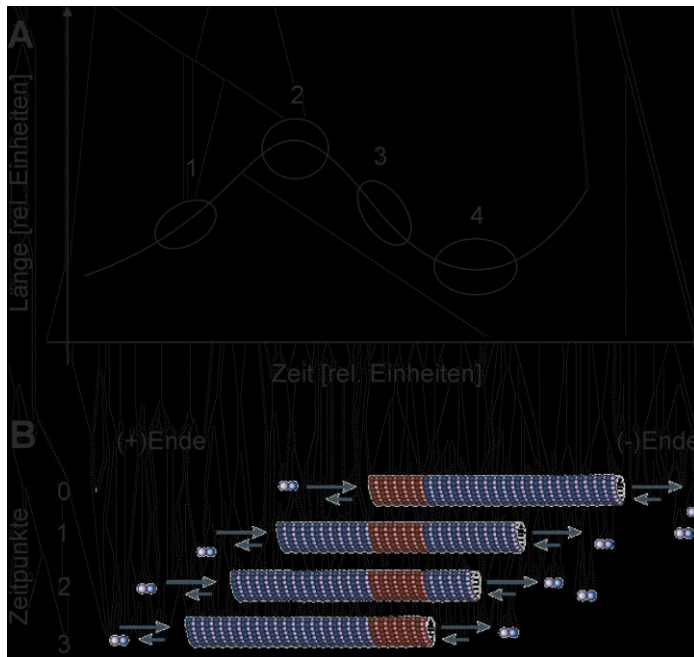
$\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Dimere (A), lagern sich in wechselnder Folge zu Protofilamenten zusammen (B). 13 Protofilamente bilden einen Mikrotubulus-Zylinder, mit einem äußeren Durchmesser von 25nm und einem inneren Durchmesser von 12nm (C). Am (-)-Ende liegen  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten, am (+)-Ende  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten frei zum Zytoplasma (D). Adaptiert nach Risinger et al. (Risinger et al. 2009)

Die für die Funktion ausschlaggebende Dynamik der Mikrotubuli basiert auf zwei Hauptmechanismen, die sowohl in vitro in isoliertem Tubulin als auch in vivo auftreten - der „dynamic instability“ und dem „treadmilling“.

Die „dynamic Instability“ (zu deutsch dynamische Instabilität) umschreibt sowohl die Wachstums- und Schrumpfrate als auch den Wechsel von Wachstumsprozess zu Schrumpfung („catastrophe“, zu deutsch Katastrophe) bzw. von Schrumpfung zu Wachstum („rescue“, zu deutsch Rettung) an einem Ende des Mikrotubulus.

Das „treadmilling“ (von treadmill, zu deutsch: Laufband), bezeichnet das gleichzeitige wachsen und schrumpfen an beiden Enden des Stranges bei gleichzeitiger Stabilität der Polymermasse (Jordan und Wilson 2004).

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.2 Tubulin-Dynamik.**

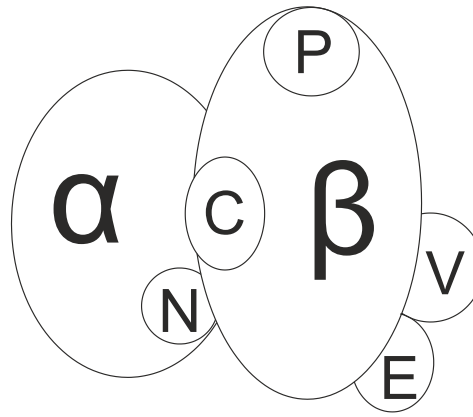
(A) Zeigt die verschiedenen Elemente der dynamischen Instabilität an einem Mikrotubulusende: (1) Wachstumsphase, (2) Katastrophe – Wechsel von Wachstum zu Schrumpfung, (3) Schrumpfung, (4) Rettung – Wechsel von Schrumpfung zu Wachstum.

(B) Zeigt das Laufbandverhalten: Wachstum am (+)-Ende bei gleichzeitiger Schrumpfung am (-)-Ende.

Adaptiert nach Jordan et al. (Jordan und Wilson 2004).

### 1.2.2 Spindelgifte

Vereinfacht werden antimikrotubuläre Zytostatika nach ihrer Wirkung auf Tubulinpolymere in stabilisierende und destabilisierende Substanzen eingeteilt. Diese Klassifizierung entspricht einer Beschreibung der Wirkung auf Tubulin in sehr hohen Substanzkonzentrationen und geht mit einer Änderung der Polymermasse einher. Die klinischen Effekte der Substanzen beruhen jedoch viel eher auf einer einheitlichen Verlangsamung und damit Stabilisierung der Mikrotubuli-Dynamik, die in 10-100fach geringeren Konzentrationen erreicht wird (Jordan und Wilson 2004). Während die Einteilung in stabilisierende und destabilisierende Spindelgifte die klinische Wirkung nicht exakt widerspiegelt, erlaubt sie eine Zuordnung der molekularen Konsequenzen der Interaktion zu drei unterschiedlichen Hauptstellen am Tubulinzylinder: der Taxan-, der Colchicin- und der Vinca-Bindungsstelle (Downing 2000).



**Abbildung 1.3 Die Hauptbindungsstellen am Tubulinheterodimer.** (V) Vinca-Bindungsstelle auf der Außenseite der  $\beta$ -Untereinheit am (+)-Ende.

(T) Taxan-Bindungsstelle auf der Innenseite der  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit. (C) Colchicin-Bindungsstelle auf der  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin.

(E), (N) Nucleotidbindungsstellen. (E) austauschbar. (N) nicht austauschbar.

Adaptiert nach Downing (Downing 2000)

Die Taxanbindungsstelle liegt auf der Innenseite des Mikrotubulus an den  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten (Nogales et al. 1995) und ist Ziel für die klinisch häufig verwendeten Taxane wie Paclitaxel und Docetaxel sowie für Epothilone, die auch Aktivität gegen Taxan-resistente Tumoren zeigen (Crown et al. 2004, Yardley 2008). In hohen Konzentrationen führt die Bindung von Paclitaxel, das sich in einem Verhältnis von 1:1 an die Heterodimere lagern kann, zur Steigerung der Polymerisation von Tubulin, während bereits wenige Paclitaxel-Moleküle genügen, um die Mikrotubuli-Dynamik über eine Veränderung der Mikrotubuluskonformation zu stabilisieren (Derry et al. 1995).

Die Colchicin-Bindungsstelle liegt auf der Innenseite der Mikrotubuli an der Kontaktstelle zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten auf der Seite des  $\beta$ -Tubulins. Die Bindung von Liganden an diese inhibiert in niedrigen Konzentrationen die Polymerisation von Tubulin-Heterodimeren; in hohen Konzentrationen vermittelt sie die Depolymerisation bereits vorhandener Mikrotubuli (Downing 2000). Zur Gruppe der Liganden für die Colchicin-Bindungsstelle zählen neben der namensgebenden Substanz Colchicin u. a. die Combretastatine, welche durch zusätzliche anti-angiogene Effekte klinisch vielversprechende Zytostatika darstellen (Mooney et al. 2009). Weiterhin binden hier zahlreiche niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht von weniger als 900 Dalton. Von diesen sogenannten small molecules (zu deutsch: kleine Moleküle) zeigen zahlreiche chemisch Indol-Motive, wie in der Übersichtsarbeit von Brancale und Silvestri beschrieben (Brancale und Silvestri 2007).

Die Bindung von Liganden an die Vinca-Bindungsstelle, gelegen auf der Außenseite des (+)-Endes der  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit, vermittelt in hohen Konzentrationen die Zerstörung bestehender Mikrotubuli. Die Protofilamente werden hierbei nicht aufgelöst, sondern lagern sich in der Folge spiralig zusammen und aggregieren zu Parakristallen (Erickson 1975).

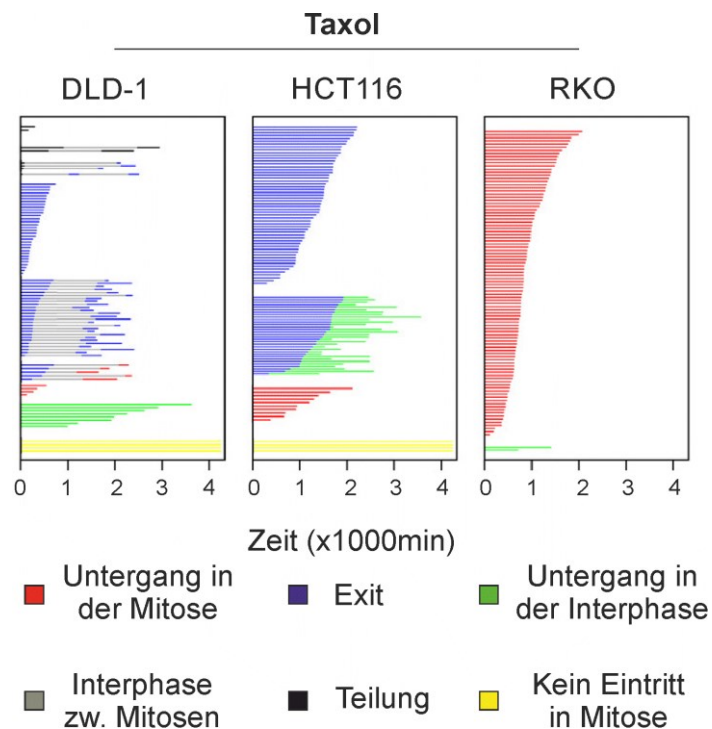
## 1 Einleitung

Klinische Effekte durch niedrige Konzentrationen von Vinca-Alkaloiden, Dolastatinen und Hemiasterlinen (Hamel 1992, Loganzo et al. 2003) werden über eine Stabilisierung der Mikrotubuli-Dynamik vermittelt (Downing 2000).

### **1.2.3 Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Spindelgiften**

Rusan et al. konnten zeigen, dass die Mikrotubuli-Dynamik während der Mitose im Vergleich zur Interphase um ein Vielfaches zunimmt, was die speziellen Effekt anti-mikrotubulärer Substanzen auf proliferierende Zellen erklärt (Rusan et al. 2001).

In sich teilenden Zellen wird die Mitose durch Aktivierung der Cyclin-Dependent-Kinase 1 (CDK1) durch Cyclin B eingeläutet und erst durch Absinken des Cyclin-B-Spiegels unter eine bestimmte Grenze wieder verlassen (Matson und Stukenberg 2011). Während der Metaphase kontrolliert der Spindle Assembly-Checkpoint (SAC) die Dauer der Mitose (Musacchio und Salmon 2007): das SAC-Signal ist aktiv, solange nicht alle Kinetochore der Schwesterchromosomen mit den (+)-Enden der Mikrotubuli des Spindelapparats verbunden sind. Der aktive SAC führt über den Mitotic Checkpoint Complex (MCC), bestehend aus Mad2, BUBR1/Mad3, BUB3 und CDC20 zur Inhibition der als Anaphase Promoting Complex bzw. Cyclosome (APC/C) bezeichneten Ubiquitin-Ligase, die den Abbau von Cyclin B und CDK1 und damit das Verlassen der Mitose fördert. Sind alle Kinetochore beidseitig zu den Zellpolen orientiert mit Mikrotubuli verbunden, endet das SAC-Signal und die Zelle tritt nach Abbau von Cyclin B in die Anaphase über. Erfolgt keine korrekte Anbindung der Mikrotubuli, beispielsweise infolge der Beeinflussung der Mikrotubuli-Dynamik durch Spindelgifte, wird die Mitose durch den SAC verlängert – die Zelle befindet sich im sogenannten mitotic arrest (zu deutsch: Mitose-Arrest), der Anteil von Zellen in der Prometaphase steigt. Die zelluläre Antwort auf eine verlängerte Mitosezeit kann zwischen verschiedenen Gewebetypen und innerhalb verschiedener Zelllinien erheblich variieren (Gascoigne und Taylor 2008).



**Abbildung 1.4 Die Varianz der zellulären Antwort** zwischen verschiedenen Zelllinien und innerhalb einer Linie. Behandlung dreier verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien (DLD-1; HCT116; RKO) mit Paclitaxel (Taxol) und Dokumentation der Zellreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Live-Aufnahmen bei GFP-Histon-H2b-Transfektion. Während nahezu alle RKO-Zellen in der Mitose untergehen, setzen HCT-116-Zellen den Zellzyklus zumeist ohne Teilung fort (Exit), nur ein Teil geht in der folgenden Interphase unter, wenige Zellen gehen bereits in der Mitose unter.

Adaptiert nach Gascoigne et al. (Gascoigne und Taylor 2008)

Die zelluläre Antwort wird von Weaver et al. in 5 Typen eingeteilt: Die Zelle kann 1.) in der Mitose gehalten werden, bis die Substanz als Ursache entfällt und im Anschluss die normale Teilung fortsetzen. Unter weiterem Einfluss der antimitotischen Substanz kann die Zelle 2.) aus dem Mitose-Arrest ohne Zytokinese in die  $G_1$ -Phase übergehen - ein Phänomen, das als „slippage“ bezeichnet wird. Aus dieser Phase des Zellzyklus kann sie 3.) in einen neuen Zellteilungszyklus übertreten - dieses Phänomen führt zu Poly- oder Aneuploidie; 4.) in den Status der Seneszenz, also in einen  $G_0$ -Zustand übergehen oder 5.) die Apoptose auslösen (Weaver und Cleveland 2005). In Experimenten von Matson und Stukenberg entfiel mit 6% nur ein kleiner Anteil der mit Nocodazol behandelten HeLa-Zellen auf den 5. Reaktionstyp (Matson und Stukenberg 2011). Verschiedene Arbeiten beschreiben die Entscheidung über das Zellschicksal als ein konkurrierendes System zwischen fallenden Spiegeln des Proteins Cyclin B, das die Zelle in der Mitose verankert und dem Abbau anti-apoptotischer Proteine wie Mcl-1, das zur BCL-2-Proteinfamilie gehört (Gascoigne und Taylor 2009, Matson und Stukenberg 2011). Nach Mollinedo und Gajate erfolgt die Induktion des intrinsischen apoptotischen Signalweges über die Phosphorylierung und den anschließenden Abbau des antiapoptotischen BCL-2-Proteins und die daraus resultierenden erhöhten Spiegel freier proapoptotischer Proteine wie Bax (Mollinedo und Gajate 2003). Durch Ansammlung dieser in



## 1 Einleitung

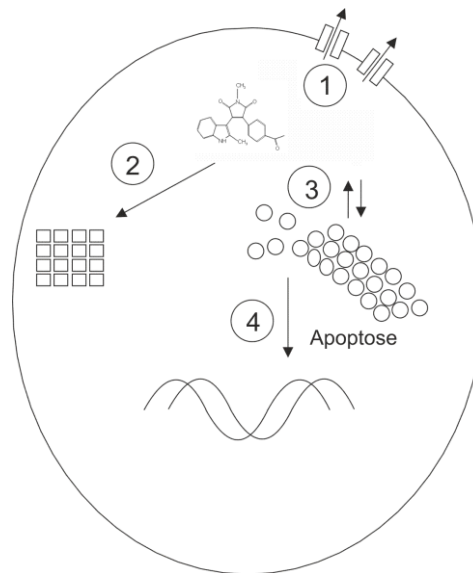
der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zum Efflux von Cytochrom C, dass über Caspase-9 die Effektor-Caspasen 3,6 und 7 aktiviert und die Apoptose auslöst.

Die zur Apoptose führenden Mechanismen außerhalb der Mitose wurden zumeist an Paclitaxel als Referenzsubstanz für klinisch verwendete Spindelgifte studiert: ein möglicher Mechanismus zur Induktion der Apoptose nach Übertritt in die G1-Phase führt über das Überwiegen proapoptotischer gegenüber antiapoptotischen Signalen infolge ihrer Akkumulation in der Mitose (Mollinedo und Gajate 2003). Die Induktion der Apoptose durch Spindelgifte ist im Gegensatz zu den Effekten DNS-schädigender Zytostatika nicht p53-abhängig. Paradoxerweise sensitiviert der Verlust der regulär proapoptotischen p53-Funktion Krebszellen für die Wirkung von Paclitaxel (Debernardis et al. 1997), Wahl et al. 1996). Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist der Ausfall der inhibitorischen Wirkung des Proteins p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (auch Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitor 1A) auf Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und somit auf den Fortschritt der Zellen im Zellzyklus. Der im Apoptosesignalweg abwärts von p53 liegende CDK-Inhibitor verhindert die Auslösung der Apoptose durch Arrest der Zelle in der G1-Phase und durch die Inhibition der Paclitaxel-vermittelten Aktivierung des Proteins p34<sup>cdc2</sup>, welches die Zellen in der G2/M-Phase arretiert (Yu et al. 1998). Die höhere Sensitivität gegenüber stabilisierenden Spindelgiften wie Paclitaxel, jedoch geringerem Ansprechen auf destabilisierende Substanzen wie Vinca-Alkaloide infolge von p53-Mutationen geht auch mit dem Ausfall der negativ regulatorischen Funktion von p53 auf das stabilisierende Mikrotubuli-assoziierte-Protein 4 (MAP4) einher (Zhang et al. 1998).

Als Zeichen der Apoptose finden sich unter anderem Zellabrundung, DNS-Kondensation und die Translokation von Phosphatidylserin auf die äußere Zellmembran als Phagozytoseliganden (Taylor et al. 2008).

### **1.2.4 Resistenzen gegen Spindelgifte**

Ähnlich heterogen wie die zelluläre Antwort auf die Behandlung mit antimikrotubulären Substanzen ist die Sensitivität unterschiedlicher Tumorgewebe für Therapien mit Mitosehemmstoffen: Resistenzen gegen Spindelgifte werden unabhängig von der Pharmakokinetik der Substanzen nach Dumontet und Sikic in 4 mögliche resistenzvermittelnde Mechanismen eingeteilt (Abbildung 1.5): 1.) die Senkung der intrazellulären Konzentration toxischer Substanzen durch aktiven Auswärtstransport, 2.) der verstärkte intrazelluläre Metabolismus bzw. die Beeinflussung der intrazellulären Verteilung, 3.) die Veränderung der Substanz-Substrat-Interaktion sowie 4.) die Inaktivierung apoptotischer Signalwege (Dumontet und Sikic 1999).



**Abbildung 1.5. Einteilung verschiedener Resistenzmechanismen auf zellulärer Ebene.**

(1) Auswärtstransport über Effluxpumpen führt zu niedrigeren Wirkstoffspiegeln. (2) Intrazellulärer Metabolismus bzw. veränderte intrazelluläre Verteilung führt zu einem niedrigeren Anteil freier Substanz. (3) Schwächung der Substanz-Mikrotubuli-Interaktion durch Mutation/ alternative Mikrotubuli-Dynamik/ Veränderung der Mikrotubuli-Isoform-Zusammensetzung. (4) Inhibition apoptotischer Signalkaskaden durch Überexpression anti-apoptotischer Proteine / Supprimierung pro-apoptotischer Faktoren.

Adaptiert nach Dumontet et al. (Dumontet und Sikic 1999)

Auch wenn die höhere Expression von ABC-Transportern wie P-Glycoprotein auf der Zellmembran mit einer schlechteren Ansprechrate in Primärtumoren vergesellschaftet ist, haben bisherige Ansätze den Auswärtstransport zu inhibieren keine klinischen Erfolge erbringen können (Lage 2008). Substanzen, die Substrate für ABC-Transporter wie P-Glycoprotein darstellen, werden nicht nur an der Blut-Tumor-Grenze, sondern auch an der Blut-Hirn-Schranke aktiv auswärts transportiert und erreichen somit nur niedrige Konzentrationsspiegel im ZNS (Agarwal et al. 2011).

Der zweite mögliche Mechanismus der Resistenzvermittlung über einen erhöhten Metabolismus oder besondere Umverteilung des Zytostatikums innerhalb der Zelle hat bislang kein klinisches Korrelat gefunden.

Von großer Bedeutung hingegen ist die Veränderung der Interaktion der Spindelgifte mit den Mikrotubuli. Sowohl Veränderungen Tubulin-assoziiierter Proteine wie MAP2, MAP4, MAP6 oder Survivin in ihrer intrazellulären Konzentration, post-translationalen Modifikation und Funktion als auch die Veränderung der Tubulin-Isoformen führen zu erhöhten Resistenzraten in Tumoren (Cheung et al. 2009, Don et al. 2004).

Auch die Veränderung der Tubulin-Zusammensetzung verändert die Interaktion der Spindelgifte mit den Mikrotubuli. Die mindestens 13 unterschiedlichen Tubulin-Isoformen (6x  $\alpha$ - und 7x  $\beta$ -Tubulin) kommen in spezifischer Verteilung in unterschiedlichen natürlichen Geweben vor (Verdier-Pinard et al. 2003; Tabelle 9.2 im Anhang).

## 1 Einleitung

Insbesondere die physiologisch in Testes und neuronalen Geweben vorkommende Isoform  $\beta$ III-Tubulin wird mit Resistenzen in Lungen-, Ovarial-, Brust- und Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (Sève und Dumontet 2008). Während die Resistenzen in Paclitaxel-resistenten bzw. -abhängigen Zelllinien mit einer Erhöhung des  $\beta$ III-Tubulin-Anteils und einer erhöhten Tubulin-Dynamik einhergehen (Gonçalves et al. 2001), fanden sich in Zelllinien mit Resistenzen gegen Vinca-Alkaloide erniedrigte  $\beta$ III-Tubulin-Spiegel und ein höherer Anteil stabilerer Mikrotubuli (Kavallaris et al. 2001). Die Sensitivierung gegenüber Mikrotubuli-unabhängigen Zellgiften durch eine siRNA-vermittelte Ausschaltung von  $\beta$ III-Tubulin lässt auf einen zusätzlichen, Mikrotubuli-unabhängigen anti-apoptotischen Effekt schließen (Kavallaris 2010, Gan et al. 2010). Veränderte Bindungseigenschaften und Resistenzbildungen gegenüber Spindelgiften infolge von Tubulin-Mutationen wurden ebenfalls beobachtet (Natarajan und Senapati 2012).

Die Vermittlung von Resistenzen findet gehäuft auf Ebene der Apoptosekaskade statt, so z. B. in hämatologischen Malignomen durch Überexpression der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine (Zivny et al. 2010). Survivin, das zur Familie der Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Proteine gehört, ist mit wenigen Ausnahmen nicht in terminal differenzierten physiologischen Geweben detektierbar, wird jedoch in einer Reihe von Neoplasien exprimiert. Anders als andere IAPs inhibiert Survivin vor allem die mitochondriale und damit von Spindelgiften stärker ausgelöste Apoptosekaskade über eine Inhibition der Caspase-9 (Altieri 2003). Neben seiner antiapoptotischen Wirkung hat Survivin weitere Funktionen als Tubulin-Stabilisator in Zellteilung und -wachstum und vermittelt über diesen Effekt zusätzliche Resistenz gegenüber antimikrotubulären Therapien (Cheung et al. 2009).

### **1.2.5 Nebenwirkungen von Therapien mit Spindelgiften**

Neben den vielfältigen Resistenzmechanismen gegen antimikrotubuläre Zytostatika stellen ausgeprägte Nebenwirkungen und toxische Effekte nach wie vor ein großes Hindernis in der Entwicklung neuer Substanzen dar. Neben Platinderivaten, Bortezomib, Thalidomid und Epothilonen gehören Vinca-Alkaloide und Taxan-Derivate zu den häufigsten Ursachen chemotherapie-induzierter Neuropathien (CIPN). Diese äußern sich klinisch zumeist sensorisch mit initial häufiger auftretenden Negativ-Symptomen wie Hypaesthesien, vermindertem Vibrationsempfinden und reduzierten Muskeleigenreflexen und häufig später auftretenden Positiv-Symptomen wie Paraesthesien, Dysaesthesien oder Allodynien (Grisold et al. 2012). Die preferentielle Schädigung neuronaler Gewebe kann teilweise durch deren hohen Tubulin-Anteil erklärt werden (Carlson und Ocean 2011). Es wird zwischen der Schädigung von Axonen (Axonopathie), Ganglienzellen (Ganglionopathie) und Nervenscheiden (Myelinopathie) unterschieden. Bei bestehender Kontroverse über den dominierenden Schädigungsmechanismus wird heute eine initial zentripetal aufsteigende Axondegeneration im Sinne einer „umgekehrten“ Wallerschen Degeneration auf dem Boden gestörter axonaler Transportprozesse mit konsekutiver Schädigung der Schwann- und Ganglienzellen vermutet (Argyriou et al. 2008). Die hauptsächliche Schädigung sensibler

## 1 Einleitung

Neurone im Sinne einer Ganglionopathie wird als Folge der leichteren Zugänglichkeit für Zellgifte durch die fenestrierte Blut-Nerven-Schranke dorsaler Ganglien interpretiert. Motorische Ausfälle in Form von Muskelschwäche, Störungen der Feinmotorik und Stimmbandparalyse sind seltener; autonome Symptome wie Obstipation, Muskelspasmen und Harnretention treten ebenfalls seltener als sensorische Ausfälle und eher infolge der Therapie mit Vinca-Alkaloiden auf (Carlson und Ocean 2011).

Zur Charakterisierung Chemotherapeutika-induzierter Schmerzen stehen heute an der Lebensqualität des Patienten orientierte Fragebögen wie die CIPN20 der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) zur Verfügung. Dieser erfasst in insgesamt 20 Punkten in den Subkategorien sensorische, motorische und autonome Zeichen in 4-stufigen Likert-Skalen die subjektiven Symptome und Einschränkungen des Patienten (Postma et al. 2005).

Weitere häufig beobachtete Nebenwirkungen zytostatischer Therapien mit antimikrotubulären Substanzen umfassen Schwindel, Neutropenie, Thrombozytopenie oder Anämie infolge myelotoxischer Effekte, Hypersensitivitätsreaktionen wie Dyspnoe, Tachykardie oder Flush, Arthralgien und Myalgien (McGuire und William 1989).

Den in der konventionellen Chemotherapie verwendeten Substanzen ist gemein, dass sie aufgrund fehlender Selektivität neben Krebszellen auch körpereigene, physiologische Zellreihen in Ihrem Wachstum behindern. In der Entwicklung von Chemotherapeutika rücken demnach neben Potenz und Wirksamkeit vor allem die Spezifität für Tumorzellen und die Verringerung von Nebenwirkungen in den Fokus.

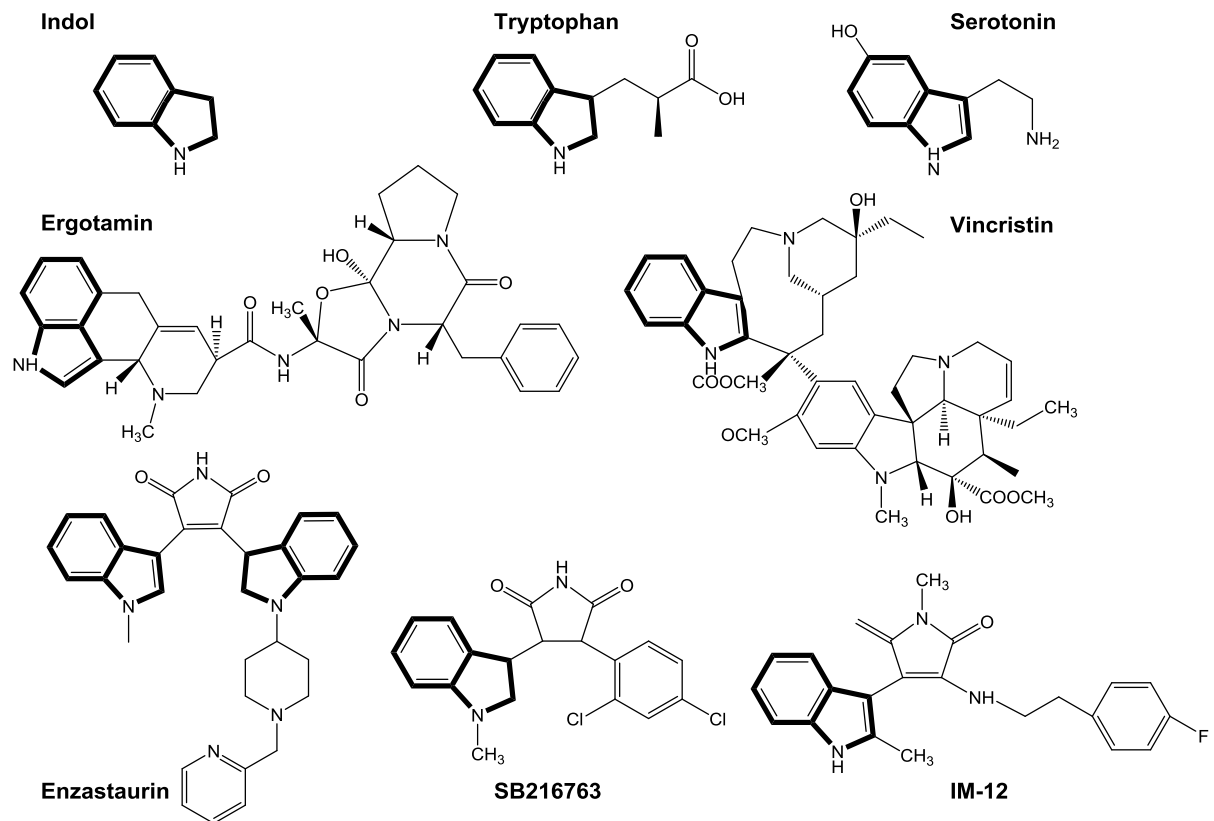
### **1.3 Indole in natürlichen und synthetischen Verbindungen**

Indolmotive finden sich in zahlreichen natürlichen, auch im menschlichen Organismus vorkommenden, chemischen Strukturen und sind u. a. Teil der essentiellen Aminosäure Tryptophan oder des Neurotransmitters Serotonin. Auch in aus Pflanzen isolierten Verbindungen, die seit langem therapeutisch Verwendung finden, lassen sich Indolmotive nachweisen, wie beispielsweise im Mutterkornalkaloid Ergotamin, das über die Bindung an Serotoninrezeptoren vasokonstriktorisch wirkt und bei akuter Migräne eingesetzt wird (Silberstein und McCrory 2003). Auch in komplexen Verbindungen wie beispielsweise dem Extrakt des Cathartus-Gewächses Vincristin, das klinisch als Spindelgift in der Therapie von Malignomen verwendet wird, findet sich ein Indolmotiv. Diesen Substanzen ist gemein, dass sie eine hohe biologische Wirksamkeit besitzen. Als eine mögliche Erklärung für die hohe biologische Potenz von Indolen diskutieren Ryan und Drennan die Tatsache, dass es sich bei diesen Substanzen um Sekundärmetabolite handelt (Ryan und Drennan 2009). Sekundärmetabolite spielen weder in anabolen noch in katabolen Prozessen eine Rolle und ermöglichen Austin et al. zufolge die evolutionäre Entwicklung in Tier- und Pflanzenspezies beispielsweise über die Fähigkeit Nischen zu besetzen (Austin et al. 2008). Anders als Primärmetabolite kommen diese nicht ubiquitär in der Natur vor sondern sind auf einzelne Spezies beschränkt. Die Sammlung und Nutzbarmachung natürlich vorkommender

## 1 Einleitung

Ressourcen beispielsweise als Heilmittel ist ein wesentliches Element der Medizin. Mit wachsenden technischen Möglichkeiten lassen sich zunehmend mehr natürlich vorkommende Motive in synthetische Strukturen, beispielsweise in Form niedermolekularer Strukturen integrieren. Bis-Indole wie Staurosporin, das aus einem Streptomyces-Stamm isoliert wurde (Tamaoki et al. 1986), sind hochpotente, wenn auch nicht selektive, Kinase-Inhibitoren. Enzaustaurin (LY317615), ein Bisindolylmaleimid, zeigte potente inhibitorische Wirkung auf die Protein-Kinase C, AKT und GSK3 $\beta$  und wurde in verschiedenen klinischen Studien mit wechselndem Erfolg eingesetzt (Herbst et al. 2007, Eli Lilly and Company 2006-2013). Coghlan et al. entdeckten Maleimid-Derivate als hochselektive Inhibitoren des Enzyms Glykogen-Synthase-Kinase 3 in seinen Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  (Coghlan et al. 2000). Die potenteste Verbindung, das Arylindolmaleimid SB216763, eine Fusion aus biologisch hochaktivem Indolmotiv und GSK3 $\beta$ -selektiver Maleimid-Struktur, inhibierte das Enzym mit einem IC<sub>50</sub> von 34nM. Auf Basis der Leitstruktur SB216763 wurde in der Studie von Schmöle et al. (Schmöle et al. 2010) eine Reihe weiterer Derivate erstellt, von denen neben Substanzen, die unerwarteterweise den  $\beta$ -Cateninspiegel senkten, nur die Substanz IM-12 mit SB216763 vergleichbare GSK3 $\beta$ -inhibitorische Effekte in neuralen Progenitorzellen zeigte. Beide Substanzen inhibierten das Wachstum der Progenitorzellen in einer Konzentration von 3 $\mu$ M signifikant während sie in höheren Dosen toxisch wirkten. Die hohe Bandbreite biologischer Wirkungen von Substanzen mit Indolmotiv zeigt weiterhin die Übersichtsarbeit von Brancale und Silvestri, in der eine Vielzahl niedermolekularer Verbindungen mit Indolkernen als Tubulininhibitoren mit nanomolaren IC<sub>50</sub>-Spektren in verschiedenen Krebszelllinien beschrieben werden (Brancale und Silvestri 2007). Die aufgeführten Studien belegen die hohe biologische Diversität und Potenz natürlicher und synthetischer Strukturen mit Indolmotiven.

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.6 Indolmotive in verschiedenen natürlichen und synthetischen Strukturen.** Der Indol-Anteil fett. Chemische Strukturen nach Recherche PubChem (National Center for Biotechnology Information).

### 1.4 Gezielte Krebstherapien

Vor dem Hintergrund der Vorstellung der Karzinogenese als Evolution von Krebszellen aus einem physiologischen Zellverband auf dem Boden einer Über- oder Unteraktivierung von genetischen Informationen entstand der Therapieansatz sogenannter „Targeted Therapies“. Da in Tumorzellen das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Signalkaskaden im Vergleich zu physiologischen Zellen hochgradig verschoben ist und der Erhalt des Tumorgewebes stärker von der Aktivität einzelner Bestandteile dieser Netzwerke abhängt, wirkt eine gezielte Blockierung einzelner Proteine selektiv auf Krebszellen (Weinstein 2002).

Benson et al. (Benson et al. 2006) teilen die gezielten Therapien in 4 Kategorien ein: im ersten Ansatz werden onkogene Signalwege, die für den Erhalt der Tumorzellen zwingend erforderlich sind, direkt unterbrochen. Ein Beispiel ist die Inhibition der permanent aktiven Tyrosinkinase, die als Produkt des Fusionsgens BCR/ABL entsteht, durch den inhibitorischen Antikörper Imatinib in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) (Sawyers 1999). Die zweite Kategorie fokussiert Mutationen, die nur in Kombination zur Ausprägung eines Tumorphänotyps führen: so wirkt beispielsweise die Überaktivierung von MYC in der Lymphomgenese nicht nur proliferationsfördernd, sondern auch proapoptisch. Ohne die Ko-Aktivierung des anti-apoptotischen Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs führt diese zum Untergang der Zellen. Dieser Ansatz birgt zukünftig therapeutische Optionen (Sander et al. 2012). Als dritte Kategorie bezeichnen Benson et al.

## 1 Einleitung

therapeutische Ziele in Abhängigkeit der Gewebezugehörigkeit der Tumorzellen: so bindet der gegen CD20 gerichtete Antikörper Rituximab spezifisch an B-Zellen und führt zur Induktion der Apoptose und zur komplement- und zellvermittelten Zytotoxizität in malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe, jedoch ebenfalls in physiologischen B-Zellen. Rituximab wird klinisch als Ergänzung zu konventionellen Chemotherapieregimen eingesetzt (McLaughlin et al. 1998). Die vierte Kategorie fokussiert das Tumormilieu, im Speziellen die Vaskularisation des Tumorgewebes, da die Induktion tumoreigener Gefäße für das Wachstum solider Tumoren einen vulnerablen Eckpfeiler darstellt (Kerbel und Folkman 2002). Die Neo-Vaskularisation kann direkt durch Angiogenese-Inhibitoren wie Endostatin (O'Reilly et al. 1997) oder indirekt durch Bindung und Inhibition der Funktion angiogener Proteine wie VEGF durch Antikörper wie Bevacizumab (Ferrara et al. 2004) unterbrochen werden. Zur gezielten Antagonisierung der oben genannten Ziele kommen insbesondere monoklonale Antikörper und niedermolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 800 Dalton (sogenannte small molecules) zum Einsatz (Imai und Takaoka 2006). Niedermolekulare Substanzen wirken häufig als ATP-kompetitive Inhibitoren von Tyrosinkinasen, wie die Substanz Imatinib als Inhibitor der Tyrosinkinase BCR/ABL in der Therapie der CML (O'Dwyer et al. 2003). Während monoklonale Antikörper eine hohe Selektivität aufweisen, sind sie anders als niedermolekulare Substanzen aufgrund ihres relativ hohen Molekulargewichts (ca. 150 kDa) zumeist nicht in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und zumeist nicht für orale Darreichungsformen geeignet (Imai und Takaoka 2006).

### **1.5 GSK3 $\beta$ als Ziel in der Chemotherapie**

Die Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK3) wurde erstmals 1980 als Insulin-gesteuerter Inhibitor der Glykogen-Synthase beschrieben (Embi et al. 1980). Das Enzym kommt in Säugetierzellen ubiquitär in seinen Isoformen GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  vor, von denen die GSK3 $\beta$ -Isoform deutlich intensiver untersucht wurde und die im Folgenden, sofern nicht anders genannt, betrachtet werden soll (Plyte et al. 1992). GSK3 $\beta$  wirkt über die Phosphorylierung seiner Zielproteine zumeist als Repressor durch Initiierung des Ubiquitinationsprozesses oder durch Veränderung der Bindungsaktivitäten der Zielstrukturen (Grimes und Jope 2001). Die Vielzahl der Zielproteine, die neben Struktur- und Signalproteinen wie Mikrotubuli (Zhou 2005) auch Transkriptionsfaktoren wie  $\beta$ -Catenin, NFAT, AP-1, myc oder c-Jun umfasst, erklärt die zentrale Rolle dieses Enzyms sowohl im Rahmen des Zellstoffwechsels als auch in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen (Grimes und Jope 2001). Da eine umfassende Darstellung über den Rahmen dieser Arbeit hinausginge, wird auf vorliegende Übersichtsarbeiten verwiesen (Grimes und Jope 2001, Frame et al. 2001, Doble und Woodgett 2003) und im Folgenden die Rolle von GSK3 $\beta$  in der Onkogenese näher betrachtet. Der Aktivitätsgrad der konstitutiv aktiven Kinase wird über die Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäuren vermittelt: die Phosphorylierung an Serin9-Residuen, beispielsweise insulinvermittelt im Rahmen des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs durch Proteinkinase B (Akt) wirkt inhibitorisch (Cross et al. 1995). Die Phosphorylierung an

## 1 Einleitung

Tyrosin216-Residuen, beispielsweise im Rahmen neurodegenerativer Prozesse, wirkt stimulatorisch (Dajani et al. 2001, Bhat et al. 2000). Im Rahmen des kanonischen Wnt-Signalwegs führt die Bindung von Wnt-Liganden über die Rekrutierung von Axin und GSK3 an die Zellmembran zur räumlichen Trennung der Kinase und ihres Ziels und somit zur Inhibition der GSK3-vermittelten Phosphorylierung von  $\beta$ -catenin. Das Signalprotein akkumuliert infolge fehlender Ubiquitin-Degradation und kann nach Translokation in den Nukleus Ziele des Wnt-Signalwegs aktivieren (Peifer 2000, Grimes und Jope 2001).

Als negativer Regulator von  $\beta$ -catenin innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs, dessen Aktivierung zur Expression onkogener Proteine wie c-myc, Cyclin D, Survivin oder VEGF (Polakis 2012) führt, wäre für GSK3 $\beta$  eine Rolle als Tumorsuppressor zu erwarten. Ferner reguliert das Enzym die Stabilität von Onkoproteinen wie c-myc durch Phosphorylierung direkt (Gregory et al. 2003). Aufgrund dieser potentiell karzinogenen Nebenwirkungen wird der Einsatz GSK3 $\beta$ -inhibitorischer Substanzen in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen oder Diabetes nach wie vor kontrovers diskutiert (Cohen und Goedert 2004).

Die Überaktivierung von Wnt-Zielgenen infolge einer APC-Mutation und daraus resultierender Akkumulation von  $\beta$ -Catenin ist eine weithin akzeptierte Grundlage der Tumorigenese in Kolonkarzinomen, diese ist jedoch nicht mit einer Inhibition oder Mutation von GSK3 $\beta$  vergesellschaftet (Sparks et al. 1998). Gegenteilig konnten Shakoori et al. zeigen, dass die Überexpression der stimulierten Form von GSK3 $\beta$  (P-Tyr216) mit stärkerer Proliferation und niedrigeren Apoptoserate in Kolonkarzinom-Zelllinien einhergeht (Shakoori et al. 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass die genetische und pharmakologische Inhibition von GSK3 $\beta$  eine Induktion der Apoptose und verminderte Proliferationsraten bedingen. Die Überexpression der stimulierten Form und damit die Etablierung von GSK3 $\beta$  als eigenständiger onkogener Faktor wurde in einer Reihe weiterer Tumoren, darunter Pankreas-Karzinome, Glioblastome und Leukämien, gezeigt (siehe Tabelle 9.1 im Anhang).

Die onkogene Wirkung von GSK3 $\beta$  wird zumeist auf eine Deregulation durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen inaktivierter (P-Ser9) und stimulierter Form (P-Tyr216) zurückgeführt. Diese wirken im Zusammenspiel mit einem konstitutiv aktiven NF $\kappa$ B-Signalweg auf zytosolischer (Wilson und Baldwin 2008) bzw. transkriptioneller Ebene (Ougolkov et al. 2007, Hoeflich et al. 2000). Ferner wird die Destabilisierung Cyklin-abhängiger Kinase-Inhibitoren (CDKI) wie p21, p27 oder p15 und die Destabilisierung von p53 durch Promotion seines Antagonisten Mdm2 (Ghosh 2005, Miyashita et al. 2009) diskutiert.

Während die vorliegenden Berichte in ihrer Vielzahl für eine Zellkontext-spezifische tumorfördernde Wirkung von GSK3 $\beta$  sprechen und damit die Inhibition dieser Kinase in den Fokus therapeutischer Ansätze rücken, muss die GSK3 $\beta$ -Inhibition als potentielle Unterdrückung eines Tumor-Suppressors kritisch diskutiert werden:

Ma et al. beschreiben eine kanzerogene Wirkung von GSK3 $\beta$  in epidermalen Mauszellen, die als Modell für die Entstehung von Hautkrebs etabliert sind (Ma et al. 2007). Hier weisen promotionsgefährdete JB6+-Zellen deutlich niedrigere GSK3 $\beta$ -Spiegel als nicht



## 1 Einleitung

promotionsgefährdete JB6- -Zellen auf. Die Tumorigenese erfolgt dabei über die EGF-/TPA vermittelte Aktivierung von Protein-Kinase-C (PKC) bzw. des PI3K-Signalswegs, die daraus folgende Inaktivierung von GSK3 $\beta$  an Serin9 und den damit entfallenden negativ regulatorischen Einfluss von GSK3 $\beta$  auf den Transkriptionsfaktor Activated Protein-1 (AP-1) (Dong 1994). In seiner weitestgehend repressorischen Funktion reduziert GSK3 $\beta$  weiterhin unter anderem Mcl-1, ein anti-apoptotisches Protein der Bcl2-Proteinfamilie, das inhibitorisch auf den mitochondrialen Apoptose-Signalweg wirkt (Cuconati 2003). Eine Resistenz gegen pro-apoptotische Signale durch Überexpression von Mcl-1 findet sich in einer Reihe von Neoplasien wieder (Zhou 2001). GSK3 $\beta$  kann hohen Mcl-1-Spiegeln durch Phosphorylierung und konsekutive Degradation entgegenwirken und korreliert in seiner Aktivität invers mit den Mcl-1-Spiegeln in verschiedenen Neoplasien (Ding et al. 2007). Ferner wurde die Überexpression von Erb2 (epidermal growth factor receptor; auch: HER2/neu) in Mammakarzinomen mit einer verstärkten Serin9-vermittelten Inhibition von GSK3 $\beta$  und der daraus folgenden Stabilisierung hoher Mcl-1-Spiegel in Verbindung gebracht (Henson et al. 2006, Ding et al. 2007).

Während die aufgeführten Berichte auf eine tumorsuppressive Wirkung von GSK3 $\beta$  hinweisen, finden sich bis dato keine Berichte über eine tumorfördernde Wirkung von GSK3 $\beta$ -Inhibitoren in vivo. Wenn auch eher pragmatisch orientiert, so zeigt die Arbeit von Cohen et al. eine niedrigere Gesamtinzidenz von Tumoren bei Patienten, die unter psychiatrischen Gesichtspunkten über einen Zeitraum zwischen 1 und 18 Jahren mit dem GSK3 $\beta$ -Inhibitor Lithiumchlorid behandelt wurden (Cohen et al. 1998). Dieser Bericht muss kritisch betrachtet werden, da die erreichten Wirkstoffkonzentrationen möglicherweise nicht zu einer signifikanten Inhibition von GSK3 $\beta$  führten und die eingeschlossenen Patienten als multimedikamentös behandelte Kohorte nicht repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung sind. Nichtsdestoweniger kann sie als Hinweis auf das Fehlen tumorigener Effekte von GSK3 $\beta$ -Inhibitoren hinweisen. Eine mögliche Ursache könnte die fehlende Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in physiologischen und nicht transformierten Geweben darstellen (Ring et al. 2003). So führt die physiologische Inhibition des Enzyms im Rahmen des Insulin-Stoffwechsels nur zu einer Aktivitätsminderung von ca. 50% und resultiert nicht in einer  $\beta$ -Catenin-Akkumulation. Hinweisend auf eine mögliche Aufrechterhaltung der tumorsuppressiven Wirkung des Enzyms durch die Isoform GSK3 $\alpha$  sind die unveränderten  $\beta$ -Catenin-Level in GSK3 $\beta$ -defizienten Mäusen (Hoefflich et al. 2000). Eine Inhibition von GSK3 $\beta$  bliebe somit ohne negative Konsequenz für physiologische Gewebe, würde jedoch selektiv abhängige neoplastische Zellen schädigen.

Eine Reihe von Studien hat die Vermittlung einer antineoplastischen Wirkung durch GSK3 $\beta$ -Inhibitoren gezeigt; ob die Verwendung dieser Substanzen in der Chemotherapie eine sichere Option auch für Langzeittherapien darstellt, muss weiter untersucht werden.

### **2 Zielstellung**

In der Entwicklung neuer Therapieansätze für Krebserkrankungen rücken zunehmend Individualisierung und Reduktion von Nebenwirkungen in den Vordergrund. Dazu werden in der Chemotherapie insbesondere niedermolekulare Substanzen, sogenannte small molecules, zur Inhibition spezifischer Signalwege oder zur Optimierung konventioneller Therapieansätze entwickelt. Indolylmaleimide wurden als Inhibitoren der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und Promotoren des Wnt-Signalwegs bereits in ihrer differenzierenden und anti-apoptotischen Wirkung in neuralen Progenitorzellen charakterisiert (Castelo-Branco et al. 2004, Lange et al. 2011). In der Arbeit von Schmöle et al. fielen die Derivate der Leitsubstanz SB216763 neben einer differenzierungsfördernden Wirkung durch eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität neuraler Progenitorzellen auf (Schmöle et al. 2010). Während SB216763 und sein Derivat IM-12 signifikant die Proliferationsaktivität, jedoch nicht die Zellvitalität reduzierten, fiel das Derivat PDA66 durch eine nicht allein über eine Inhibition der GSK3-Aktivität erklärbare zytotoxische Wirkung auf. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur PDA66 als Leitmotiv für die Substanzgruppe der Indolylmaleimide in seiner antiproliferativen Wirkung näher charakterisiert. Dabei sollte zunächst der zugrundeliegende zytotoxische Mechanismus ermittelt werden und die Substanz in der Folge und vor dem Hintergrund einer möglichen Verwendung als Chemotherapeutikum im Vergleich mit klinisch eingesetzten Zellgiften mit verwandtem Wirkungsmechanismus in verschiedenen Krebszelllinien untersucht werden.

Folgende Aspekte wurden in diesem Zusammenhang näher untersucht:

- Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der antiproliferativen und zytotoxischen Wirkung von PDA66 in hNPZ
- differentielle Inhibition des Metabolismus in proliferierenden und differenzierten hNPZ
- Einfluss der Behandlung mit PDA66 auf den Zellzyklus in hNPZ
- Apoptoserate in hNPZ unter Behandlung mit PDA66
- $\beta$ -catenin-Akkumulation in hNPZ nach PDA66-Behandlung im Vergleich zu Behandlung mit SB216763 und IM-12
- Polymerisation von Mikrotubuli in Anwesenheit von PDA66, SB216763, IM-12 und Veränderung des Zytoskeletts in hNPZ nach PDA66-Behandlung
- Ermittlung der Potenz von PDA66 über Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der antiproliferativen Wirkung im Vergleich mit Paclitaxel, Vinblastin und Nocodazol in hNPZ sowie den Krebszelllinien A549 und B16F10
- Verträglichkeitstestung in CR CD1-Mäusen bei intraperitonealer PDA66-Applikation
- Antiproliferative Potenz weiterer PDA66-Derivate in den Krebszelllinien A549 und SW480

### **3 Materialien und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Geräte**

Für eine genaue Aufstellung der Geräte siehe Tabelle 9.1.4 im Anhang.

##### **3.1.2 Chemikalien**

In der Routine verwandte Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, über die Vertreiber Calbiochem, CarlRoth, Fluka, Merck oder Sigma-Aldrich mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ erworben.

##### **3.1.3 Verbrauchsmaterialien**

Für eine genaue Aufstellung der Verbrauchsmaterialien siehe Tabelle 9.1.4 im Anhang.

##### **3.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze**

Für eine genaue Aufstellung siehe Tabelle 9.1.5 im Anhang.

##### Trypsin-Benzonase-Lösung

25 U/ml Benzonase in Trypsin/EDTA

##### Trypsin-Inhibitor-Benzonase-Lösung

1% HSA, 25U/ml Benzonase, 0.55mg/ml Trypsin-Inhibitor in DMEM/F12

---

##### RIPA-Puffer (Lysepuffer für die Proteinextraktion)

20 mM Tris pH 7.4

137 mM NaCl

0,1% SDS

0,1% Natriumdesoxycholat

1% Triton X-100

10% Glycerol

2 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM NaF

20 mM Natriumpyrophosphate

Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Roche; Mannheim)

##### PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **3.1.5 Antikörper**

##### Primärantikörper

anti-alpha-Tubulin; monoklonal, Maus; T9026; Sigma-Aldrich; Hamburg

##### Zweitantikörper

AlexaFluor 568; goat-anti-mouse; A-11004; Invitrogen, Darmstadt

#### **3.1.6 Reaktionskits**

Name	Artikel-Nummer	Vertrieb	Sitz
Bicinchoninicinsäureassay	23225	Pierce, Thermoscientific	Rockford, USA
WST1-Kit	0501-5944-001	Roche	Mannheim, Deutschland
Tubulin-Polymerization Assay	BK004P	Cytoskeleton	Denver, USA

**Tabelle 3.4 Reaktionskits**

#### **3.1.7 Software**

Durchflusszytometrie: CellQuest Pro Version 5.1, BD Bioscience

Plattenleser: Magellan Data Analysis Software, Tecan

Statistische Auswertung: Prism 5, GraphPad

Bildbearbeitung: Graphics Suite X6, CorelDraw

Strukturformeln: ChemDraw Pro 13.0 (Testversion), PerkinElmers

Datensicherung, -bearbeitung: Office 2003 (Excel, Word, PowerPoint), Microsoft

Literaturrecherche: NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Zellkultur**

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter Zusatz von 5000U/ml Penicillin und 5000µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zu 50ml Medium kultiviert. Für die Dauerkulturen der humanen neuronalen Progenitorzellen sowie der Krebszelllinien wurden getrennte Inkubatoren verwendet. Alle Dauerkulturen wurden entweder mit Erreichen der Passage 30, dem Auftreten veränderter Wachstumscharakteristika, einer veränderten Morphologie oder offensichtlicher Verunreinigung verworfen.

Für alle adhärenen Zelllinien wurde in einem Waschschriff das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit warmem Waschmedium (HBSS) bedeckt, die Waschsubstanz erneut abgesaugt und neues Kulturmedium zugegeben. Für Zelllinien in Suspensionskultur bedeutete ein Waschschriff die Zentrifugation der Zellsuspension mit 415g bei Raumtemperatur für 5min., die anschließende Absaugung des Überstands und Resuspension des Zellpellets in warmem Waschmedium. Nachfolgend wurden die Zellen erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und schließlich in frischem Medium resuspendiert.

### 3 Materialien und Methoden

Alle adhären wachsenden Zelllinien wurden zur Ablösung vom Boden des jeweiligen Kulturgefäßes mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Dabei trennt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EDTA die Zell-Zell-Verbindungen, während die Pankreasprotease Trypsin die Zell-Matrix-Verbindungen trennt (Gstraunthaler 2008). Die Ablösung der adhären Zellen vom Gefäßboden wurde jeweils mikroskopisch, erkennbar über eine Abrundung und Vereinzelung der Zellen, kontrolliert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte im Falle der hNPC mit Trypsin-Inhibitor/Benzonase-Lösung und im Falle der Krebszelllinien mit serumhaltigem Zellkulturmedium im doppelten Volumen der verwendeten Trypsin-Lösung.

Der Arbeitsschritt „Ablösung der adhären Zellen“ beinhaltet jeweils die Absaugung des Mediums, einen Waschschrift mit HBSS, die Abstopfung der Reaktion sowie einen abschließenden Zentrifugationsschrift. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angeführt, in 15ml Zentrifugenröhrchen mit 415g bei Raumtemperatur für 5min. durchgeführt. Nachfolgend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert.

Alle Dauerkulturen wurden zweimal wöchentlich (jeweils im 4 Tages- bzw. 3 Tagesabstand) subkultiviert und mit frischem Medium in neue Kulturgefäße überführt.

#### **3.2.1.1 Kultur der humanen neuralen Progenitorzellen**

Als Modellsystem für das Screening verschiedener Derivate sowie für die Experimente zur Untersuchung der biologischen Effekte von PDA66 wurde die humane neurale Progenitorzelllinie ReNcell VM der Firma ReNeuron (Guildford, UK) mit Vertrieb durch Millipore (Schwalbach, Deutschland) verwendet. Die Zellen stammen aus dem ventralen Mittelhirn eines 10-wöchigen humanen Fötus und wurden retroviral mit v-myc immortalisiert. Die Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit zur neuralen trilinearen Differenzierung in Astrozyten, Oligodendrozyten sowie Neurone (Donato et al. 2007). In B27-Zellmedium unter Zusatz der beiden Wachstumsfaktoren basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Epidermal Growth Factor (EGF), nachfolgend als Proliferationsmedium bezeichnet, wachsen die Zellen gleichmäßig mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von ungefähr 16h. Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen nach vorherigem Waschrift in wachstumsfaktorfreiem Medium weiterkultiviert.

Die adhären wachsenden Progenitorzellen (Laminin, Trevigen, Gaithersburg, USA) wurden bei 5%  $\text{CO}_2$  Luftanteil und 37°C auf laminiertem Untergrund kultiviert. Zur Beschichtung mit Laminin wurden die Böden der Kulturgefäße jeweils für eine Stunde bei 37°C mit Lamininlösung (1:100 in kaltem DMEM/F12) bedeckt. Vor Aussaat der Zellen wurde die Lösung entfernt und ein Waschschrift mit HBSS (siehe oben) durchgeführt.

Die VM-Zellen wurden in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen dauerkultiviert und bei jeweils 80-85%-iger Konfluenz passagiert..

#### **3.2.1.2 Kultur der A549-Zellen**

Als Krebszelllinie wurde die von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA; CCL-185) erworbene Lungenkarzinomlinie A549 verwendet. Die A549-Krebszelllinie ist ein weitverbreitetes Modellsystem zur Untersuchung antineoplastischer Substanzen und ist Teil des 60-Zelllinien-Screeningsystems des US National Cancer Institute (Shoemaker 2006).

Die adhärenenten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in DMEM, versetzt mit 10% FKS und 4,5g/l Glucose, dauerkultiviert. Bei kontinuierlichem Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 30h erfolgte die Passagierung ab einer Konfluenz von ca. 85-90%..

#### **3.2.1.3 Kultur der SW480-Zellen**

Die von der ATCC (Manassas, USA; CCL-228) erworbene Zelllinie SW480 entstammt einem Adenokarzinom des Kolons und ist ein weit verbreitetes Modell für Untersuchungen zu Kolon-Karzinomen.

Die adhärenent wachsenden Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in DMEM, versetzt mit 10% FKS und 4,5g/l Glucose dauerkultiviert. Bei kontinuierlichem Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 35h erfolgte die Passagierung ab einer Konfluenz von ca. 85-90% zweimal wöchentlich.

#### **3.2.1.4 Kultur der Hep G2-Zellen**

Als Modell für einen Lebertumor wurde die Krebszelllinie Hep G2 von der ATCC (Manassas, USA; HB-8065) erworben.

Die Krebszelllinie wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in DMEM, versetzt mit 10% FKS und 4,5g/l Glucose dauerkultiviert. Die Zellen wuchsen adhärenent einschichtig mit der Tendenz zur Bildung mehrschichtiger Zellballen in höheren Konfluenzgraden mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von ca. 40h. Die Dauerkultur wurde mit Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% zweimal wöchentlich nach einem Waschschrift passagiert und in definierter Zellzahl erneut ausgesät.

#### **3.2.1.5 Kultur der Jurkat-Zellen**

Die T-ALL-Zelllinie Jurkat, auch als „JM“ bezeichnet, wurde als Modell für eine hämatologische Krebszelllinie von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland; ACC-282) erworben. Die T-Zell-Rezeptor-positiven Zellen entstammen dem peripheren Blut eines männlichen Spenders mit einer akuten lymphatischen Leukämie der T-Zellen und sind in Experimenten zur Apoptose und in der Testung antineoplastischer Substanzen ein etabliertes Tumormodell.

Die Jurkat-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen dauerkultiviert. Die Zellen wuchsen als Suspensionskultur in RPMI 1640-Medium versetzt mit 10%FKS und 2mM L-Glutamin mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 38h.

### 3 Materialien und Methoden

Die Jurkat-Zellen wurden entsprechend den Hinweisen des Vertreibers bei einer Zellzahl zwischen  $10^5$  und  $10^6$  Zellen subkultiviert.

#### **3.2.1.6 Kultur der MCF-7-Zellen**

Die Krebszelllinie MCF-7 entstammt der Pleuraflüssigkeit eines metastasierten Adenokarzinoms der Mamma und ist ein weit verbreitetes in vitro-Modell zur Substanztestung in Mammakarzinomen. Die Zelllinie wurde von der ATCC (Manassas, USA; HTB-22) erworben.

Die Östrogen-Rezeptor-positiven Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil als adhärenente Zellen in T75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen dauerkultiviert. Als Kulturmedium wurde Minimal Essential Medium Eagle (MEM) versetzt mit 10% FKS verwendet. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von ca. 30h und wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% subkultiviert.

#### **3.2.2 Experimente zur Zellproliferation**

Alle Zellzahlbestimmungen wurden mit dem Casy Model TT® der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mittels der „Electric Current Exclusion®“-Methode: Unter der Annahme, dass vitale Zellen mit einer intakten Membran einen größeren Widerstand im elektrischen Feld besitzen als Zelldetritus, erfolgte nach vorheriger Kalibrierung auf die Zellgröße in µm die Messung der Zellzahl pro ml. Weiterhin wurde die Vitalität als prozentualer Anteil der Zellen mit der zu erwartenden Zellgröße gegenüber allen gemessenen Zellpartikeln angegeben. Die Messung erfolgte mit 50µl Zellsuspension (ggf. nach vorheriger Ablösung adhärenenter Zellen) in 10ml isotoner CASYton®-Lösung (Verdünnung 1:200).

Während für die Ausgabe einer Zellzahlmessung drei Bestimmungen durch das Zellzählgerät automatisch interpoliert werden, wurden die Zellzahlen für jeden gemessenen Parameter aus drei unterschiedlichen Wells bestimmt.

Die Zellzahl zur Aussaat wurde für alle Zelllinien so festgelegt, dass in Abhängigkeit von Verlusten beim Aussäen, Verdopplungszeit und kontaktabhängigem Wachstum ca. 80% Konfluenz in den mit DMSO als Kontrollsubstanz behandelten Proben erreicht werden konnten. Als Orientierung galten dabei die in eigenen Versuchen ermittelten und durch den Vertreiber angegebenen Verdopplungszeiten.

<b>Zelllinie</b>	<b>Startzellzahl (Zellen/well)</b>	<b>Verdopplungszeit (h)</b>
hNPC	10000	16
SW480	20000	35
B16-F10	5000	15
A549	10000	30
Jurkat	250000	40
HepG2	30000	30

**Tabelle 3.5 Verdopplungszeiten und Startzellzahlen der verwendeten Zelllinien**

### 3 Materialien und Methoden

Der Wechsel auf Medium mit Zusatz von Kontroll- und Testsubstanzen 24h nach Aussaat der Zellen wurde jeweils als 0h-Zeitpunkt bezeichnet.

Alle Zelllinien wurden für die Versuche zur Zellproliferation in 48-well-Platten kultiviert, mit Ausnahme der HepG2-Zellen, die in 6-well-Platten kultiviert wurden, um eine mögliche Aggregation der Zellen zu minimieren.

#### **3.2.2.1 Proliferationskinetiken**

Für die Versuche zur Proliferationskinetik erfolgte die Bestimmung der Zellzahl zum 0h-Zeitpunkt, nach 24; 48 und 72h. Das Wachstum wurde auf die Zellzahl zum 0h-Zeitpunkt normiert und als Vielfaches dieses Wertes angegeben. Die Berechnung der Verdopplungszeit erfolgte unter Annahme eines exponentiellen Wachstums nach der Formel

$$t_D = \ln 2 / k$$

( $t_D$  = Verdopplungszeit;  $\ln$  = natürlicher Logarithmus;  $k$  = Wachstumskonstante)

Zur Bestimmung des  $IC_{50}$  wurden die zum 72h-Zeitpunkt gemessenen Zellzahlen nach der eingesetzten Konzentration aufgetragen im Rahmen einer logarithmischen Dosis-Wirkungskurve aufgetragen und durch das Statistikprogramm Graphpad Prism extrapoliert.

#### **3.2.2.2 Expositionszeit**

In den Versuchen zur Expositionszeit wurden die Zellen für 0; 3; 6; 16 oder 24h in Medium versetzt mit 3 $\mu$ M PDA66 kultiviert und nach einem Waschschrift mit PDA66-freiem Medium bedeckt. Nach insgesamt 72h wurde die Gesamtzellzahl bestimmt.

#### **3.2.2.3 Vergleich in verschiedenen Krebszelllinien**

Um die antiproliferativen Effekte der Testsubstanzen auf verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Wachstumscharakteristika zu vergleichen, wurde die Zellzahl zum 72h-Zeitpunkt bestimmt und auf die Zellzahl der Kontrolle (DMSO-behandelte Zellen) normiert.

#### **3.2.3 Bestimmung der metabolischen Aktivität mit dem WST1-Versuch**

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit Hilfe des Cell Proliferation Reagent WST-1 der Firma Roche (Mannheim, Deutschland), im Folgenden kurz als WST-Assay bezeichnet. In diesem Versuchsaufbau wurde die Reduktion des Tetrazolium-Salzes WST-1 zu einem farbigen Formazan-Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Da die Reduktion der Testsubstanz nur in vitalen Zellen mit intaktem Metabolismus erfolgt, kann der WST-Assay als Maß für die Zellvitalität genutzt werden. Dabei kann dieser Versuch allein nicht zwischen einer Verminderung der Spaltung des Tetrazolium-Salzes durch eine alleinige Verminderung des Metabolismus oder durch einen, ggf. zusätzlichen, zytotoxischen Effekt und die daraus resultierende geringere Zellzahl



### 3 Materialien und Methoden

unterscheiden. Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse der Zellproliferationsexperimente lassen sich jedoch rein zytostatische von zytotoxischen Effekten über den WST-1-Versuch trennen. Alle Experimente zur WST-1-Reduktion erfolgten in Zellkulturplatten mit 96 wells. Dabei wurden die Zellen jeweils so ausgesät, dass zum Messzeitpunkt eine Konfluenz von 80-85% in der mit DMSO behandelten Kontrolle erreicht werden konnte. Zum Messzeitpunkt wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und mit jeweils 100µl frischem Medium bedeckt. Im Anschluss wurde WST-1-Lösung in einem Volumen von 10µl (Verdünnung 1:10) hinzugegeben und die Zellen 1h inkubiert. Die Messungen erfolgten bei 37°C in einem Photometer der Firma Tecan (Tecan500, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 420nm gegen eine Referenzwellenlänge von 600nm. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die gemessenen Absorptionswerte gegen die DMSO-Kontrolle normiert.

#### **3.2.3.1 WST1-Spaltung in proliferierenden Zellen**

Die hNPZ wurden in einer Konzentration von 10 000 Zellen pro well ausgesät, für 24h in Proliferationsmedium belassen und anschließend, nach einem vorherigen Waschschrift, mit Proliferationsmedium versetzt mit Kontroll- und Testsubstanzen bedeckt. Dieser Zeitpunkt wird im Folgenden als Zeitpunkt „0h“ bezeichnet.

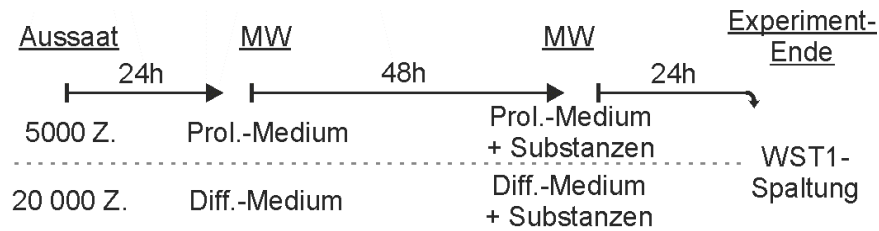
Um eine Kinetik des Metabolismus über die Zeit zu ermitteln, wurde die WST-1-Reduktion nach einer Behandlungszeit von 24-, 48- und 72h bestimmt. Da der inhibitorische Effekt nach 72h am stärksten ausfiel, wurde die IC<sub>50</sub>-Bestimmung nach 72-stündiger Behandlung mit PDA66-Konzentrationen zwischen 100nM und 6µM durchgeführt.

#### **3.2.3.2 WST1-Spaltung bei Mediumwechsel**

Um eine eventuelle Abschwächung der antiproliferativen Wirkung unserer Testsubstanzen durch einen Zerfall oder Verbrauch der Substanzen über die Zeit zu erkennen und gegebenenfalls minimieren zu können, wurde das Zellmedium samt Test- und Kontrollsubstanzen alle 24h nach vorherigem Waschschrift erneuert und die WST1-Reduktion nach 72h bestimmt.

#### **3.2.3.3 WST1-Spaltung in differenzierten Zellen**

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf proliferierende und differenzierte Zellen zu diskriminieren, wurde die Fähigkeit der hNPZ zur schnellen Differenzierung genutzt: Zum Zeitpunkt 0h wurde in einem Teil der Kulturen durch Entzug der Wachstumsfaktoren die Differenzierung induziert, während die Kontrollkulturen lediglich mit frischem Proliferationsmedium bedeckt wurden. Nach 48h wurden sowohl differenzierte als auch proliferierende Zellen mit frischem Differenzierungs- bzw. Proliferationsmedium versetzt mit Kontroll- und Testsubstanzen bedeckt. Der zytotoxische Effekt wurde nach 24-stündiger Behandlung gemessen.



**Abbildung 3.1 Behandlungsschema differenzierte hNPZ**

### 3.2.4 Proteinbestimmungen

#### 3.2.4.1 Proteinquantifizierung

Zur Lysierung wurden die Zellen nach einem Waschschrift für 15min. mit eiskaltem RIPA-Puffer und einer darin enthaltenen Protease- und Phosphatase-Mischung (Roche, Mannheim, Deutschland) behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C für 5min. mit 415g zentrifugiert und der Überstand für weitere Analysen verwendet. Der Proteingehalt der Gesamtzelllysate wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Assay (BCA<sup>TM</sup>, Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt. Das Testprinzip beruht auf der Reduktion zweiwertiger zu einwertigen Kupfer-Ionen im Rahmen der Biuret-Reaktion mit Proteinen. Bicinchoninsäure formt mit einwertigen Kupfer-Ionen einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 562nm gemessen werden kann und mit steigender Proteinkonzentration linear wächst. Über eine Eichkurve kann die Proteinkonzentration der Probe ausgelesen werden.

#### 3.2.4.2 Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)

Die Bestimmung des Gesamt- $\beta$ -Catenin-Gehalts in differenzierenden Progenitorzellen erfolgte mit dem Human Total  $\beta$ -Catenin ELISA DuoSet IC System (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Im Sinne eines „Sandwich“-Prinzips wurden Mikrotiterplatten mit 96 wells (Nunc, Langenselbold, Deutschland) über Nacht mit 100 $\mu$ l/well Capture Antikörper beschichtet. In die wells wurden 15 $\mu$ g Protein aus Gesamtzelllysate gegeben, so dass  $\beta$ -Catenin an den immobilisierten Antikörper binden konnte. Über mehrere Waschschrte wurden ein biotynilierter Detektionsantikörper sowie Streptavid-Horseradish-Peroxidase und schlussendlich ein Farbsubstrat hinzugegeben. Während alle ungebundenen Zellbestandteile im Rahmen der Waschschrte ausgewaschen wurden, konnte die Menge an gebundenem  $\beta$ -Catenin als Funktion des gebundenen Detektionsantikörpers über eine Eichgerade gemessen werden. Die Bestimmung der Detektionsantikörperbindung erfolgte mit einem Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland) über eine Extinktionsmessung bei 405nm mit einer Korrekturwellenlänge von 570nm.

Die hNPZ wurden so ausgesät, dass Sie 24h nach Aussaat eine Konfluenz von 75% erreichten und für 2h in Anwesenheit von Kontroll- und Testsubstanzen inkubiert.

### 3.2.5 Immunhistochemie

Deckgläschen wurden abgeflammt, über Nacht mit 200 $\mu$ l einer Poly-Lysin-D-Lösung (Sigma-Aldrich, Hamburg) in einer Konzentration von 500 $\mu$ g/ml bedeckt und abschließend dreifach

### 3 Materialien und Methoden

mit Aqua dest. gewaschen. Die Zellen wurden auf den Deckgläschen in 4-well-Platten so ausgesät, dass sie nach 2 Tagen Proliferation eine Konfluenz von 75% erreichten.

Im Falle der hNPZ wurde zu diesem Zeitpunkt durch Entzug der Wachstumsfaktoren die Differenzierung eingeleitet und die Zellen für weitere 48h in Differenzierungsmedium belassen.

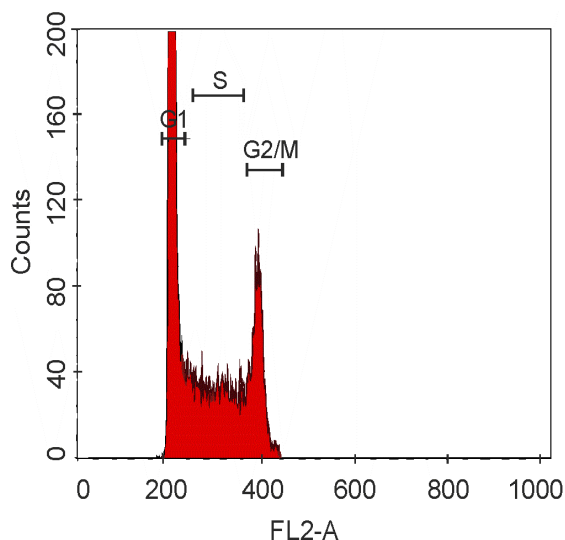
Die Zellen wurden für 4h mit Kontroll- und Testsubstanzen behandelt und im Anschluss mit 4% PFA in 0,1% PBS für 15min. bei Raumtemperatur fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 30min. mit einer Blocklösung bestehend aus 0,4% Triton-X in PBS bei Raumtemperatur behandelt. Sowohl Erst- (Maus-Anti- $\alpha$ -Tubulin, 1:1000, Sigma) als auch Zweitantikörper (goat-anti-mouse, AlexaFluor 568, 1:1000, Molecular Probes) wurden nacheinander nach einem zwischengeschalteten Waschschrift mit PBS für 1h bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Zur Eindeckelung und Färbung der Zellkerne wurde DAPI in Mounting-Medium (1,5 $\mu$ g/ml, Vector Labs, USA) verwendet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Keyence Biozero Mikroskops (Keyence, USA).

#### 3.2.6 Durchflusszytometrie

##### 3.2.6.1 Zell-Zyklus-Messung mit Propidium-Iodid

Die Messungen zum Zellzyklus wurden über die Bestimmung der Inkorporation von Propidium-Iodid, kurz PI, in Zellen mittels Fluoreszenz-gesteuerter-Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell-Sorting) durchgeführt.

Nach vorheriger Fixierung in  $-20^{\circ}\text{C}$  Ethanol, die einen aktiven Auswärtstransport des Moleküls unterdrückt, interkaliert Propidium-Iodid mit der DNS und erreicht durch diese Bindung höhere Fluoreszenzwerte, die im Durchflusszytometer als rote Fluoreszenz ablesbar werden (Tas und Westerneng 1981). Da die DNS-Verteilung während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich ist, lassen sich die verschiedenen Fluoreszenz-Maxima als Korrelat des DNS-Gehalts unterschiedlichen Zellzyklusabschnitten der Zellen zuordnen.



#### 3.2 Beispielhistogramm Zellzyklus-Analyse

Zwei fluoreszenzabhängige Zellzahlmaxima für Zellen mit einfachem (G1) bzw. doppeltem (G2/M) DNS-Gehalt durch stöchiometrische Interkalation von Propidium-Iodid mit der DNS. Der Bereich zwischen diesen Maxima repräsentiert die Zellen in der Synthese-Phase (S). Zellen in der G0-Phase wurden nicht berücksichtigt. Der Bereich unterhalb des G1-Maximums (sub-G1) repräsentiert Zelldebris und apoptotische Zellen und wurde ausgeklammert.

### 3 Materialien und Methoden

Im Durchflusszytometer fließen die Zellen als Suspension durch einen Laserstrahl, der durch die einzelnen Zellen gestreut wird. Dabei ist die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter) proportional zum Zelldurchmesser, während die Seitwärtsstreuung direkt proportional zur Zellgranularität ausfällt. Des Weiteren lässt sich die Fluoreszenz der Zellen auf verschiedenen Wellenlängen bestimmen; die für einzelne Zellen gemessenen Werte werden als Punkte (dots) in Histogrammen abgetragen. Das Fluoreszenzsignal lässt sich in folgende Parameter einteilen:

- A (area) – Impulsfläche, indirektes Maß für die Fluoreszenz-Intensität
- H (high) – Impulshöhe, direktes Maß für die Fluoreszenz-Intensität
- W(width) – Impulsdauer, direktes Maß für die Fläche der Fluoreszenz

Zellakkumulate, sogenannte Doubletten aus Zellen mit einfachem DNS-Gehalt, können einen doppelten oder vielfachen DNS-Gehalt vortäuschen. Da die Impulsdauer in diesen jedoch höher als in Einzelzellen liegt, lassen sie sich über ein Auswahlverfahren (Gating) nach der Impulsdauer von der Auswertung ausschließen (Nunez 2001).

Für die Experimente wurden die Zellen in 6-well-Platten so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Fixierung eine Konfluenz von ca. 80-85% in den DMSO-Proben erreicht wurde. Dazu wurden die Zellen nach 24-stündiger Anwuchsphase mit Kontroll- und Testsubstanz-haltigem Medium bedeckt und nach definierten Behandlungszeiten gewaschen, vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in warmem HBS resuspendiert. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde die Zellsuspension in -20°C Ethanol getropft und für minimal eine Stunde in diesem belassen. Um falsch hohe Fluoreszenzmessungen durch Interkalation von PI mit RNS zu vermeiden, wurden die Zellen nach vorheriger Zentrifugation bei 4°C (415g, 5min.) und Absaugung des Ethanols mit 1mg/ml RNase A behandelt (Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Im Anschluss wurden die Zellen für 30min. mit 50µg/ml Propidium-Iodid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gefärbt und sofort mit einem Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience (FACSCalibur, San Jose, CA, USA) gemessen. Die Messung erfolgte bei 605nm bei einem maximalen Zellfluss von 1000 Ereignissen/s bis zu einer Mindestzellzahl von 10 000. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Cell Quest Pro (BD Bioscience) ausgewertet.

#### **3.2.6.2 Bestimmung apoptotischer Zellen mit Annexin V**

Um zwischen Apoptose und Nekrose als Modus des Zelluntergangs zu unterscheiden, wurde ein Annexin V basiertes Kit zur Detektion apoptotischer Zellen (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II, BD Bioscience, San Diego, USA) verwendet. Die Methode detektiert den fluoreszierenden Antikörper Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran und nutzt die Veränderungen der Membranpolarität während der Apoptose. Dabei wird Phosphatidylserin - ein Phospholipid, welches sich in vitalen Zellen auf der dem Zytosol zugewandten Seite der Zellmembran befindet - in früh-apoptotischen Zellen auf die Außenseite der Membran

### 3 Materialien und Methoden

transportiert. Fluoreszin-markiertes Annexin V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und markiert früh-apoptische Zellen über eine grüne Fluoreszenz (Vermes et al. 1995). Über die parallele Färbung mit Propidium-Iodid, welches als DNS-Interkalator die Zellen rot färbt (Tas und Westerneng 1981) und aus Zellen mit intakter Zellmembran aktiv ausgeschleust wird, lassen sich (früh-)apoptotische von nekrotischen Zellen trennen, da die Plasmamembran als Barriere in apoptotischen Zellen lange erhalten bleibt und eine Anfärbung mit Propidium-Iodid verhindert. Die Nekrose geht mit einem Verlust der Membranintegrität einher und lässt somit eine Anfärbung der Zellen mit Propidium-Iodid zu. Spät-apoptotische Zellen verlieren die Plasmamembran-Integrität und sind positiv für Annexin V und Propidium-Iodid (Darzynkiewicz 1997).

Für die Experimente wurden die Progenitorzellen in Zellkulturplatten mit 6 wells ausgesät und nach einer 24-stündigen Anwachsphase für weitere 24h mit Kontroll- und Testsubstanzen behandelt. Zum Auswertungszeitpunkt wurde das Medium gemeinsam mit der Suspension abgelöster adhärenter Zellen zentrifugiert (415g, 5min., Raumtemperatur) und nach vorherigem Waschschrift mit PBS auf eine Konzentration  $10^6$  Zellen/ml normiert. Die weitere Behandlung und Färbung erfolgte entsprechend der Protokollvorgabe des Herstellers. Die Ergebnisse wurden mit einem Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience (FACSCalibur, San Jose, USA) gemessen und mit dem Programm Cell Quest Pro (BD Bioscience, San Jose, USA) ausgewertet.

#### **3.2.7 Tubulin-Polymerisation**

Die Untersuchungen zum Einfluss der Substanzen auf die Tubulin-Polymerisation wurden mit Hilfe des „Tubulin polymerization assay“ (BK004P) der Firma Cytoskeleton durchgeführt. Dieses Kit enthält aus Schweinehirn isoliertes Tubulin mit einem Reinheitsgrad von 97% sowie unter anderem Magnesium-haltigen Puffer und GTP.

Zur Untersuchung des Einflusses von Testsubstanzen auf die Tubulin-Polymerisation wird dabei die Fähigkeit zur selbstständigen Polymerisation von Tubulin-Dimeren zu Tubulin-Polymeren in Anwesenheit von GTP und Magnesium genutzt. Die Tubulin-Polymerisation lässt sich sowohl direkt mikroskopisch als auch indirekt über die Bestimmung der optischen Dichte bei 340nm untersuchen (s.u.).

Das lyophilisierte Tubulin wurde in kalter Pufferlösung auf Eis zu einer Konzentration von 4mg/ml resuspendiert und für die Versuche genutzt.

##### **3.2.7.1 Video-Mikroskopie nach Allen**

In diesem Experiment wurde der Prozess der Zusammenlagerung von Tubulin-Dimeren zu - Polymeren in Anwesenheit von GTP unter Zusatz verschiedener Substanzen beobachtet. Als Auswertungsparameter wurde dabei die Zahl und Form der Tubulin-Polymere unter Zusatz von Test- und Kontrollsubstanzen mit Hilfe des Video-verstärkten Kontrastmikroskopieverfahrens nach Allen (Allen's Video Enhanced Contrast – Differential Interference Contrast) verglichen. In diesem Verfahren werden zunächst analoge Bilder mit

### 3 Materialien und Methoden

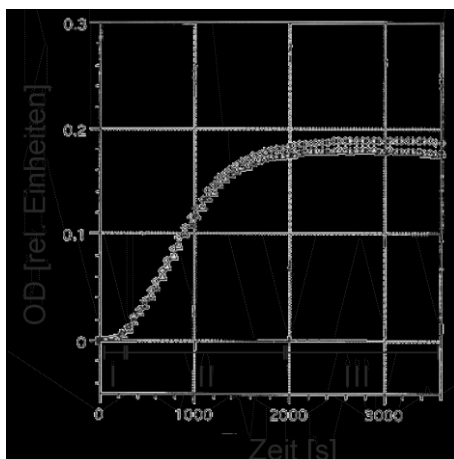
Phasenkontrastverstärkung aufgenommen und in einem zweiten Schritt in Form einer Echtzeit-Bildbearbeitung durch a) Abzug des Hintergrunds außerhalb des Fokus, b) Durchschnittsbildung der aufgenommenen Bilder zur Verstärkung der Bild-Hintergrund-Abgrenzung sowie c) selbständige Einstellung des Grauwertes aufbereitet. Nach digitaler Verstärkung des analogen Signals können Objekte, die bis zum 1000fachen unter der normalen Auflösung liegen, sichtbar gemacht werden. Die Ausgabe erfolgt als analoges Bild, das räumliche Verhältnisse und Brechungseigenschaften integriert (Allen et al. 1981).

Verwendet wurde ein inverses Diaphot 300-Mikroskop (Nikon, Japan) ausgerüstet mit einem Öl-Immersions-Kondensator, einem 60x PlanApo Öl-Immersions-Objektiv (Nikon, Japan) und einer Quecksilberlampe (HBO103W, Osram, Deutschland). Die analogen Bilder wurden mit einer C2400-07 Newvicon Kamera (Hamamatsu, Phototronics, Deutschland) aufgenommen und mit Hilfe eines Echtzeit-Bildprozessors (Argus20, Hamamatsu Phototronics, Deutschland) bearbeitet. Die Bilder wurden auf einen Macintosh 9600 Computer (Apple, USA) in die IPLab Spectrum Software (Scanalytics, USA) übertragen.

Tubulin in einer Ausgangskonzentration von 4mg/ml wurde in BRB80-Puffer (80mM PIPES; 1mM  $MgCl_2$ ; 1mM EGTA; pH 6.8) auf eine Konzentration von 2mg/ml verdünnt. Nach Zugabe von 0.5mM GTP zur Auslösung des Polymerisationsprozesses wurden die Proben für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 1h wurden die Proben per video-verstärktem differentiellen Interferenzkontrast-Verfahren mikroskopiert. Die Versuche zur VEC DIC Mikroskopie wurden mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Sergej Kuznetsov, Lichtmikroskopie Zentrum, Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock durchgeführt.

#### 3.2.7.2 Bestimmung der optischen Dichte

Da die oben beschriebene Polymerisation von Tubulin in einer Pufferlösung ebenfalls mit einer Zunahme der optischen Dichte bei 340nm einhergeht, lässt sich über eine Berechnung der Maximalgeschwindigkeit der Dichtezunahme eine Aussage über das Polymerisationsverhalten treffen (Lee und Timasheff 1977). Die optische Dichte nimmt infolge der Polymerisation von Tubulin-Dimeren in einem 3-phasigen Verlauf zu: in der Nukleationsphase (I) steigt die optische Dichte nur langsam, während sie in der Wachstumsphase (II) linear zunimmt, um in der Gleichgewichtsphase (III) ein konstantes Level zu erreichen.



#### 3.1 Phasen der Tubulin-Polymerisation

(I) Nukleationsphase ohne deutlich  
Zunahme der OD.

(II) Wachstumsphase mit schneller  
OD.

(III) Gleichgewichtsphase mit erreichte  
konstanten Optische Dichte-Levels.

Adaptiert nach Cytoskeleton, BK000

Der Einfluss von Substanzen mit Tubulin-stabilisierender bzw. -destabilisierender Wirkung lässt sich anhand einer Änderung der Polymerisationskurve ablesen. Als Parameter gelten dabei die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Polymerisationsgeschwindigkeit ( $t_{V50}$ ) sowie die maximale erreichte optische Dichte

Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden die Proben mit Kontroll- und Testsubstanzen behandelt und in Zellkulturplatten mit 96 wells pipettiert. Direkt im Anschluss wurde für 60min. minütlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 340nm bei 37°C mit Hilfe eines Photometers der Firma Tecan (Tecan500, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Berechnung der Maximalgeschwindigkeiten erfolgte mit Graphpad Prism unter Anwendung der nichtlinearen Regressions-Funktion „Boltzmann-Sigmoidal“.

#### **3.2.8 Akut-Toxizitäts-Studie**

Als Versuchstiere wurden weibliche Charles-River CD1 Mäuse mit einem Gewicht von 28-32g und einem Alter von 3-5 Wochen verwendet. Die Haltung erfolgte in der institutseigenen Tierversuchshaltung, bei Fütterung und Tränke ad libitum in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h.

Die Substanzen (0,09% NaCl, DMSO, PDA66) wurden jeweils in einem Volumen von 50µl intraperitoneal appliziert, wobei die Tiere mit der linken Hand über die Nackenhaut bzw. den Schwanz fixiert und die Injektion bei leichter Überkopfhaltung der Tiere ca. 1cm von der Mittellinie entfernt in den linken unteren Quadranten appliziert wurden.

Das Gewicht der Tiere wurde vor Beginn der Studie und zum Studienende bestimmt. Nach einer Versuchsdauer von 48h erfolgte die Tötung der Versuchstiere per Genickbruch und anschließend die Dekapitation. Zum Versuchsende wurden Hirn, Lunge, Herz, Leber, Milz und Niere sowie eine Blutprobe entnommen.

##### **3.2.8.1 Klinische Beobachtung**

Die Verträglichkeit der intraperitonealen Injektion wurde an einer den Richtlinien der OECD angepassten (OECD 2000) Auswertungsskala orientiert. Diese umfasste die Futter/Wasser-Aufnahme, das Erkundungsverhalten, die Fellsäuberung, direkte Schmerzzeichen wie beispielsweise flache Atmung oder Unbeweglichkeit sowie die Beurteilung der Injektionsstelle. Die genannten Parameter wurden vor der Behandlung, über die ersten 15min., nach 0,5; 1; 2; 4; 24 und 48h evaluiert und über einen Punktwert von 3=uneingeschränkt, kein Unterschied zu unbehandelten Vergleichstieren, 2=leichte Einschränkung, keine akuten Schmerzzeichen oder 1=akute Anzeichen von Schmerz zusammengefasst. Akute Anzeichen von Schmerzen (Punktwert 1) wurden als Abbruchkriterium definiert.

#### **3.2.8.2 Histopathologische Begutachtung**

Die entnommenen Organe wurden in 4% Formaldehyd (Sigma-Aldrich, Hamburg) asserviert und für mindestens 3 Tage belassen. Durch Quervernetzung von Proteinen über Bildung von Methylenbrücken und Schiff'schen Basen wird das Gewebe konserviert und gegen Fäulnisprozesse geschützt. Die fixierten Organe wurden gewogen und nach Auswahl repräsentativer Anteile über eine aufsteigende Alkoholreihe über Nacht paraffinisiert. Die paraffinisierten Organe wurden mit flüssigem Paraffin in Blöcke gegossen, aus denen mit Hilfe eines Mikrotoms (RM2245, Leica Biosystems, Wetzlar) Schnitte mit einer Dicke von 4µm angefertigt wurden.

Die Schnitte wurden auf Superfrost Adhäsions-Objektträger (Super Frost Ultra Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) gezogen und nach Wässerung durch eine absteigende Alkoholreihe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Nach anschließender erneuter Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Mounting Medium (Vectashield, Vector Labs, Orton Southgate, UK) und einem Deckglas versiegelt.

Die pathologische Begutachtung der Organe erfolgte anhand von Stichproben in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Friedrich Prall (Pathologisches Institut, Universität Rostock).

#### **3.3 Statistische Analyse**

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von mindestens drei verschiedenen Experimenten (wenn nicht anders gekennzeichnet) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism, Inc., USA) und Microsoft Excel (Microsoft, USA). Als Tests wurden der gepaarte t-Test sowie ONE-Way-ANOVA durchgeführt. Signifikanzwerte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant (\*), von  $p < 0,01$  als hochsignifikant (\*\*) bewertet. Markierungen auf den Balken geben das Signifikanzniveau gegenüber den Kontrollproben an.



### **4 Resultate**

In der vorliegenden Studie wurde die in einem Screening für Indolylmaleimid-Derivate als stark antiproliferativ und zytotoxisch aufgefallene Substanz PDA66 detailliert untersucht. Um den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären wurden zunächst Proliferationsanalysen, Zytotoxizitätstests, Zellzyklusanalysen und die Quantifizierung apoptotischer Zellen durchgeführt. Unter Anwendung live-mikroskopischer Verfahren, über die Bestimmung der optischen Dichte in isoliertem Tubulin sowie über den Einfluss auf das Zytoskelett in hNPZ konnte ein Tubulin-inhibitorischer Effekt gezeigt werden.

Der antiproliferative Effekt von PDA66 wurde in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen und über die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes mit klinisch etablierten Spindelgiften wie Paclitaxel verglichen. Während die ermittelte Potenz gegenüber den in der Klinik verwendeten Substanzen bedeutend geringer ausfiel, erbrachte ein Zytotoxizitätstest in differenzierten hNPZ eine geringere Reduktion des Metabolismus im Vergleich zu Paclitaxel. Eine Akut-Toxizitätsstudie über 48h mit einmaliger intraperitonealer Behandlung ergab neben einer Verringerung der Leukozyten keine Hinweise auf eine Hypersensitivitätsreaktion auf die Substanz. Die histopathologische Begutachtung der entnommenen Organe zeigte ebenfalls keine Hinweise auf akuttoxische Effekte.

Anders als die Indolylmaleimide SB216763 und IM-12 konnte PDA66 in einem ELISA zur Bestimmung des Gesamtzell- $\beta$ -Catenin-Gehalts in differenzierenden hNPZ kein  $\beta$ -Catenin akkumulieren. Dies spricht gegen eine mögliche Inhibition von GSK3 $\beta$ . Sowohl SB216763 als auch IM-12 inhibieren in höheren Konzentrationen als in vorhergehenden Studien hinsichtlich ihrer GSK3 $\beta$ -inhibitorischen Wirkung getestet ebenfalls die Polymerisation von isoliertem Tubulin.

Neben PDA66 zeigen auch neu synthetisierte Derivate von Indolylmaleimiden potente antiproliferative Effekte in hNPZ und Krebszelllinien. Die als GSK3 $\beta$ -Inhibitoren etablierten Substanzen SB2167363 und IM-12 inhibierten das Wachstum von Kolon-Karzinomzellen, wobei die Ko-Applikation von PDA66 und IM-12 die stärkste wachstumshemmende Wirkung zeigte.

#### **4.1 Die Wirkung von Indolylmaleimiden auf neurale Progenitorzellen**

##### **4.1.1 Proliferation und Vitalität**

Nach den Ergebnissen von Schmöle et al. (Schmöle et al. 2010) wurden in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Katalyse (LIKAT) neue Derivate von SB216763 und IM-12 als potentielle Inhibitoren von GSK3 $\beta$  synthetisiert und in ihrer Wirkung auf die Proliferation humaner neuraler Progenitorzellen untersucht.

Die Kinetik der Zellzahl wurde über einen Zeitraum von 72h durch Zellzählungen zu den Zeitpunkten 0; 24; 48; 72h bestimmt. Alle Substanzen wurden zum Zeitpunkt 0h in einer Konzentration von 3 $\mu$ M appliziert, als Negativkontrolle wurde DMSO in äquimolarem Volumen in Wachstumsmedium zugegeben.

#### 4 Resultate

Während SB216763 im Vergleich zu DMSO die Zellzahl nach 72h nicht signifikant reduzierte, war die Wachstumsinhibition durch die Derivate IM-12, AB209 und PDA66 signifikant.

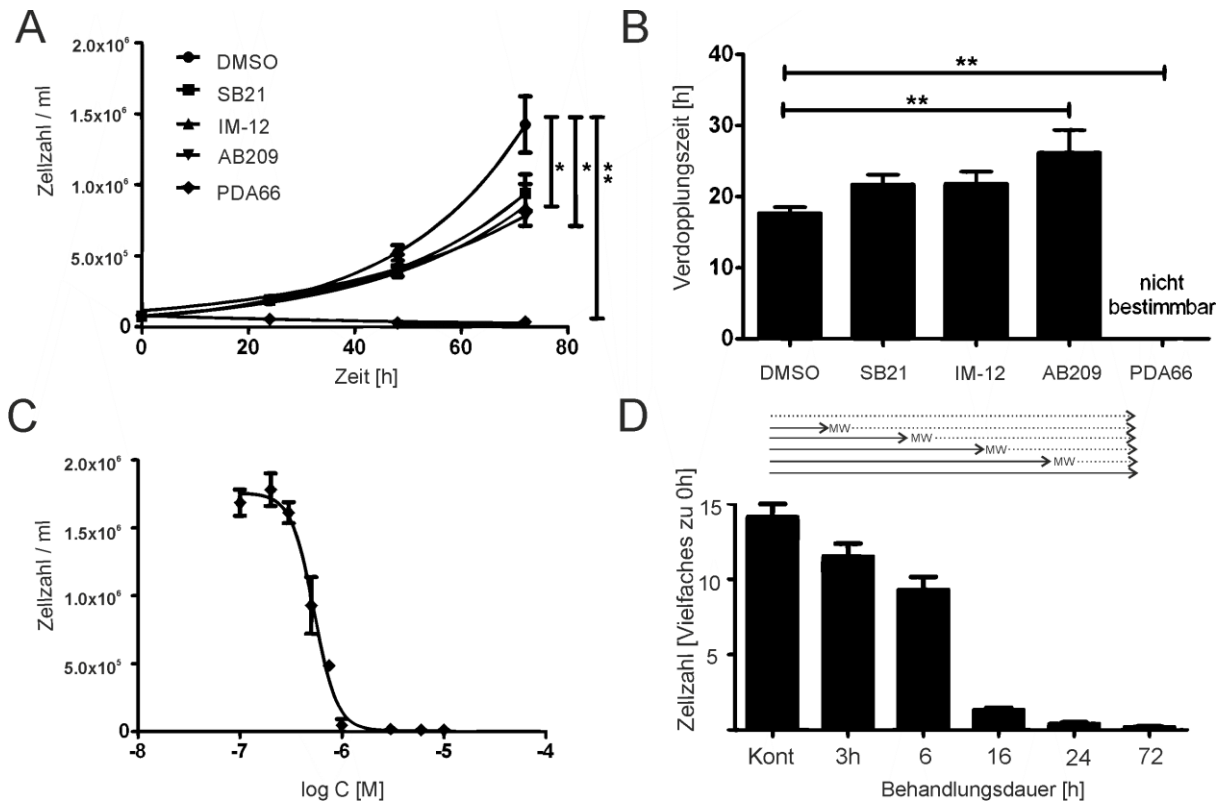
Die antiproliferative Wirkung spiegelte sich auch in den berechneten Verdopplungszeiten wider (Abbildung 4.1C): während SB216763 und IM-12 die Verdopplungszeiten nicht signifikant veränderten, resultierte die Behandlung mit AB209 in einer signifikanten Verlängerung dieser. Für PDA66 konnte keine Verdopplungszeit bestimmt werden, da die Zellzahl nach 72h unter der Zellzahl zum Zeitpunkt 0h lag.

Mit der Reduktion der Proliferationsrate durch PDA66 korrelierte die Abnahme der parallel im elektronischen Exklusionsverfahren bestimmten Zellvitalität, während alle weiteren Derivate keine signifikanten Effekte auf die Progenitorzellen zeigten (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1A;B).

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob die antiproliferative Wirkung von PDA66 eine Konzentrationsabhängigkeit zeigt. Dazu wurden die hNPZ zusätzlich zur im Screening getesteten Konzentration von 3 $\mu$ M mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 $\mu$ M behandelt und die Zellzahl nach 24, 48 und 72h gemessen. Das Wachstum der hNPZ wurde konzentrationsabhängig reduziert, die IC<sub>50</sub> betrug bei Vergleich der Endzellzahlen nach 72h 0,532 $\mu$ M (Abbildung 4.1C). Im Falle von AB209 konnte eine IC<sub>50</sub> von 1,912 $\mu$ M ermittelt werden. Der Einfluss der potenteren Struktur PDA66 wurde im Folgenden näher charakterisiert.

Zunächst wurde die antiproliferative Wirkung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer dargestellt: proliferierende hNPZ wurden zum Zeitpunkt 0h mit 3 $\mu$ M PDA66 bzw. DMSO in Proliferationsmedium behandelt. Nach 3; 6; 16; 24h bzw. 72h kontinuierlicher Behandlungsdauer wurde das ursprüngliche Medium durch substanzfreies Medium ersetzt. 72h nach Behandlungsbeginn wurden die Zellen gezählt und die Endzellzahl als Vielfaches der zum 0h-Zeitpunkt vorhandenen Zellzahl verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen einer Behandlungsdauer von 6h gegenüber 16h (DMSO-Kontrolle: 14,16 $\pm$ 1,44; 6h PDA66: 9,32 $\pm$ 1,44 vs. 16h PDA66: 1,35 $\pm$ 0,21) und eine deutlich geringere, nicht signifikante Differenz zwischen 16; 24 und 72h Behandlungsdauer (24h: 0,42 $\pm$ 0,16; 72h: 0,21 $\pm$ 0,03).

## 4 Resultate



**Abbildung 4.1** Die Wirkung von Indolylmaleimiden auf die Proliferation und Vitalität neuraler Progenitorzellen.

(A) Proliferationskinetik über die Zeitpunkte 24, 48 und 72h unter Behandlung mit Indolylmaleimiden in der Konzentration 3µM. SB216763 = SB21. Die Derivate AB209 und PDA66 inhibieren das Wachstum signifikant. (B) Verdopplungszeiten. AB209 verlängert die Verdopplungszeit gegenüber DMSO (16,62h) signifikant (25,63h), für PDA66 lässt sich keine Verdopplungszeit bestimmen. (C) Konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition durch PDA66. Konzentrationen zwischen 0,1 und 10µM.  $IC_{50} = 0,532\mu M$ . (D) Zeitabhängigkeit der Behandlungsdauer. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen 16; 24 und 72h Behandlung. gestrichelte Linie: substanzfreies Medium. Durchgehende Linie: Medium+3µM PDA66. MW=Mediumwechsel. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Substanz	Zellzahl nach 72h [Zellen/ ml]	Zellzahl nach 72h [% der Kontrolle]	Vitalität [%]	Verdopplungszeit [h]
DMSO	1425642±197977	100,0±14,0	93,0±0,7	16,62h
SB21	942291±131726	66,1±9,2	92,5±0,3	19,97h
IM-12	854083±151025	59,9±10,6	93,8±0,3	20,88h
AB209	767100±54807	53,8±3,8	90,5±0,6	25,6
PDA66	34172±11588	2,4±0,8	53,5±2,6	nicht bestimmbar

**Tabelle 4.1** Der Einfluss verschiedener Indolylmaleimide auf Wachstum und Vitalität der hNPZ  
MW±SEM

### 4.1.2 Zellmetabolismus

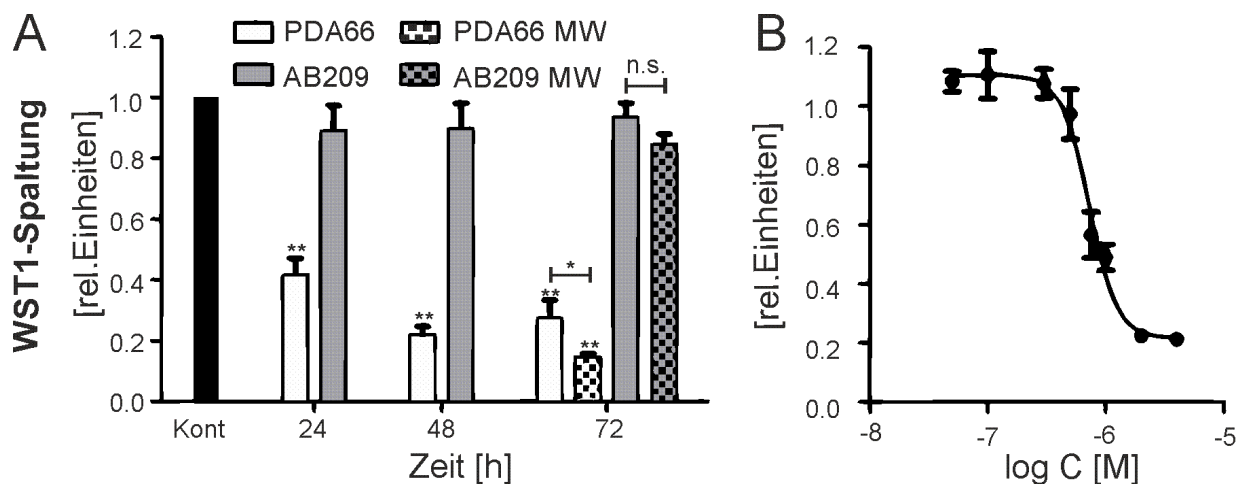
Die im Zellproliferationsexperiment aufgefallenen Substanzen wurden im folgenden Schritt auf ihre antimetabolische Wirkung getestet. Zu diesem Zweck wurden proliferierende hNPZ zum Zeitpunkt 0h mit 3µM PDA66, 3 µM AB209 bzw. DMSO als Negativkontrolle in gleichem Volumen in Proliferationsmedium behandelt und nach 24, 48 und 72h mit WST1-

#### 4 Resultate

Reagenz, das als Ausleseparameter der metabolischen Aktivität durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein Formazansalz umgewandelt wird, versetzt.

Die Behandlung mit PDA66 führte zu den drei Zeitpunkten zur signifikanten Reduktion des Metabolismus (Abbildung 4.2A 24h:  $41,6 \pm 5,5\%$ ; 48h:  $21,9 \pm 2,7\%$ ; 72h:  $27,5 \pm 5,8\%$ ), während AB209 nur geringe Effekte zeigte (Abbildung 4.2A 24h:  $89,0 \pm 8,3\%$ ; 48h:  $89,7 \pm 8,5\%$ ; 72h:  $92,6 \pm 4,7\%$ ). Um einen möglichen Abbau der Substanzen auszuschließen, wurde der Versuch mit 24-stündlichem Mediumwechsel (MW) wiederholt: 72h nach Behandlungsbeginn fanden sich in den mit PDA66 behandelten Zellen ein geringgradiger, jedoch signifikanter Unterschied zwischen kontinuierlich (kont) behandelten und jeweils mit frischem Medium versehenen Zellen (PDA66-kont:  $27,5 \pm 5,8\%$ ; PDA66-MW:  $14,4 \pm 1,2\%$ ). In den mit AB209 kontinuierlich und mit frischem Medium behandelten Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede (AB209kont:  $92,6 \pm 4,7\%$ ; AB209-MW:  $79,8 \pm 10,0\%$ ).

Auch die Reduktion des Metabolismus durch die Behandlung mit PDA66 war konzentrationsabhängig: Nach 72-stündiger kontinuierlicher Behandlung mit Konzentrationen zwischen  $0,05$  und  $3\mu\text{M}$  konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,729\mu\text{M}$  ermittelt werden.

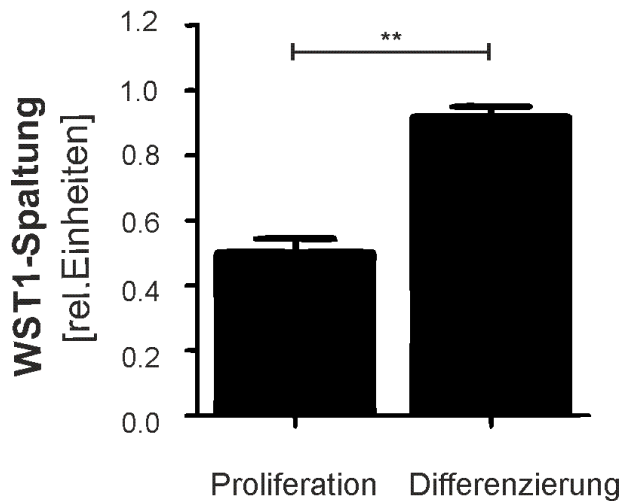


**Abbildung 4.2 Reduktion des Zellmetabolismus.** (A) Messung über die Zeitpunkte 24, 48, 72h. Die Behandlung mit  $3\mu\text{M}$  PDA66 reduziert den Zellmetabolismus zu allen Zeitpunkten signifikant (24h:  $41,6 \pm 5,5\%$ ; 48h:  $21,9 \pm 2,7\%$ ; 72h:  $27,5 \pm 5,8\%$ ), während  $3\mu\text{M}$  AB209 zu keiner signifikanten Reduktion des Metabolismus führt (24h:  $89,0 \pm 8,3\%$ ; 48h:  $89,7 \pm 8,5\%$ ; 72h:  $92,6 \pm 4,7\%$ ). Bei 24-stündlichem Mediumwechsel (MW) kommt es im Falle von PDA66 zu einer signifikanten Verstärkung des inhibitorischen Effekts nach 72h (MW:  $14,4 \pm 1,2\%$ ), im Falle von AB209 ist die Verstärkung nicht signifikant (MW:  $82,7 \pm 3,2\%$ ). (B) Die Inhibition des Zellmetabolismus durch PDA66 ist konzentrationsabhängig.  $\text{IC}_{50}$  nach 72h:  $0,729\mu\text{M}$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.1.3 Metabolismus in proliferierenden und differenzierten Zellen

Eine deutliche Diskrepanz zeigte sich in der Reduktion des Metabolismus in proliferierenden und differenzierten Zellen: Während über 24h mit  $3\mu\text{M}$  PDA66 behandelte proliferierende hNPZ eine deutliche Reduktion des Metabolismus aufwiesen, wurden die differenzierten Zellen in Relation zur DMSO-Kontrolle nur minimal beeinflusst (Proliferation:  $50,2 \pm 4,0\%$  vs. Differenzierung:  $91,9 \pm 3,0\%$ ).

#### 4 Resultate



**Abbildung 4.3 Metabolismus in proliferierenden und differenzierten hNPZ.**

Die 24-stündige Behandlung mit 3µM PDA66 führt in proliferierenden hNPZ zur signifikant stärkeren Reduktion des Metabolismus verglichen mit differenzierten, nicht proliferierenden hNPZ (Proliferation: 50,2±4,2%; Differenzierung 89,7±3,4%). Normiert gegen DMSO. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

#### 4.1.4 Zellzyklus

In Anbetracht der signifikant geringeren Reduktion des Zellmetabolismus in differenzierten, nicht proliferierenden Progenitorzellen wurde die Wirkung von PDA66 auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus untersucht.

Zu diesem Zweck wurde nach einer Behandlungszeit von 4; 8; 16 und 24h mit 3µM PDA66 und 3µM AB209 in proliferierenden hNPZ eine Färbung mit Propidium-Iodid (PI) und anschließend eine durchflusszytometrische Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Ein Spitzenanteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt von 68,9±10,2% an der Gesamtzahl aller gemessenen Zellen wurde nach 16h Behandlungsdauer beobachtet. Der Anteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt stieg bereits nach 4h und war zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant höher als in der DMSO-Kontrolle (siehe Abbildung 4.3A). AB209 war zu keinem Zeitpunkt in der Lage, den Anteil der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt gegenüber der DMSO-Kontrolle zu erhöhen (siehe Tabelle 4.2).

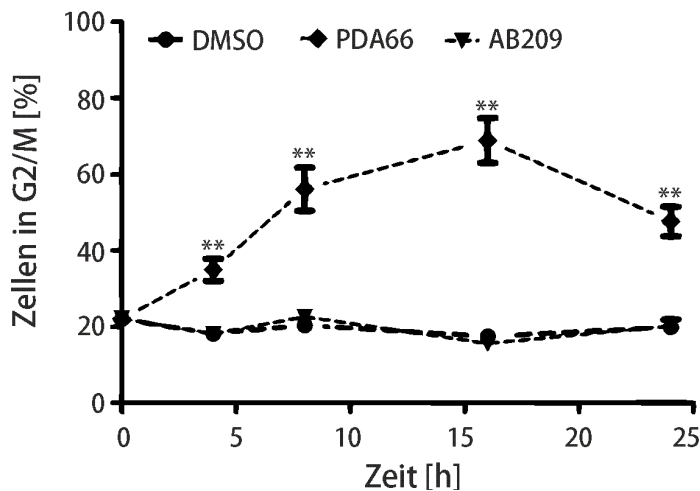
Die Behandlung der Zellen mit PDA66-Konzentrationen zwischen 0,1 und 10µM zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellzyklusverteilung. Bei einer Konzentration von 2,63µM waren 50% der Zellen nach 16-stündiger Behandlung in der G2/M-Phase arretiert (EC<sub>50</sub>) (Abbildung 4.3B; Tabelle 4.3).

Substanz	Zeitpunkt				
	0h	4h	8h	16h	24h
DMSO	22,0±0,8	18,2±1,4	20,4±1,4	17,4±1,3	19,9±2,0
PDA66	22,0±0,8	34,9±2,9	56,1±5,7	68,9±5,9	47,6±3,9
AB209	22,2±1,1	18,2±1,1	22,6±0,6	15,6±0,5	20,2±2,6

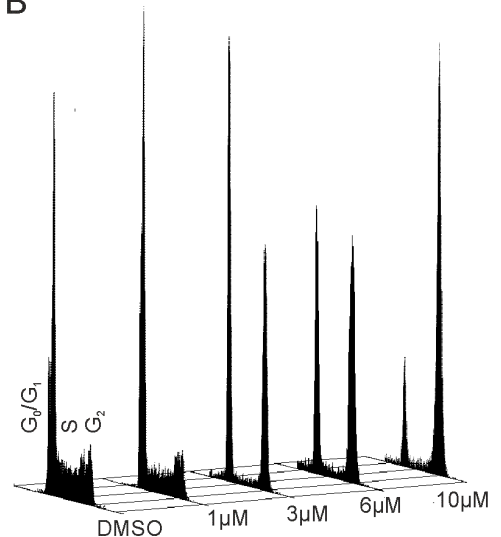
**Tabelle 4.2 Anteil der hNPZ in der G2/M-Phase über die Zeit. MW±SEM**

## 4 Resultate

A



B



**Abbildung 4.4. Arretierung proliferierender hNPZ in G2/M durch PDA66.**

Durch Interkalation von Propidium-Iodid mit DNS lässt sich eine rote Fluoreszenz ableiten. Durch Verdopplung des DNS-Gehalts, wie beispielsweise in mitotischen Zellen, ergibt sich ein zweites Fluoreszenzmaximum (G2/M). Der zwischen den Fluoreszenzmaxima befindliche Anteil entspricht Zellen in der Synthese-Phase (S). (A) Bestimmung des Anteils der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt über die Zeitpunkte 0; 4; 8; 16 und 24h unter Behandlung mit 3µM PDA66, AB209 bzw. äquimolar DMSO. Der größte Anteil von Zellen in der G2/M-Phase unter PDA66-Behandlung findet sich nach 16h (68,9±5,9%). AB209 zeigt keinen Einfluss auf den Zellzyklus. (B) Konzentrationsabhängige Arretierung durch PDA66 nach 16-stündiger Behandlungszeit. Der Anteil von Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt (G2/M) erhöht sich mit steigender Konzentration von PDA66, n=4-6; \*p<0,05; \*\*p<0,01

Substanz	Konzentration				
	0.75µM	1µM	3µM	6µM	10µM
PDA66	18,17 ±3,2	16,0±2,2	54,1±2,8	77,6±3,0	74,2±6,8

**Tabelle 4.3 Anteil der Zellen in G2/M in Abhängigkeit der PDA66-Konzentration. MW±SEM**

### 4.1.5 Apoptose

Um einen unspezifisch-zytotoxischen Effekt von einem spezifischen Mechanismus als Erklärung für die starke Inhibition der Proliferation in den Progenitorzellen abzugrenzen, wurde der Anteil der Zellen bestimmt, die infolge Apoptoseinduktion untergehen.

Zu diesem Zweck wurde eine Parellelfärbung mit fluoreszierendem Annexin V als Marker der frühen Apoptose und Propidium-Iodid als Nekrosemarker durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch undfluoreszenz-basiert.

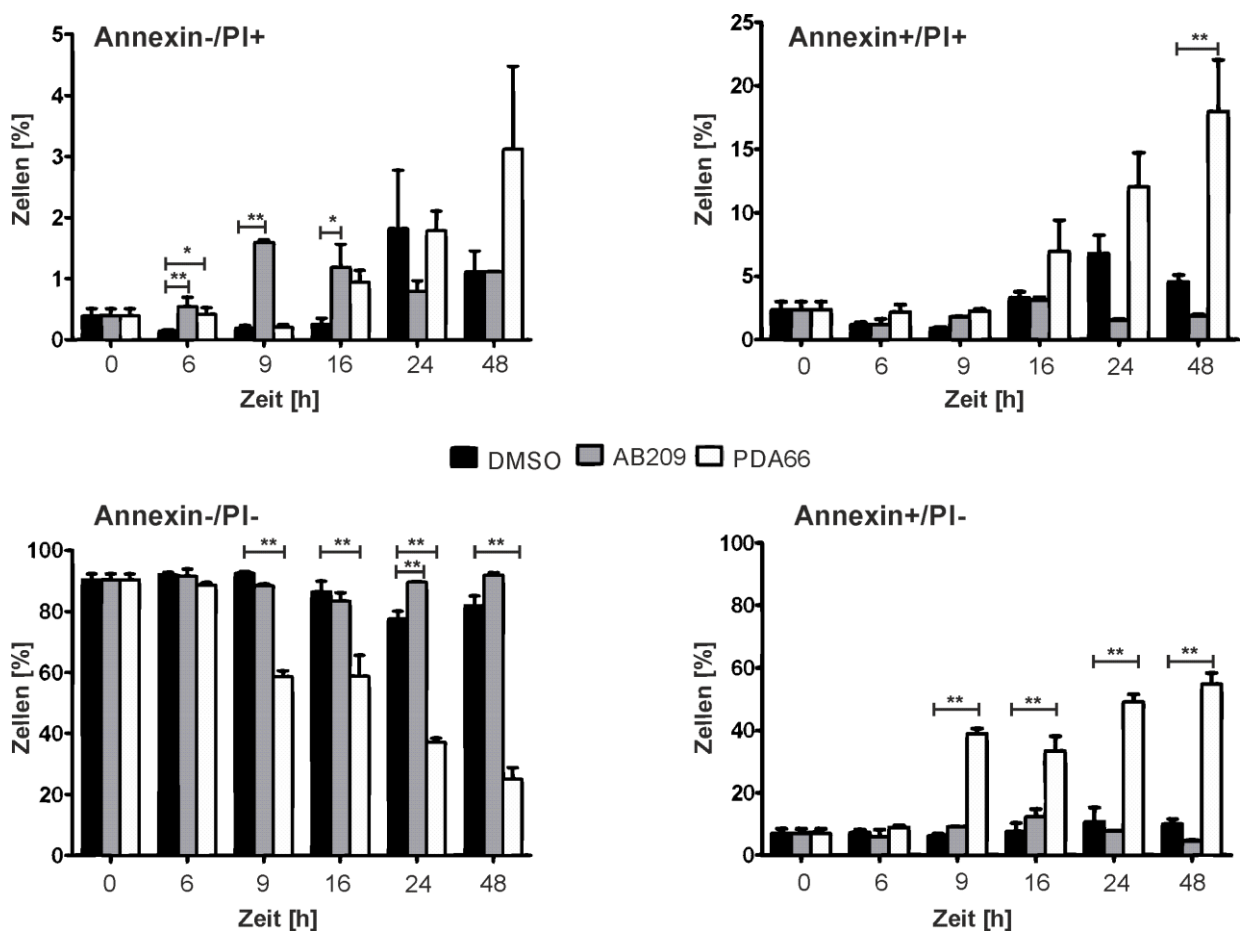
Die proliferierenden Zellen wurden zum Zeitpunkt 0h mit 3µM PDA66, AB209 bzw. DMSO in gleichen Volumina behandelt und nach unterschiedlicher Behandlungsdauer (6; 9; 16; 24; 48h) analysiert (Abbildung 4.4). Es zeigte sich nach 9h ein signifikant höherer Anteil Annexin V-positiver Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle (PDA66: 38,9±1,78% vs. DMSO: 6,2±0,8%), der über alle weiteren Zeitpunkte signifikant höher als in der Kontrolle blieb und ein Maximum von 54,8±3,5% nach 48h erreichte. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war die Zahl der ungefärbten Zellen nach 9h signifikant niedriger als in der DMSO-

#### 4 Resultate

Kontrolle (PDA66:  $58,5 \pm 2,0\%$  vs. DMSO:  $92,4 \pm 0,7\%$ ) und blieb über alle Zeitpunkte signifikant niedriger mit einem Tiefpunkt von  $24,9 \pm 3,9\%$  nach 48h. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil doppelpositiver Zellen ab dem Zeitpunkt 16h stetig und war zum Zeitpunkt 48h signifikant höher als in der DMSO-Kontrolle (PDA66:  $18,0 \pm 4,1\%$  vs. DMSO:  $4,5 \pm 0,6\%$ ).

Die Behandlung mit  $3\mu\text{M}$  AB209 führte weder zu einer signifikanten Erhöhung der frühapoptotischen (Annexin V+/PI-) Zellen, noch zu einer signifikanten Abnahme der ungefärbten Zellen. Sowohl AB209 als auch PDA66 erhöhten den Anteil nekrotischer Zellen (Annexin V-/PI+) signifikant zu den Zeitpunkten 6; 9; 16h, überschritten jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Höchstmarke von 5,0%.

AB209 wurde mit Abschluss dieses Experiments zugunsten der potenteren Struktur PDA66 nicht weiter betrachtet.



**Abbildung 4.5 Durchflusszytometrische Messung der apoptotischen und nekrotischen Zellen infolge unterschiedlicher Behandlungszeiten mit  $3\mu\text{M}$  PDA66, AB209, DMSO.** Linker, unterer Quadrant: PDA66 reduziert den Anteil der ungefärbten (doppelnegativen) Zellen signifikant ab 9h Behandlungsdauer. Rechter, unterer Quadrant: PDA66 steigert den Anteil früh-apoptotischer, Annexin V-gefärbter Zellen signifikant ab 9h. AB209 zeigt keinen Einfluss. Rechter, oberer Quadrant: Die Zahl der doppelpositiven (Annexin V+/PI+) Zellen steigt infolge der PDA66-Behandlung und ist nach 48h signifikant gegenüber DMSO erhöht. Linker, oberer Quadrant: sowohl AB209 als auch PDA66 erhöhen den Anteil nekrotischer Zellen. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Zeitpunkt

#### 4 Resultate

Substanz	0h	6h	9h	16h	24h	48h
DMSO	7,0±1,5	7,4±0,9	6,2±0,8	7,6±2,7	10,7±4,6	10,0±1,6
PDA66	7,0±1,5	8,9±0,8	38,9±1,7	33,4±4,8	49,1±2,4	54,8±3,5
AB209	7,0±1,5	6,0±2,2	9,1±0,2	12,4±2,4	7,8±0,1	4,6±0,4

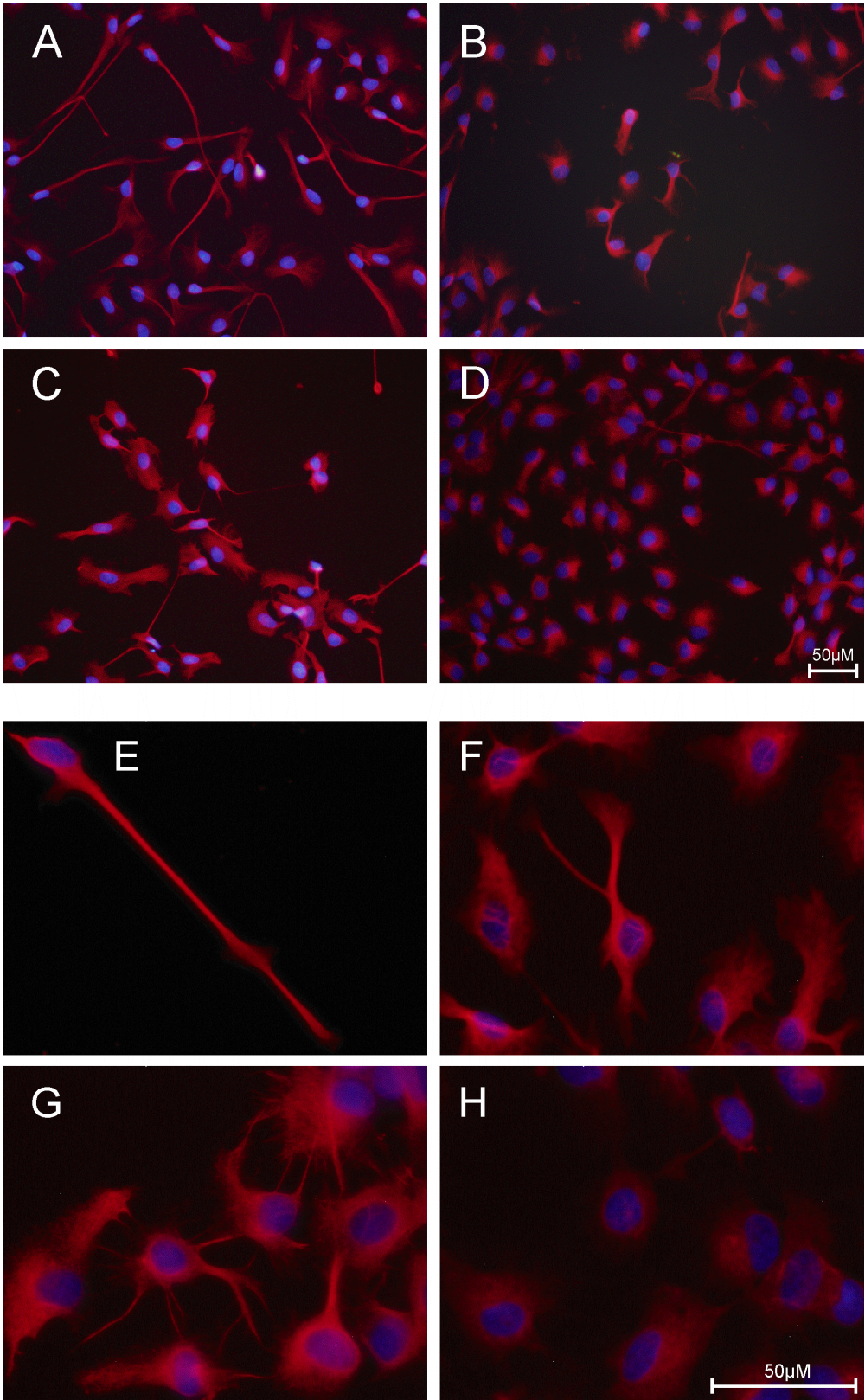
**Tabelle 4.4 Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V+/PI-) unter Behandlung mit 3µM PDA66, AB209, äquivoluminär DMSO über einen Zeitraum von 48h. MW±SEM**

## 4.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

### 4.2.1 Veränderung des Zytoskeletts in hNPZ

In Anbetracht der Arretierung proliferierender hNPZ in der G2/M-Phase und der hohen Bedeutsamkeit des zellulären Tubulin-Gerüsts für diese Zellzyklusphase wurde die Substanzinteraktion mit den Mikrotubuli untersucht. Zu diesem Zweck diente die Fluoreszenzmarkierung von  $\alpha$ -Tubulin, Bestandteil des  $\alpha\beta$ -Heterodimers der Mikrotubuli. hNPZ wurden in ihrer differenzierten Form, die sich in den vorhergehenden Experimenten als resistenter gegen den Einfluss von PDA66 gezeigt hatte, für 1h mit 3µM PDA66, DMSO als Negativkontrolle, 100ng/ml Nocodazol als Positivkontrolle für ein destabilisierendes Spindelgift und 1µM Paclitaxel als Positivkontrolle für ein stabilisierendes Spindelgift behandelt. Die gefärbten Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und hinsichtlich ihres Mikrotubuli-Gerüsts verglichen (Abbildung 4.6).





#### 4 Resultate

##### **Abbildung 4.6 Veränderung des Mikrotubuli-Gerüsts durch 1h Behandlung mit DMSO, PDA66, Paclitaxel und Nocodazol.** Rot $\alpha$ -Tubulin, blau Zellkerne. (A,E) Die mit DMSO

behandelten differenzierten hNPZ zeigen lange Ausläufer und schmale, ovale Zellkörper. (B,F)

Die Behandlung mit 3 $\mu$ M PDA66 führt zur Verkleinerung und Abrundung der Zellkörper sowie zum weitestgehenden Verlust der Ausläufer. (C,G) Die Behandlung mit Paclitaxel führt zur Ausbildung

zahlreicher kurzer Ausläufer sowie zur gleichmäßigen, verstärkten Fluoreszenzmarkierung. (D,G)

Die Behandlung mit Nocodazol führt zur Abrundung und Verkleinerung der Zellkörper.

Vergrößerung 200x. 1.AK: anti- $\alpha$ -Tubulin. 2.AK: AlexaFluor568.

Die als Negativkontrolle mit DMSO behandelten Zellen zeigten zumeist schmale, ovale Zellkörper mit zahlreichen länglichen Ausläufern (A). Dieses Bild stand in deutlichem Kontrast zu den mit 3 $\mu$ M PDA66 behandelten Zellen, die kaum bzw. nur in sehr geringer Zahl kurze Ausläufer aufwiesen (B). Die hNPZ stellten sich durch die Behandlung mit verkleinerten, abgerundeten Zellkörpern sowie um den Zellkern konzentriertem und in die Peripherie diffus auslaufendem Mikrotubulinetzwerk dar.

Die Positivkontrolle für ein stabilisierendes Spindelgift, Paclitaxel, zeigte gleichmäßig bis in die Peripherie fluoreszierende Zellkörper mit zahlreichen kurzen Ausläufern (C).

Die Behandlung mit dem destabilisierenden Spindelgift Nocodazol führte wie PDA66 zur Abrundung und Verkleinerung der Zellen mit weitestgehendem Verlust und Verkürzung der Ausläufer. Auch hier stellte sich wie in den mit PDA66 behandelten Zellen die Fluoreszenzanfärbung um den Nukleus verstärkt und in die Peripherie abflauend dar.

#### **4.2.2 Tubulin-Polymerisation in vitro**

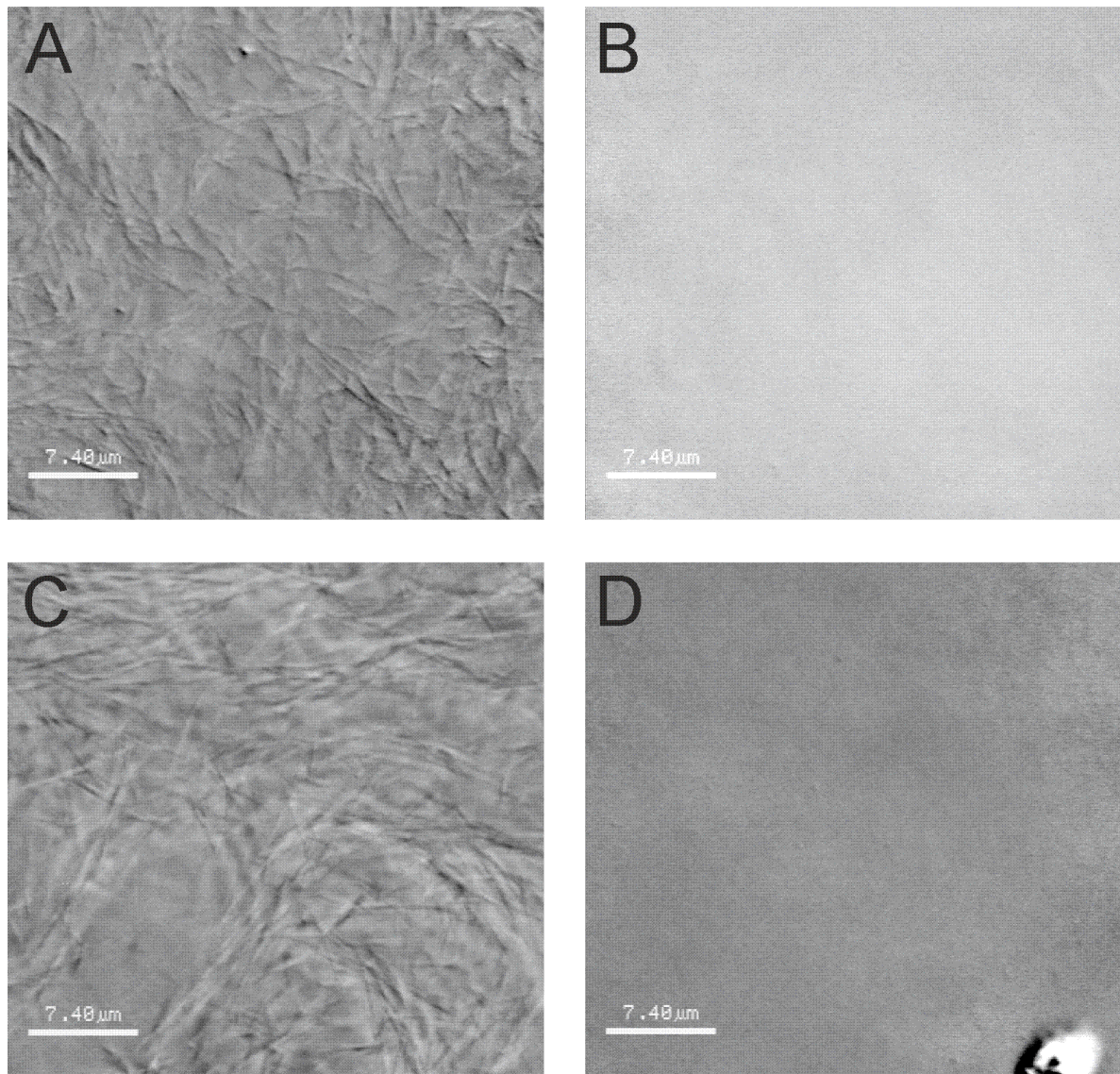
Um die in den Zellen beobachtete Veränderung des Tubulin-Gerüsts visuell zu bestätigen, wurde die Wirkung von PDA66 auf isoliertes Tubulin in einem in vitro-Ansatz, auf mikroskopischer Ebene und über eine Bestimmung der optischen Dichte untersucht.

Da Tubulin-Heterodimere sich in Anwesenheit von GTP und  $Mg^{2+}$ -Ionen eigenständig zu Mikrotubuli polymerisieren, lässt sich der Einfluss von Substanzen auf die Dynamik dieses Prozesses in Echtzeit beobachten. Unter Zuhilfenahme der VEC-DIC-Mikroskopie wurde der Einfluss von PDA66 auf die Tubulin-Polymerisation im Vergleich zum stabilisierenden Spindelgift Paclitaxel und zum destabilisierenden Spindelgift Nocodazol analysiert.

Nach halbstündiger Behandlung mit 10% DMSO fanden sich zahlreiche kurze Mikrotubuli (Abbildung 4.7A). Unter Behandlung mit sowohl 3 $\mu$ M PDA66 (Abbildung 4.7B) als auch mit 10 $\mu$ M PDA66 (nicht gezeigt) waren keine Mikrotubuli sichtbar. Demgegenüber führte die Anwesenheit von 1 $\mu$ M Paclitaxel zur Ausbildung einer Vielzahl deutlich verlängerter Mikrotubuli (Abbildung 4.7C) während die Inkubation mit Nocodazol, in Bestätigung der in den hNPZ gesehenen Veränderungen, die Ausbildung von Mikrotubuli ähnlich der Behandlung mit PDA66 unterdrückte und keine Strukturen im Bild erkennbar waren.

Auch in diesem Experiment zeigte sich eine deutliche Verwandtschaft der Effekte von PDA66 und Nocodazol.





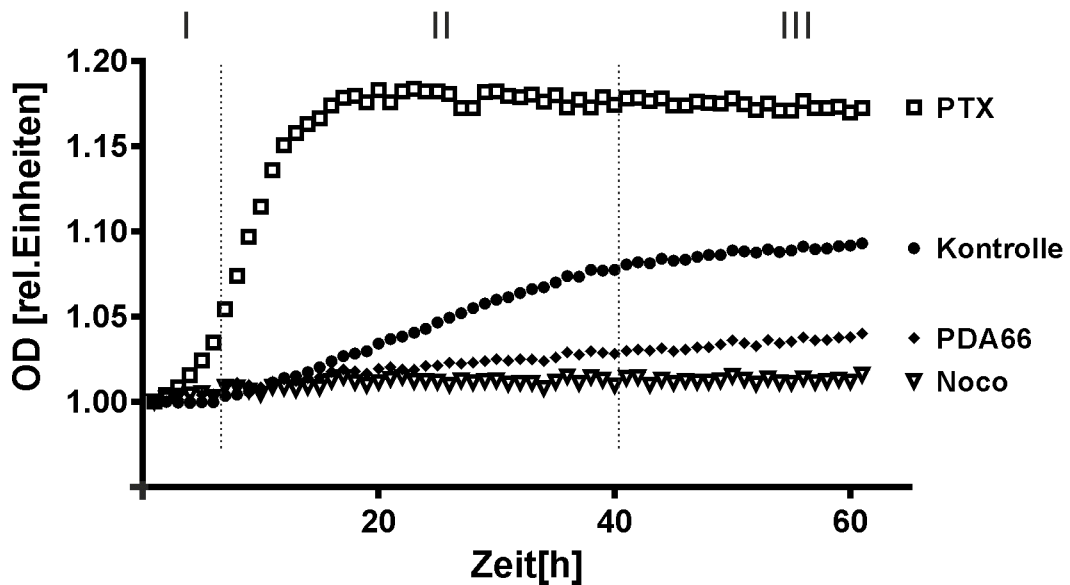
**Abbildung 4.7. VEC-DIC-Mikroskopie der Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit verschiedener Substanzen.** Unter Behandlung mit 10%DMSO finden sich zahlreiche kurze Mikrotubuli (A). Während das stabilisierende Spindelgift Paclitaxel zur Ausbildung einer großen Zahl verlängerter Mikrotubuli führt (D), finden sich sowohl in der mit 3µM PDA66 (B) als auch mit 200nM Nocodazol (C) behandelten Probe keine sichtbaren Mikrotubulus-Strukturen. Die Legende entspricht 7,4µm.

In einem weiteren in vitro-Experiment mit isoliertem Tubulin wurde der Einfluss von PDA66 auf die Tubulin-Polymerisation über die Zunahme der optischen Dichte analysiert. Im Rahmen dieses Experiments wurde die von Shelanski et al. etablierte Methode, in der die lichtstreuenden Eigenschaften von Tubulin-Polymeren als Ableitung für die Polymerisationsdynamik verwendet werden, genutzt (Shelanski et al. 1973).

In der mit DMSO behandelten Probe lassen sich die drei Phasen der Tubulin-Polymerisation Nukleation, Elongation und Gleichgewichtsphase und damit das Wachstum von einzelnen Heterodimeren zu Oligomeren und zu wachsenden und schrumpfenden Tubulin-Polymeren erkennen (Alberts 2002). Unter Behandlung mit 1µM Paclitaxel wurde der Ablauf dieser

#### 4 Resultate

Phasen deutlich beschleunigt, wie sich an der verkürzten Spanne bis zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit (DMSO  $t_{V50}$ = 22,6min; Paclitaxel  $t_{V50}$ =8,6min) sowie durch Erreichen eines höheren Maximums der optischen Dichte zeigte (DMSO OD-Max:1,093; Paclitaxel OD-Max: 1,177). Im Kontrast dazu verlängerte Nocodazol die Zeitspanne bis zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit und führte zur Einstellung eines Gleichgewichts auf nahezu Ausgangsniveau. In Anwesenheit von 3 $\mu$ M PDA66 ließ sich die Spanne bis zur Einstellung der halbmaximalen Geschwindigkeit nur näherungsweise berechnen, da sich bis zum Ende der Messung kein Plateau und damit keine sichere Maximalgeschwindigkeit einstellte. Dieser Versuch zeigt, in Einklang mit den in vivo- und in vitro-Vorversuchen, die depolymerisierende Wirkung des Indolylmaleimids PDA66 auf Mikrotubuli.



**Abbildung 4.8** Dynamik der Tubulin-Polymerisation über einen Zeitraum von 60 Minuten, ausgelesen über die Zunahme der optischen Dichte. Für die DMSO-Kontrolle sind die drei Phasen der Tubulin-Polymerisation, Nukleation (I), Wachstum (II) und Gleichgewichtsphase (III) aufgetragen. Diese werden durch die Behandlung mit 1 $\mu$ M Paclitaxel (PTX) verkürzt, durch die Behandlung mit 3 $\mu$ M PDA66 / 200nM Nocodazol (Noco) verlängert. Die mit destabilisierenden Substanzen behandelten Proben zeigen geringere  $V_{50}$ -Werte und erreichen kein Gleichgewichtsplateau (siehe Tabelle 4.4). N=2

	DMSO	PDA66	Paclitaxel	Nocodazol
$t_{V50}$ in min.	22,6	nicht berechenbar	8,6	nicht berechenbar
$OD_{max}$ in rel. Einheiten	1,093	1,049	1,177	1,012

**Tabelle 4.5** Die Tubulin-Polymerisation als Ausdruck der optischen Dichte.  $t_{V50}$  =Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit,  $OD_{max}$  = maximal erreichte optische Dichte. N=2

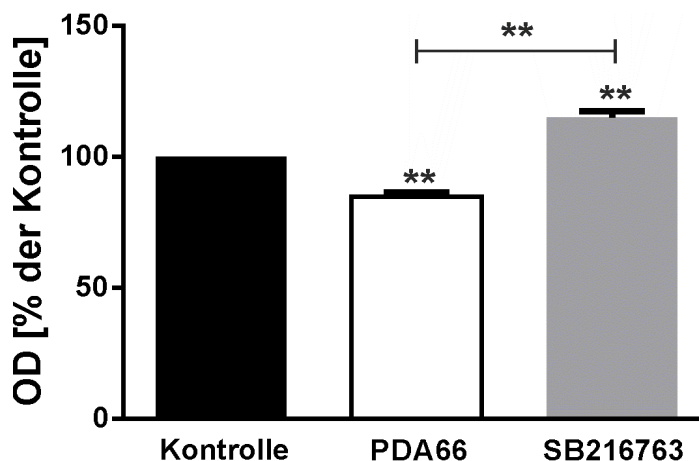
#### 4.2.3 Gesamt $\beta$ -Catenin-Gehalt

#### 4 Resultate

Nachdem die inhibitorische Wirkung von PDA66 auf die Polymerisation der Mikrotubuli gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob PDA66 als Derivat des etablierten ATP-kompetitiven GSK3 $\beta$ -Inhibitors SB216763 ebenfalls in der Lage ist, das Enzym zu hemmen. Als Messparameter wurde der Gesamt- $\beta$ -Catenin-Gehalt in differenzierenden hNPZ mittels ELISA-Test gemessen. Für diesen Versuch wurden hNPZ unter Entzug der Wachstumsfaktoren für drei Stunden in Anwesenheit von 3 $\mu$ M SB216763 bzw. 3 $\mu$ M PDA66 inkubiert, im Anschluss lysiert und der  $\beta$ -Catenin-Gehalt des Gesamtzelllysats über ein ELISA-Verfahren ausgewertet.

Anders als SB216763, welches wie erwartet einen Anstieg der optischen Dichte und damit eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zeigte (OD in rel. Einheiten, normiert gegen DMSO:  $114,92 \pm 2,42$ ), war PDA66 nicht in der Lage,  $\beta$ -Catenin in den Zellen zu akkumulieren und senkte die optische Dichte noch unter den Wert der Kontrolle (OD in rel. Einheiten, normiert gegen DMSO:  $84,87 \pm 1,59$ ).

Aus den Ergebnissen dieses Experiments folgt, dass PDA66 als Derivat von SB216763 nicht dessen Fähigkeit besitzt, über eine Akkumulation von  $\beta$ -catenin im kanonischen Wnt-Signalweg zu wirken.



**Abbildung 4.9 ELISA-Assay des  $\beta$ -catenin-Spiegels in Gesamtzelllysaten differenzierender hNPZ.** Der etablierte GSK3 $\beta$ -Inhibitor SB216763 steigert in einer Konzentration von 3 $\mu$ M die  $\beta$ -Catenin-Akkumulation gegenüber der DMSO-Kontrolle (Null-Linie) auf  $114,92 \pm 2,42\%$ . PDA66 ist nicht in der Lage, die  $\beta$ -Catenin-Konzentration zu erhöhen - die OD sinkt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf  $84,87 \pm 1,59\%$ .

#### 4.2.4 Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit von SB216763 und IM-12

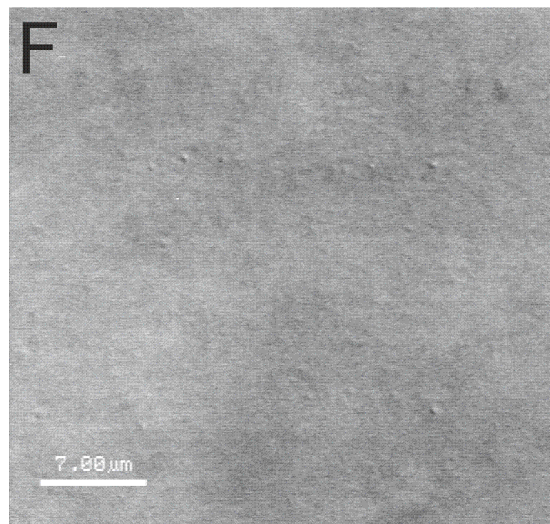
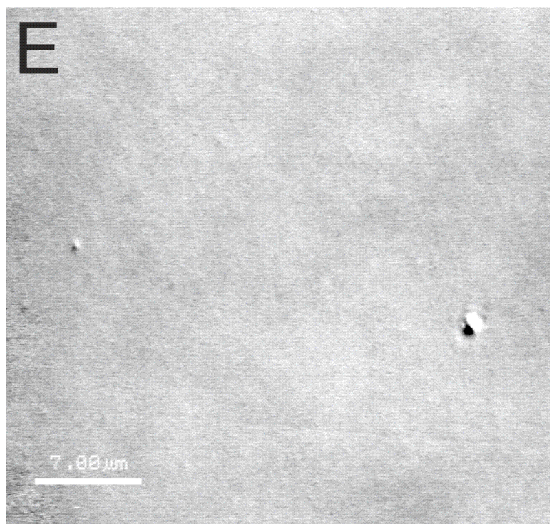
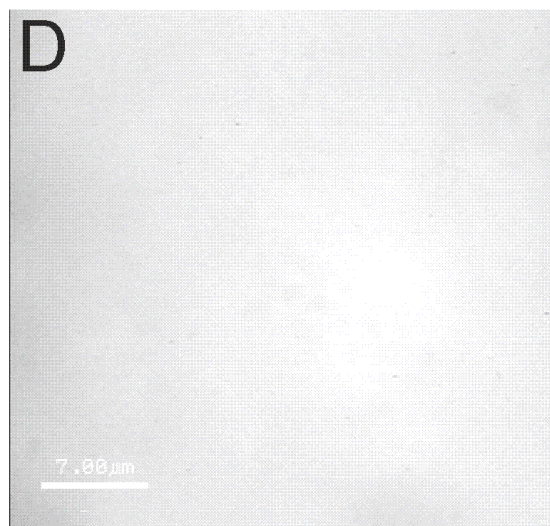
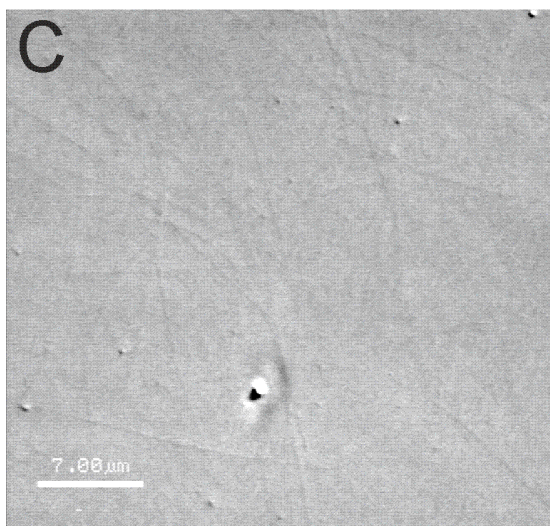
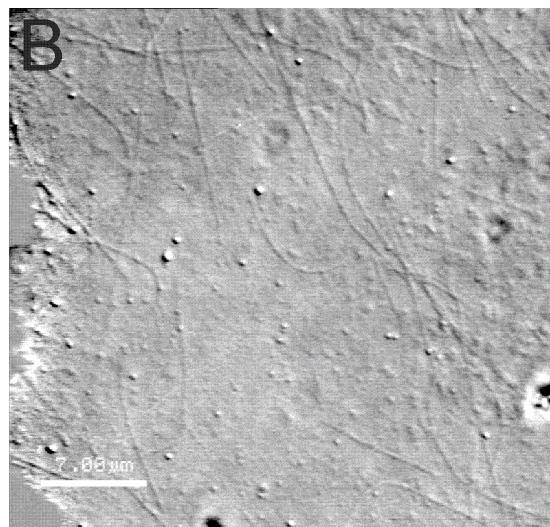
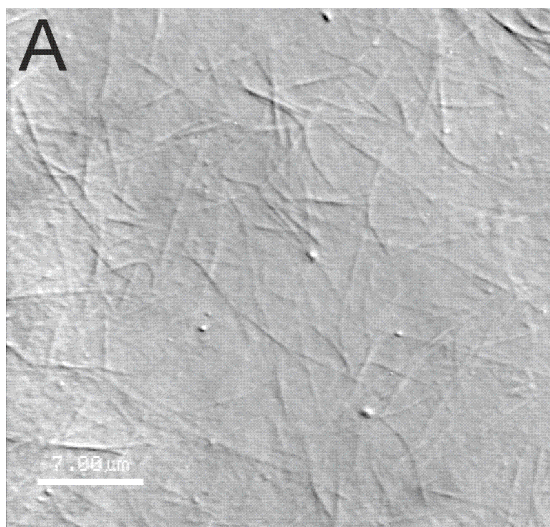
Indole wurden bereits als Inhibitoren der Tubulin-Polymerisation beschrieben (Brancale und Silvestri 2007). Um zu prüfen, ob neben PDA66 auch andere Indolylmaleimid-Derivate antimikrotubuläre Wirkung entfalten, wurden die etablierten GSK3 $\beta$ -Inhibitoren SB216763 und IM-12 (Smith et al. 2001, Schmöle et al. 2010) in dem bereits oben beschriebenen in vitro Versuch zur Analyse der Tubulin-Polymerisation mithilfe von VEC-DIC-Mikroskopie untersucht.

Unter Verwendung von Konzentrationen zwischen 3; 10 und 50 $\mu$ M zeigte sich analog zu PDA66 eine Inhibition der Tubulin-Polymerisation (Abbildung 4.10A-F). Während sich unter Behandlung mit 10 $\mu$ M SB21 die Zahl der Mikrotubuli im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verringerte und in einer Konzentration von 50 $\mu$ M keine Mikrotubuli mehr sichtbar waren, reduzierte IM-12 die Zahl der Mikrotubuli bereits in einer Konzentration von 3 $\mu$ M und inhibierte die Polymerisation vollständig in Konzentrationen von 10 bzw. 50 $\mu$ M.



#### 4 Resultate

Damit zeigen beide Substanzen analog zu PDA66 depolymerisierende Effekte, wenn auch lediglich in höheren Konzentrationen.



**Abbildung 4.10 VEC-DIC-Mikroskopie der Tubulin-Polymerisation in Anwesenheit von IM-12 und SB216763.** Analog zu PDA66 inhibieren beide Indolylmaleimide im Vergleich zur 10% DMSO-Kontrolle (A) die Tubulin-Polymerisation. 10µM SB216763 (C) reduziert die Zahl der Mikrotubuli, während in Anwesenheit von 50µM (E) die Polymerisation vollständig aufgehoben ist und keine Strukturen mehr erkennbar sind. In vergleichbarer Weise reduzieren bereits 3µM IM-12 die Zahl der Mikrotubuli (B), während 10µM (D) und 50µM (F) die Polymerisation vollständig aufheben. Die Balken im Bild entsprechen 7,0µM.

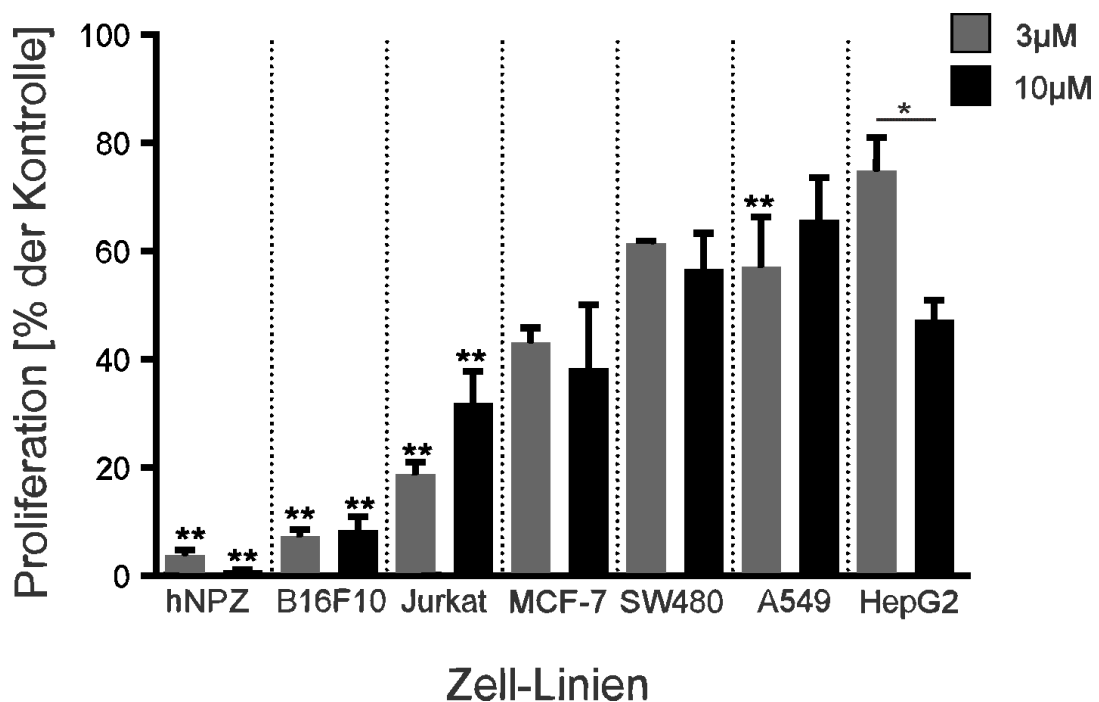
### 4.3 PDA66 als Zytostatikum

#### 4.3.1 Proliferation in Krebszelllinien

Substanzen, die antiproliferative Wirkungen über einen Arrest von Zellen im Zellzyklus verursachen, finden in der Klinik besonders in der Behandlung bösartiger Neoplasien Anwendung. Um die Wirksamkeit von PDA66 in verschiedenen Zelltypen zu prüfen, untersuchten wir die Proliferation verschiedener Krebszelllinien in Anwesenheit von 3 und 10µM PDA66 bzw. DMSO als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 24h nach Ausplattierung zum Zeitpunkt 0h behandelt und die Zellzahl nach 72h Proliferation bestimmt. In allen Zelllinien zeigte sich eine Reduktion des Wachstums in Anwesenheit von 3µM und 10µM PDA66, die unterschiedlich stark in Abhängigkeit von der behandelten Zelllinie ausfiel.

Der stärkste antiproliferative Effekt wurde in den neuralen Progenitorzellen (10µM:  $3,6 \pm 2,9\%$  der Kontrolle) und in den murinen Melanomzellen B16F10 (3µM:  $7,2 \pm 2,2\%$  der Kontrolle) beobachtet; demgegenüber fiel die Inhibition des Zellwachstum am schwächsten in den Hepatoma-Zellen HepG2 aus (3µM:  $74,8 \pm 15,5\%$  der Kontrolle).

Nicht in allen Zelllinien bestätigte sich ein stärkerer antiproliferativer Effekt durch eine höhere Konzentration, wie zuvor in den Progenitorzellen beobachtet. Eine Übersicht über die Inhibition des Zellwachstums durch PDA66 geben Abbildung 4.11 und Tabelle 4.6.



#### 4 Resultate

##### Abbildung 4.11 PDA66 inhibiert das Zellwachstum über 72h in einer Reihe von Krebszelllinien.

Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0h mit 3 bzw. 10µM PDA66 bzw. in gleichem Volumen DMSO behandelt und nach 72h gezählt. Die Grafik zeigt die Endzellzahl normiert gegen die Zellzahl der DMSO-Kontrolle. PDA66 zeigt einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum in allen behandelten Zellen, wobei die Wirkung in den hNPZ am stärksten (10µM: 0,9±0,2%) und in den HepG2-Zellen am schwächsten (3µM: 74,8±6,3%) ausfiel. In den Linien der hNPZ, MCF-7, SW480 und HepG2 zeigte sich ein stärkerer Effekt in höherer Konzentration. Nur in den HepG2-Zellen war dieser Unterschied signifikant. \*p<0,05; \*\*p<0,01

Zelllinie	Proliferation [ % der Kontrolle ]		Tabelle 4.6 Die inhibitorische Wirkung von 3 bzw. 10µM PDA66 auf die Gesamtzellzahl nach 72h
	3µM	10µM	
hNPZ	3,6±1,2	0,9±0,2	
B16F10	7,2±1,3	8,3±2,6	
Jurkat	18,7±2,2	31,9±5,9	
MCF-7	43,0±2,8	38,3±11,8	
SW480	61,3±0,6	56,6±6,6	
A549	57,1±9,2	65,7±8,0	
HepG2	74,8±6,3	47,2±3,8	

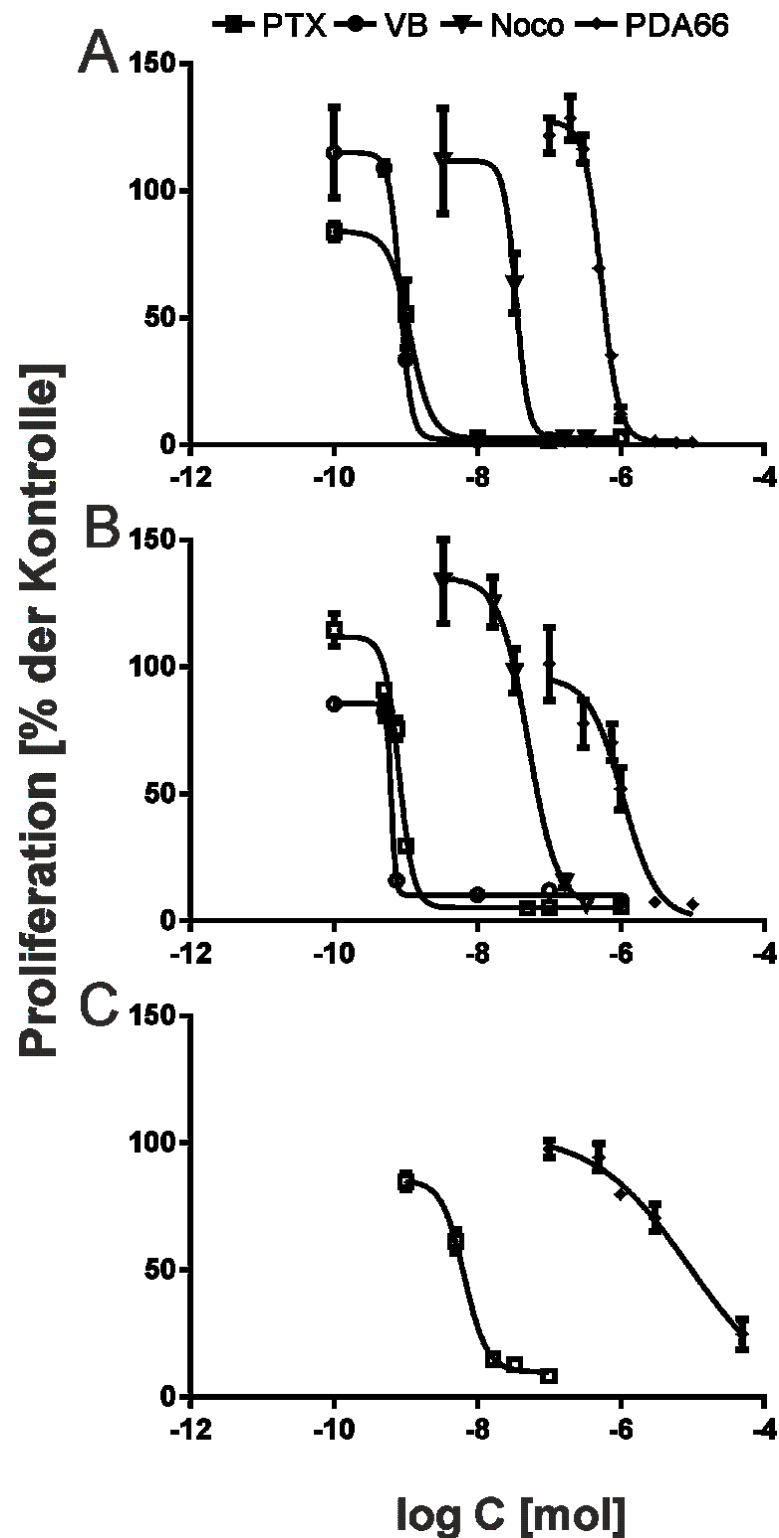
##### 4.3.2 Antiproliferative Potenz im Vergleich mit etablierten Spindelgiften

Mikrotubuli sind das Ziel zahlreicher klinisch eingesetzter Substanzen. Um die antiproliferative Potenz von PDA66 einzuordnen, wurden im Vergleich die IC<sub>50</sub>-Werte etablierter, die verschiedenen Bindungsstellen von Spindelgiften am Tubulin repräsentierender Substanzen ermittelt. Das klinisch am häufigsten eingesetzte Spindelgift Paclitaxel wurde als Repräsentant für mikrotubulistabilisierende Substanzen und Ligand der Taxan-Bindungsstelle verwendet. Vinblastin, ein Vinca-Alkaloid, das über die Vinca-Bindungsstelle an Mikrotubuli bindet, und Nocodazol, ein nicht klinisch, jedoch experimentell etabliertes Spindelgift, wurden als Vertreter der destabilisierenden Spindelgifte betrachtet. Als Vergleichsparameter diente dabei die konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation in hNPZ sowie in den Krebszelllinien B16F10 und A549.

In diesem Experiment wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0h mit den drei Referenzsubstanzen und PDA66 in Konzentrationen zwischen 1nM und 10µM sowie in entsprechenden DMSO-Volumina behandelt und die Gesamtzellzahl nach 72h Proliferation bestimmt. Aus den gegenüber der Kontrolle normierten Endzellzahlen wurden die IC<sub>50</sub>-Werte berechnet.

Der antiproliferative Effekt von PDA66 war in allen untersuchten Zelllinien konzentrationsabhängig und lag zwischen 532nM in den Progenitorzellen und 8980 nM in der Lungenkarzinom-Linie A549. Im Vergleich zu den etablierten Spindelgiften war die Potenz von PDA66 deutlich niedriger - der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert wurde für die Inhibition der Proliferation von B16F10-Zellen durch Vinblastin mit 0,628nM gemessen. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Proliferationsanalyse in Progenitor- und Krebszellen geben Abbildung 4.11 und Tabelle 4.7.





**Abbildung 4.12 zeigt die Auftragung von Proliferationsdaten verschiedener Zell-Linien in halblogarithmischer Form zur Bestimmung des antiproliferativen IC<sub>50</sub>-Wertes.**

**A) hNPZ.** Das Wirkungsfenster von PDA66 liegt in einem deutlich höheren Konzentrationsbereich als die Vergleichssubstanzen. Alle Substanzen erreichen vergleichbare Tiefst- und Höchstwerte.

**B) B16F10.** Auch in den murinen Melanomzellen liegt der Wirkungsbereich von PDA66 in höheren Konzentrationen als die Vergleichssubstanzen. Im Falle von PDA66 und Nocodazol erhöhte sich die IC<sub>50</sub> minimal, für Paclitaxel und Vinblastin wurde eine leichte Verringerung ermittelt.

**C) A549.** In der Lungenkarzinomzelllinie wurde PDA66 nur mit Paclitaxel verglichen. Auch hier lag die IC<sub>50</sub> deutlich über dem für Paclitaxel bestimmten Wert (Faktor x1361). Im Vergleich zu den Progenitor- und Melanomzellen lagen beide IC<sub>50</sub> in den A549-Zellen höher.

#### 4 Resultate

Zelllinie	Substanz	IC <sub>50</sub> in nM
hNPZ	PDA66	532,3
	Paclitaxel	1,2
	Vinblastin	0,8
	Nocodazol	34,7
B16F10	PDA66	1073,0
	Paclitaxel	0,8
	Vinblastin	0,6
	Nocodazol	51,3
A549	PDA66	8981,0
	Paclitaxel	6,6

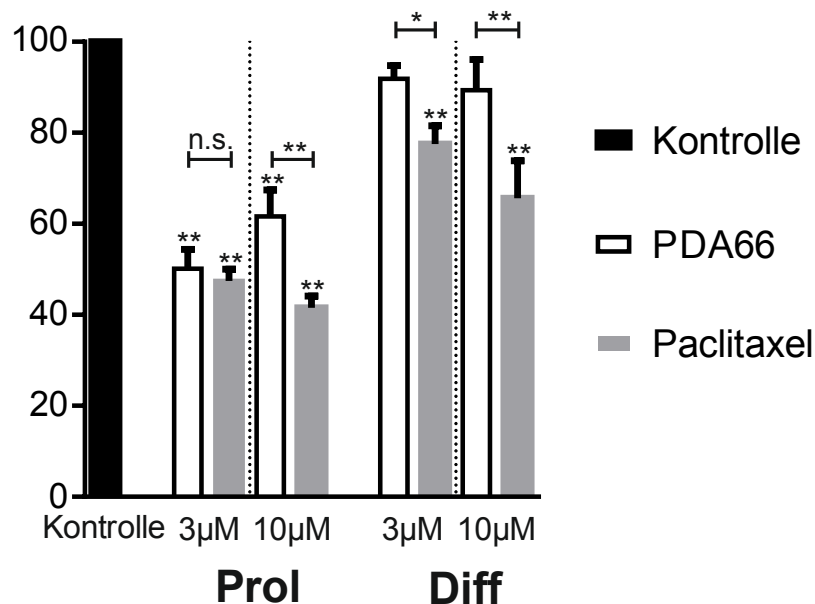
**Tabelle 4.7 Konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung in verschiedenen Zelllinien**

#### 4.3.3 Toxizität in differenzierten hNPZ im Vergleich zu Paclitaxel

Die chemotherapieinduzierte Polyneuropathie (CIPN) ist eine der häufigsten Nebenwirkungen klinisch etablierter Spindelgifte, insbesondere der Substanz Paclitaxel. Im Rahmen des Vergleichs mit klinisch angewendeten Substanzen wurde die Fähigkeit der neuronalen Progenitorzellen zur schnellen Differenzierung genutzt und der Einfluss von PDA66 und Paclitaxel auf den Metabolismus differenzierter Zellen untersucht.

In diesem Experiment wurden Progenitorzellen nach einer 24-stündigen Anwachsphase für weitere 48h mit frischem Proliferationsmedium bzw. mit Differenzierungsmedium ohne Wachstumsfaktoren behandelt. Nach dieser Vorbereitungsphase wurden die noch immer proliferierenden bzw. differenzierten hNPZ für weitere 24h mit 3 und 10µM PDA66 bzw. Paclitaxel in Proliferations- bzw. Differenzierungsmedium behandelt und über die WST1-Reduktion miteinander verglichen.

Wie in den vorherigen Experimenten beobachtet, hemmten beide Substanzen den WST1-Metabolismus in proliferierenden hNPZ, wobei die Inhibition durch Paclitaxel nur in einer Konzentration von 10µM signifikant stärker war als durch die äquimolare PDA66-Menge. Beide Substanzen reduzierten die WST1-Spaltung in differenzierten hNPZ in signifikant geringerem Ausmaß gegenüber äquimolar behandelten proliferierenden Zellen. Im Gegensatz zu den eher geringen Unterschieden zwischen beiden Substanzen in proliferierenden Zellen, fiel die Reduktion des Metabolismus durch PDA66 gegenüber äquimolaren Dosen Paclitaxel in differenzierten Zellen jeweils signifikant geringer aus. Eine Übersicht über die Resultate findet sich in Abbildung 4.13 und Tabelle 4.8.



**Abbildung 4.13 Die Reduktion der WST1-Spaltung in proliferierenden und differenzierten hNPZ unter Behandlung mit PDA66 und Paclitaxel.**

In proliferierenden Zellen (Prol) reduzieren PDA66 und Paclitaxel den Metabolismus nach 24stündiger Behandlung signifikant, während in differenzierten hNPZ nur die Behandlung mit Paclitaxel signifikant ausfällt und zu einer stärkeren Reduktion des Metabolismus gegenüber äquimolaren PDA66-Konzentrationen führt. \*p<0,05; \*\*p<0,01

WST1-Spaltung [% der Kontrolle]			
		proliferierende hNPZ	differenzierte hNPZ
PDA66	3µM	50,2±4,2	91,9±2,9
	10µM	61,6±5,8	89,4±6,7
Paclitaxel	3µM	47,5±2,6	77,6±4,0
	10µM	41,6±2,6	65,6±8,3

**Tabelle 4.8 Reduktion des Metabolismus in proliferierenden und differenzierten hNPZ infolge der Behandlung mit PDA66 bzw. Paclitaxel.**

#### 4.3.4 Akut-Toxizität im Mausmodell

Infolge der guten Ergebnisse in diversen Krebszelllinien und der deutlich geringeren toxischen Wirkung in differenzierten Zellen im Vergleich mit proliferierenden Zellen wurde PDA66 in einem in-vivo Akut-Toxizitätsmodell untersucht.

Zu diesem Zweck wurden weibliche Charles River CD1-Mäuse mit einem Gewicht von ca. 30g zu Versuchsbeginn intraperitoneal mit Dosen zwischen 5mg/kg Körpergewicht (KG) bis 200mg/kg PDA66 in 50µl DMSO bzw. mit 50µl reinem DMSO bzw. mit 50µl Aqua dest. behandelt. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere zunächst 15min. kontinuierlich, dann nach 0,5; 1; 2; 4; 24 und 48h anhand einer Auswertungsskala (siehe Methoden) auf klinische Auffälligkeiten untersucht.

#### 4 Resultate

Alle Tiere einschließlich der Kontrollgruppe benötigten direkt nach der Injektion eine 10-15-minütige Erholungsphase, die durch ein eingeschränktes Explorationsverhalten, geringere Interaktion mit den Artgenossen und fehlende Nahrungsaufnahme gekennzeichnet war. Zeichen für eine anaphylaktische Reaktion im Sinne von Kopfschütteln (leichtgradig), Dyspnoe (mittelgradig), Synkopen, Urin-Inkontinenz (schwergradig) oder Tod des Versuchstiers (schwerstgradig) wurden nicht beobachtet.

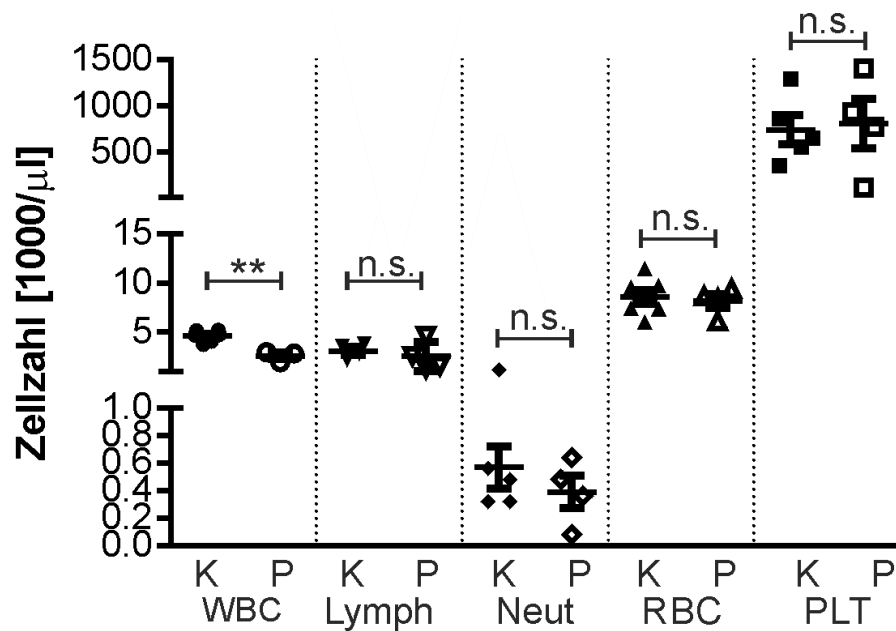
In Dosen von 50mg/kg KG PDA66 verlängerte sich die Erholungsphase mit eingeschränkter Aktivität auf ca. 30min, in Dosen von 100mg/ kg KG auf ca. 1h und in der höchsten Dosis 200mg/kg KG auf maximal 2h. Aufgrund dieses klaren Aufwärtstrends wurde die Dosissteigerung an diesem Punkt abgebrochen.

Nach der Erholungsphase zeigten die Versuchstiere keine Auffälligkeiten in ihrem Verhalten und waren bis zum Ende der Studie nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden.

Die Injektionsstellen zeigten sich bis auf eine hellrote Färbung, die durch Austritt kleinerer Mengen der tiefroten PDA66-DMSO-Lösung verursacht wurde, reizlos. Das zum Ende der Studie erhobene Gewicht zeigte keine größeren ( $>10\%$  des Ausgangsgewichts) Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten.

Der Vergleich der Blutbilder zum Studienende ergab signifikant geringere Zahlen der Leukozyten in den mit 100mg/kg KG PDA66 behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren (äquimolar DMSO bzw. Aqua dest.) (PDA66:  $2,57 \pm 0,33 \cdot 1000/\mu\text{l}$ ; Kontrolle:  $4,59 \pm 0,24 \cdot 1000/\mu\text{l}$ ). Eine genauere Betrachtung der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten als größte Subpopulationen der Leukozyten ergab jeweils niedrigere, wenn auch nicht signifikant unterschiedliche, Zellzahlen in den behandelten Tieren. Andere zelluläre Parameter des Blutbildes wie Erythrozyten- (RBC) und Thrombozytenzahl (PLT) zeigten keine wesentlichen Veränderungen unter Behandlung mit PDA66. Einen Überblick über den Vergleich des Blutbildes in Kontroll- und Behandlungstieren zeigen Abbildung 4.14 und Tabelle 4.9.

Die Erhebung der Organengewichte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchstieren ohne Substanzexposition und jenen, die mit den beiden höchsten PDA66-Dosierungen (100mg/kg KG und 200mg/kg KG) behandelt wurden. Makroskopisch fanden sich keine pathologischen Auffälligkeiten auf den Organschnittflächen, auch Anzeichen einer Peritonitis zeigten sich nicht. Die histopathologische Untersuchung der Organe zeigte ebenfalls keine Anzeichen für akut toxische Wirkungen der Substanz. Speziell in den exkretorischen Organen Leber und Niere fanden sich in der Mitbegutachtung durch einen Facharzt für Pathologie keine Nekrosen oder Ödembildung. In der histologischen Untersuchung des Lungenparenchyms fand sich keine Infiltration durch Entzündungszellen oder Verdickung der alveolären Membranen im Sinne eines Lungenödems.



**Abbildung 4.14** Veränderungen der Zahlen der Leukozyten (**WBC**), der Lymphozyten (**Lymph**), der neutrophilen Granulozyten (**Neut**), der Erythrozyten (**RBC**) und der Thrombozyten (**PLT**) unter Behandlung mit 100mg/kg KG PDA66 (**P**) bzw. in mit in gleichem Volumen mit DMSO behandelten Kontrolltieren (**K**). In den behandelten Tieren fiel die Zahl der Leukozyten signifikant 48h nach einmaliger Behandlung (PDA66:  $2,57 \pm 0,33 \cdot 1000/\mu\text{l}$ ; Kontrolle:  $4,59 \pm 0,24 \cdot 1000/\mu\text{l}$ ). Dieser Unterschied spiegelte sich andeutungsweise, jedoch nicht signifikant, im Differentialblutbild in der Zahl der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten wider. Die Zahl der Erythrozyten und Thrombozyten veränderte sich nicht signifikant. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Parameter	Kontrolle	100mg/kg KG PDA66
WBC	4,59±0,24	2,57±0,33
Lymph	3,10±0,38	2,53±0,74
Neut	0,57±0,16	0,39±0,12
RBC	8,57±0,69	8,14±0,71
PLT	743,20±158,85	807,00±266,82

**Tabelle 4.9. Vergleich der Blutbildparameter vor und nach Behandlung.**

WBC= Leukozyten; Lymph= Lymphozyten; Neut= neutrophile Granulozyten; RBC= Erythrozyten; PLT= Thrombozyten. MW±SEM

#### 4.4 Antiproliferative Effekte weiterer Indolylmaleimide

##### 4.4.1 SB21 und IM-12

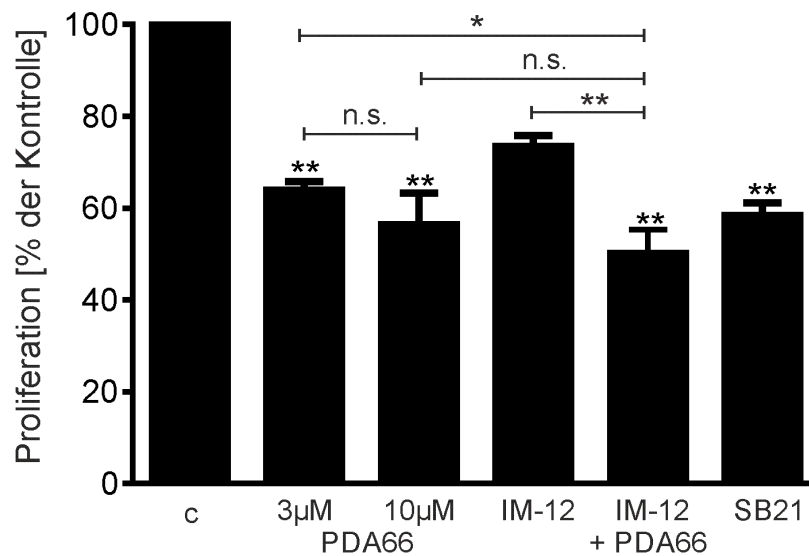
Da die Indolylmaleimide SB216763 und IM-12 bereits in hNPZ antiproliferative Effekte gezeigt hatten, wurde in einem 72-stündigen Proliferationsversuch mit SW480-Kolon-Karzinomzellen evaluiert, ob die ursprünglich als GSK3 $\beta$ -Inhibitoren eingesetzten Substanzen neben ihrer depolymerisierenden Wirkung auf isoliertes Tubulin auch antiproliferative Effekte in Krebszellen zeigen würden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach 24-stündiger Anwachsphase zum Zeitpunkt 0h mit substanzhaltigem Medium (3 $\mu\text{M}$ ) bedeckt und die Endzellzahlen nach 72-stündiger Proliferationsphase verglichen.

Im Einklang mit den Ergebnissen der Vorversuche inhibierte PDA66 sowohl in einer Konzentration von 3 als auch 10 $\mu\text{M}$  das Zellwachstum gegenüber der DMSO-Kontrolle

#### 4 Resultate

signifikant. Während IM-12 keine signifikante Reduktion der Proliferation bewirkte, war die Endzellzahl in Anwesenheit von SB216763 signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle und IM-12. SB216763 war das einzige Indolylmaleimid, das in einer Konzentration von 3µM eine stärkere Wachstumsinhibition in Karzinomzellen gegenüber den Progenitorzellen zeigte (SW480: 58,6±2,6; hNPZ: 66,1±9,2). Die gemeinsame Applikation von 3µM PDA66 und 3µM IM-12 resultierte in der niedrigsten Endzellzahl aller Versuche und war signifikant niedriger als in der mit gleichem Volumen DMSObehandelten Kontrolle sowie in der mit 3µM PDA66 bzw. 3µM IM-12 allein behandelten Probe. Gegenüber der mit 10µM PDA66 behandelten Probe fand sich kein signifikanter Unterschied. Abbildung 4.15 und Tabelle 4.10 fassen die Resultate zusammen.



**Abbildung 4.15. IM-12 und SB21 wirken antiproliferativ in Kolon-Karzinomzellen.** Die antiproliferative Wirkung wird über die Endzellzahl als % der DMSO-Kontrolle angegeben. Beide Indolylmaleimid-Derivate reduzieren die Proliferation in SW480-Zellen, der Effekt durch 3µM SB21 ist signifikant höher/niedriger im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Ko-Applikation von 3µM PDA66 und 3µM IM-12 senkt die Endzellzahl signifikant gegenüber der Kontrolle und gegenüber der jeweils alleinigen Applikation der Substanzen. Unter Ko-Applikation beider Substanzen wird die niedrigste Endzellzahl aller Proben erreicht. Signifikanzniveau gegenüber der Kontrolle unter Verwendung absoluter Zellzahlen. \*p<0,05;\*\*p<0,01

Substanz	Proliferation [% der Kontrolle]	Tabelle 4.10 Reduktion des Wachstums in Kolon-Karzinomzellen unter Verwendung verschiedener IM-Derivate bzw. deren Kombination
DMSO	100	
PDA66 3µM	64,1±1,8	
PDA66 10µM	56,6±6,6	
IM-12 3µM	73,7±2,1	
PDA66 3µM + IM-12 3µM	50,4±5,0	
SB21 3µM	58,6±2,6	

#### 4.4.2 Derivate PDA377; 396; 397-1/-2; 398; 66E

#### 4 Resultate

Infolge der überzeugenden antiproliferativen Wirkung von PDA66 in Progenitor- und Krebszelllinien galt der Fokus weiterer Untersuchungen nicht nur der weiteren Charakterisierung von PDA66, sondern ebenso der Identifikation weiterer potenter Derivate.

In Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Katalyse (LIKat) Rostock wurden weitere Indolylmaleimide synthetisiert und in proliferierenden Progenitorzellen sowie in den Krebszelllinien A549 (Lungenkarzinom) und SW480 (Kolonkarzinom) im Hinblick auf ihre antiproliferative Wirkung im Vergleich zu PDA66 untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Anwachsphase zum Zeitpunkt 0h mit Testkonzentrationen von 3 bzw. 10  $\mu$ M für 72h behandelt und die Endzellzahl nach diesem Zeitraum bestimmt.

In den Progenitorzellen zeigte eine Reihe von Derivaten potente inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum über 72h. Keine der Substanzen konnte einen signifikant stärkeren antiproliferativen Effekt als PDA66 in äquimolarer Konzentration erzielen, jedoch fiel die antiproliferative Wirkung der Derivate PDA377, 396 und 397-1 in einer Konzentration von 3  $\mu$ M und PDA377 und PDA396 jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ M nicht signifikant geringer als durch die entsprechende PDA66-Konzentration aus.

Jene Strukturen, die in den Progenitorzellen besonders effektiv waren, wurden in der Folge mit dem gleichen Versuchsaufbau in den Krebszelllinien untersucht. Die überzeugenden Ergebnissen in hNPZ bestätigten sich in den Krebszelllinien nur teilweise: in den Lungenkarzinomzellen erbrachten nur die Derivate PDA 377, 398 und 66E antiproliferative Effekte, die sich nicht signifikant von der Wirkung der Substanz PDA66 unterschieden. Das Derivat PDA377 senkte die Endzellzahl in einer Konzentration von 10  $\mu$ M sogar signifikant stärker als PDA66 in äquimolarer Konzentration (PDA377:  $29,5 \pm 5,2$  %; PDA66:  $50,3 \pm 13,0$  %). In den Kolonkarzinomzellen waren die Endzellzahlen unter Behandlung mit den Derivaten PDA377, 396 und 397-1 jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ M nicht signifikant höher als unter Anwendung von PDA66 in entsprechender Konzentration. Der inhibitorische Effekt fiel in diesen Zellen durch kein Derivat stärker als durch PDA66 aus. (siehe Abbildung 9.1.1 und Tabelle 9.1.3 im Anhang).

### **5 Diskussion**

In der Behandlung maligner Erkrankungen stellt die Chemotherapie neben der Chirurgie und der Strahlentherapie einen der drei Hauptpfeiler dar. Ziel der Behandlung ist die möglichst selektive und langfristige Zerstörung von Tumorzellen. Dazu werden in der klassischen Chemotherapie Substanzen verwendet, die besonders toxisch auf proliferationsaktive Zellen wirken. Gemein ist diesen Zytostatika die z.T. wie die Senfgase aus der militärischen Forschung (Chabner und Roberts 2005) und z.T. aus natürlichen Quellen stammen, dass es sich um hochpotente Strukturen handelt, die neben malignen Zellen auch die physiologischen Gewebe schädigen und in Form von Nebenwirkungen zu einer erheblichen Belastung der Patienten führen können. Zu den ältesten Zytostatika zählen Spindelgifte aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide und Taxane. Obwohl die Entdeckung dieser Substanzen bereits mehr als 50 Jahre im Falle der Vinca-Alkaloide (Noble et al. 1958) und über 30 Jahre im Falle der Taxane (Wani et al. 1971) zurückliegt, finden sie auch in aktuellen Therapieschemata, beispielsweise in der Behandlung von Leukämien und Karzinomen der Mamma, des Ovars, der Prostata oder der Lunge, bis heute Anwendung. Die langjährige klinische Erfahrung mit antimikrotubulären Substanzen zeigt auch die Limitationen dieser Gruppe von Pharmaka auf: Neuropathien als Ausdruck der Schädigung von Zellen mit hohem Tubulin-Anteil in der Peripherie sind die klinisch häufigsten Nebenwirkungen von Spindelgiften (Carlson und Ocean 2011, Vats et al. 1992). Da auch physiologische Gewebe mit hohem Proliferationsanteil, speziell die Vorläuferzellen im Knochenmark, durch die mitose-inhibierenden Effekte der Spindelgifte geschädigt werden, sind Myelotoxizität und daraus resultierende Leukopenien übliche, im heutigen klinischen Zusammenhang zumeist aber kontrollierbare Nebenwirkungen (Markman 2003, Goa und Faulds 1994).

Indolylmaleimide mit der Leitstruktur SB216763 wurden bereits als potente Inhibitoren des Enzyms GSK3 $\beta$  und damit u.a. als Modulatoren der neuronalen Differenzierung charakterisiert (Schmöle et al. 2010, Smith et al. 2001, Cross et al. 2001). Die Leitstruktur SB216763 wurde weiterhin bereits in verschiedenen Publikationen als aufgrund ihrer GSK3 $\beta$ -inhibitorischen Wirkung antineoplastisch wirkende Substanz im Sinne eines gezielten Therapieansatzes beschrieben (Bilim et al. 2009, Ougolkov et al. 2007, Cao et al. 2006, Shakoori et al. 2005).

Bislang nicht berichtet wurde über den Zusammenhang von Indolylmaleimiden und Spindelgiften: Indol-Motive - ein Kernbaustein der Indolylmaleimide - finden sich als wiederkehrende Struktur in einer großen Zahl natürlicher Tubulin-Inhibitoren wie den Vinca-Alkaloiden, den Tryptostatinen und Hemiasterlinen sowie in einer Vielzahl synthetischer Indole mit antimikrotubulärer und antineoplastischer Potenz (Brancale und Silvestri 2007).

Die vorliegende Studie untersucht beispielhaft an der Leitsubstanz PDA66, ob Derivate der Substanzklasse der Indolylmaleimide als wirksame Chemotherapeutika im Sinne klassischer Zytostatika in Frage kommen und im Vergleich mit etablierten Spindelgiften vorteilhafte Effekte aufweisen.



### **5.1 Die Wirkung von Indolylmaleimiden auf neurale Progenitorzellen**

#### **5.1.1 Wachstum, Metabolismus und Zellzyklus**

Die niedermolekularen Indolylmaleimide wurden in vorhergehenden Studien bereits als ATP-kompetitive Inhibitoren des Enzyms GSK3 $\beta$  beschrieben (Smith et al. 2001) und im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die neuronale Differenzierung von humanen neuronalen Progenitorzellen zu beeinflussen, untersucht (Schmöle et al. 2010). Da diese Substanzen in den Experimenten von Schmöle et al. zusätzlich das Wachstum der Progenitorzellen hemmten, wurden daraufhin weitere Derivate einem Screening auf antiproliferative Effekte in diesen hNPZ unterzogen. Die neuronalen Progenitorzellen wurden viral mit dem v-myc-Onkogen immortalisiert und tragen somit tumortypische Eigenschaften in Form eines unbegrenzten Proliferationsvermögens (Donato et al. 2007). Die leicht reproduzierbare Kultivierung und kurze Verdopplungszeit macht die hNPZ zu einem guten Screeningsystem für antiproliferative Substanzen, im Speziellen für jene mit antimikrotubulärem Wirkmechanismus, da dieser an das Durchlaufen der Mitose als Phase der stärksten Wirkung gekoppelt ist (Jordan und Wilson 2004).

Die mäßige Inhibition der Zellproliferation durch die Indolylmaleimide SB216763 und IM-12 bestätigte die Ergebnisse von Schmöle et al. (Schmöle et al. 2010), während die Derivate AB209 und PDA66 stärker antiproliferativ wirkten. Im nachfolgenden Versuch zur Konzentrationsabhängigkeit bestätigte sich die Vermutung, dass die zu Screeningzwecken eingesetzte Konzentration von 3 $\mu$ M deutlich über der ermittelten IC<sub>50</sub> von 0,532 $\mu$ M lag.

Während die Substanzen SB216763, IM-12 und AB209 zu keiner signifikanten Reduktion des Anteils vitaler Zellen führten, wirkte PDA66 zytotoxisch. Bei Betrachtung der ermittelten Ergebnisse und IC<sub>50</sub> für Endzellzahlen, Vitalität und Metabolismus deutete sich eine Diskrepanz zwischen diesen 3 Parametern an, die sich am ehesten auf die technische Unschärfe des Stromausschlussverfahrens beziehen lässt: einer deutlichen Endzellzahlreduktion auf 2,4% der Kontrolle mit mikroskopisch nahezu vollständigem Verlust der Zellen steht eine gemessene Vitalität von 53,5% gegenüber. Infolge der Behandlung mit PDA66 lagerten sich die absterbenden Zellen und Zelltrümmer zum Teil zu Aggregaten zusammen. Auch wenn dem Stromausschlussverfahren in der Literatur ein gutes Zeugnis für die Bestimmung der Zellvitalität ausgestellt wird (Lindl et al. 2005), bestätigte der nachhängende IC<sub>50</sub>-Wert von 1,250 $\mu$ M nach 72h für die Vitalität gegenüber der IC<sub>50</sub> für die Zellzahl nach 72h von 0,532 $\mu$ M die Erfahrung, dass die gemessenen Vitalitäten zwar in sich konsistent, jedoch weniger sensibel als die Auswertung der Zellzahlen waren. Die Bestimmung des Zellmetabolismus, der nach 72-stündiger Behandlung mit einem IC<sub>50</sub> von 0,730 $\mu$ M im Bereich des für die Zellzahl bestimmten Wertes lag und damit, entgegen der oben genannten Publikation (Lindl et al. 2005), sensibler ausfiel, bestätigt diese Erfahrung ebenfalls.

Zentrales Element des Wirkmechanismus der Spindelgifte ist die Arretierung von Zellen während der Mitose (Jordan und Wilson 2004): da sich die Dynamik der Mikrotubuli nach Rusan et al. in dieser Phase erheblich steigert (Rusan et al. 2001), ist sie gegenüber der

## 5 Diskussion

Inhibition durch Spindelgifte deutlich anfälliger. Gemeinhin wird die Annahme akzeptiert, dass die Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik infolge eines konstant aktiven Kontrollmechanismus, dem sogenannten „Spindle Assembly Checkpoint“, zur Arretierung der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt in der Mitose-Phase führt (Mollinedo und Gajate 2003, Jordan et al. 1993). In Bestätigung der Hypothese eines spindelinhibitorischen Mechanismus arretierte PDA66 die proliferierenden hNPZ in der G2/M-Phase mit einem Maximum von  $68.9 \pm 5.9\%$ . Eine eindeutige Diskrimination zwischen G2- und M-Phase-Zellen, beispielsweise durch Färbung von Phospho-Histon H3, das nur in mitotischen Zellen vorliegt (Hans und Dimitrov 2001), wurde in Anbetracht der weiteren Ergebnisse nicht durchgeführt.

Das Maximum der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt nach 16h steht in direktem Zusammenhang mit der durchschnittlichen Verdopplungszeit von hNPZ (16.62h) unter Kontrollbedingungen und spricht für einen phasenspezifischen Effekt: während einer Verdopplungsphase passieren nahezu alle proliferierenden hNPZ die Mitosephase und werden dort zu einem großen Teil infolge des mikrotubuli-inhibierenden Effekts arretiert. Die Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik und damit der Mitose als jene Zellzyklusphase, die infolge der starken Zunahme von Polymerisations- und Depolymerisationsprozessen der Mikrotubuli von der Funktion dieser Strukturen des Zytoskeletts abhängt (Rusan et al. 2001), macht die Spindelgifte zu sogenannten phasenspezifischen Zytostatika. Die Wirkung dieser Substanzen ist an das Durchlaufen einer bestimmten Zellzyklusphase und damit vor allem an die Dauer der Behandlung gebunden (Karow und Lang-Roth 2012). In den Experimenten zur Expositionszeit führte ein Behandlungszeitraum von 8.63h zur Reduktion des Wachstums auf 50% des Maximums mit einer Plateaubildung nach einer Behandlungszeit von 16h. Da diese Behandlungsdauer der Verdopplungszeit von hNPZ (16.62h) relativ nah kommt, ist das Ergebnis passend zu einem phasenspezifischen Effekt.

In Übereinstimmung mit einem phasenspezifischen Effekt steht auch die geringere Reduktion des Metabolismus durch PDA66 in differenzierten gegenüber proliferierenden Progenitorzellen. Wie von Lange et al. gezeigt, befinden sich nach 24h unter Differenzierungsbedingungen nur noch 3.8% der Progenitorzellen in den Zellzyklusphasen S, M, G2 gegenüber 47.1% der Zellen unter Proliferationsbedingungen (Lange et al. 2011). Da ein geringerer Anteil der Zellen die „vulnerable“ Phase passiert, wirken phasenspezifische Zytostatika hier in geringerem Maße. Unabhängig davon sind zusätzliche mikrotubuli-unabhängige Effekte, die klinisch verwendete Spindelgifte meist in höheren Konzentrationen ausüben (Klotz et al. 2012, Wang et al. 2000).

Die durchgeführten Experimente beschreiben einen zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkmechanismus der Substanz PDA66 auf das Wachstum und den Metabolismus humaner neuraler Progenitorzellen.

### **5.1.2 Induktion der Apoptose**

Sowohl Weaver und Cleveland als auch Gascoigne und Taylor beschreiben sehr unterschiedliche Reaktionen verschiedener Krebszelllinien als auch verschiedener Zellen innerhalb einer Linie auf die Behandlung mit Spindelgiften (Gascoigne und Taylor 2009, Weaver und Cleveland 2005). Als mögliche Reaktion kommt neben einer erwarteten Apoptose infolge der Arretierung in der Mitose auch eine Arretierung ohne Zelltod und Fortschritt im Zellzyklus bei Clearance der Substanz in Frage. Ferner wird der Progress von Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt in die G1-Phase und von dort in die weitere Proliferation, der Übergang in die Seneszenz oder die Induktion der Apoptose in der G1-Phase beschrieben. Passend zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen auf eine Arretierung im Zellzyklus fand sich nach einem maximalen Anteil von  $68,9 \pm 5,9\%$  der Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt nach 16h ein Abfall dieses Anteils zum 24h-Zeitpunkt auf  $47,6 \pm 7,7\%$ . Um eine gezielte Nachverfolgung der Konsequenzen einer antimikrotubulären Behandlung auch unter Beachtung intralineärer Variationen gewährleisten zu können, weisen Gascoigne und Taylor auf die Notwendigkeit der Einzelzellbeobachtung in Live-Mikroskopie-Verfahren hin (Gascoigne und Taylor 2009). Auch wenn diese Möglichkeit nicht gegeben war, konnte über die von Vermes et al. beschriebene Fluoreszenzmarkierung von Phosphatidylserin an der Außenseite von Zellmembranen der Anteil früh-apoptotischer Zellen bestimmt werden (Vermes et al. 1995). Unter der Behandlung mit  $3\mu\text{M}$  PDA66 lässt sich eine deutliche Zunahme der früh-apoptotischen Zellen beobachten: der Anteil von  $33,4 \pm 4,84\%$  AnnexinV-positiver und Propidium-Iodid-negativer Zellen nach einer Behandlungszeit von 16h korreliert mit einer stark verminderten Fraktion ungefärbter, weder apoptotischer noch nekrotischer Zellen von  $58,7 \pm 6,9\%$  aller Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (AnnexinV-/PI:  $86,4 \pm 3,6\%$ ). Neben einer kontinuierlichen Zunahme der apoptotischen Zellen kam es zu den späteren Zeitpunkten auch zu einer Steigerung der doppeltpositiven und damit nekrotischen Zellen. Dieser Effekt ist am ehesten als Resultat des Fehlens von Makrophagen in Zellkulturen zu interpretieren. Die fehlende Abräumung apoptotischer Zellen führt in der Folge zum Verlust der Membranintegrität und damit zur Vortäuschung des nekrotischen Zelluntergangs, gemessen als Positivität für Propidium-Iodid (Krysko et al. 2008). Hinweisend auf den geordneten, apoptotischen Zelluntergang im Gegensatz zur direkten Nekrose ist jedoch die initiale Zunahme frühapoptotischer Zellen nach 9h Behandlungszeit bei verzögerten und erst im Verlauf ansteigenden Anteilen von doppeltpositiven Zellen (Henry et al. 2013). Der, wenn auch in einem sehr niedrigen Prozentbereich, signifikante Anstieg Propidium-Iodid-positiver und damit nekrotischer Zellen unter 6- bis 16-stündiger Behandlung mit AB209 könnte auf einen alternativen, unspezifischeren Mechanismus hinweisen. Die Markierung von Phosphatidylserin zur Bestimmung apoptotischer Zellen ist eine weit verbreitete und anerkannte Methode, die jedoch keinen Rückschluss auf den apoptoseinduzierenden Mechanismus erlaubt (Vermes et al. 1995).

Der niedrige Anteil nekrotisch untergehender Zellen unter PDA66- bzw. AB209-Behandlung weist in Anbetracht der signifikant reduzierten Endzellzahlen in den Experimenten zur

Proliferation auf ein Mischbild zytotoxischer und zytostatischer Wirkungen als Ursache der beobachteten antiproliferativen Effekte beider Substanzen hin.

### **5.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus**

#### **5.2.1 Die Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik durch PDA66**

Zentrales Element der antiproliferativen Effekte von Spindelgiften ist die Interferenz mit der Dynamik der Mikrotubuli und damit die Inhibition der Mitose (Rusan et al. 2001, Jordan und Wilson 1998). Die Spindelgifte werden klassisch anhand ihres Einfluss auf die Tubulin-Polymer-Masse, der sich in hohen Konzentrationen einstellt, in destabilisierende und stabilisierende Substanzen eingeteilt (Hamel 1996). Die allen Substanzen gemeinsame Stabilisierung der Dynamik und damit Einschränkung der Mikrotubuli-Funktionalität wird in aktuellen Publikationen als Grundlage für die antimitotische Wirkung der Spindelgifte angesehen (Risinger et al. 2009, Jordan und Wilson 2004). Die klassische Unterscheidung zwischen destabilisierenden und stabilisierenden Substanzen ist Ausdruck der Wirkung an verschiedenen Tubulin-Bindungsstellen und dient zunächst Einteilungszwecken (Downing 2000), in Anbetracht der steigenden Diversität von Tubulin-Bindnern und der Entdeckung neuer Bindungsstellen ist die Bedeutung dieser Klassifikation jedoch nach wie vor gegeben (Calligaris et al. 2010). Zur Charakterisierung neuer Strukturen kommen hier vor allem Kompetitivassays um die jeweilige Bindungsstelle auf Basis radiomarkierter Liganden oder massenspektrometrischer Methoden sowie computergestützte Docking-Studien im Rahmen von High-Troughput-Screenings zum Einsatz (Duffy et al. 2012, Li et al. 2010).

Die im Übersichtsartikel von Brancale und Silvestri beschriebenen synthetischen Indole verdrängen mit wenigen Ausnahmen, ähnlich wie neue Tubulin-inhibitorische Indole (Lai et al. 2011, Zhao et al. 2012), radiomarkiertes [3H]Colchicin und binden damit nachweislich an die Colchin-Bindungsstelle der Mikrotubuli (Brancale und Silvestri 2007).

Die durchgeführten Versuche mit PDA66 zeigen einen depolymerisierenden Effekt auf Tubulin, sind jedoch nicht in der Lage, die vermittelnde Bindungsstelle in letzter Konsequenz aufzuklären. In Anbetracht der vorliegenden Literatur zu Indol-Derivaten mit Tubulin-inhibitorischem Effekt (Risinger et al. 2009, Downing 2000) kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die Substanzeffekte über die Colchicin-Bindungsstelle vermittelt werden. So waren ein Großteil der in der Übersichtsarbeit von Brancale und Silvestri aufgezeigten Indole Liganden der Colchicin-Bindungsstelle, ferner ließ sich keine Formation von Parakristallen, wie sie für Vinca-Alkaloide typisch wäre (Takanari et al. 1990), beobachten (Brancale und Silvestri 2007).

Im Vergleich der Ergebnisse des mikroskopischen und des photometrischen Versuchs zeigen sich geringe Unterschiede in der Potenz der tubulin-inhibitorischen Wirkung von PDA66: während bei gleicher PDA66-Konzentration in der VEC DIC-Mikroskopie keine polymerisierten Anteile des isolierten Tubulins mehr sichtbar waren, ließ sich im photometrischen Versuch eine leichtgradige Zunahme der optischen Dichte nachweisen. Diese Diskrepanz erklärt sich am ehesten durch die im Vergleich geringere Objektivität des

Mikroskopieverfahrens und eine höhere Sensitivität der minütlich über den Zeitraum einer Stunde erfolgenden Messung der optischen Dichte.

Besondere Aufmerksamkeit haben die depolymerisierenden Spindelgifte - insbesondere jene, die ihre Effekte über die Colchicin-Bindungsstelle vermitteln - in Form der neuen Zytostatikaklasse der „vascular disrupting agents“ (VDAs) erfahren. Primäres Target dieser Substanzklasse ist die Vaskularisation solider Tumoren (Tozer et al. 2005), deren Zerstörung zum Zusammenbruch der Blutversorgung und damit zur Nekrosebildung führt. Zentraler Angriffspunkt dieser Substanzen sind die proliferierenden Endothelzellen in Tumor-versorgenden Gefäßen. Während Cytokin-freisetzende Substanzen wie die Flavinoide mit der Leitsubstanz DMXAA (Wilson et al. 1998) tubulin-unabhängig wirken, bilden die Tubulin-inhibierenden Substanzen die zweite große Gruppe der VDAs. Die Combretastatine als Colchicin-Bindungsstellen-Effektoren gelten hier als Leitstrukturen (Siemann 2011) und befinden sich in der fortgeschrittenen klinischen Testung (Zweifel et al. 2011).

Da VDAs als Einzelmedikation nicht zur kompletten Zerstörung des Tumors führen, sondern vitale Tumorzellen in den noch gut durchbluteten Randbereichen zum erneuten Wachstum führen können, zeigten die klinischen Studien nur moderate Ergebnisse, während hohe Erwartungen an Kombinationstherapien mit üblichen Zytostatika gestellt werden (Patterson und Rustin 2007). Synthetische Indole könnten als potentielle Liganden der Colchicin-Bindungsstelle ebenfalls als vascular disrupting agents in Frage kommen.

### **5.2.2 Einfluss auf den $\beta$ -catenin-Spiegel in hNPZ**

Im Gegensatz zur Substanz SB216763 führte die PDA66-Behandlung nicht zur Akkumulation von  $\beta$ -catenin in Gesamtzelllysaten differenzierender humaner neuraler Progenitorzellen; im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte sich gegenteilig eine signifikante Reduktion auf  $84,87 \pm 1,59\%$  des Kontrollniveaus. PDA66 ahmt somit nicht den GSK3-inhibitorischen Effekt der Leitsubstanz SB216763 mit konsekutiver  $\beta$ -catenin-Akkumulation nach. Dieses Ergebnis verdeutlicht den komplexen Zusammenhang zwischen kleineren strukturellen Veränderungen, die zu maßgeblichen Veränderungen der Bindungsaktivitäten an erwartete Ziele führen und unterstreicht die Arbeit von Schmöle et al., in der nur ein einziges Derivat von SB216763 ähnlich potente Effekte wie die Leitsubstanz zeigte (Schmöle et al. 2010). Die Reduktion des Gesamt- $\beta$ -Catenin-Spiegels erklärt sich am ehesten über die Aktivitätssteigerung des Enzyms GSK3 $\beta$  im Rahmen pro-apoptotischer Stimuli (Bhat et al. 2000). Eine aktivierende Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  infolge erhöhter Calcium-Spiegel (Hartigan 1999), die auch bei Behandlung mit Spindelgiften auftreten können (Liao et al. 2008), konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht weiter untersucht werden. Als eine mechanistische Erklärung für die Senkung des Gesamt- $\beta$ -catenin-Spiegels muss auch die räumliche Annäherung des membranös an Cadherine gebundenen  $\beta$ -Catenin-Pools (Howard et al. 2011) an GSK3 $\beta$  und damit einer erhöhten Degradation im Rahmen des Kollaps des Zytoskeletts diskutiert werden. Die in der vorliegenden Studie durchgeführten ELISA-Untersuchungen können lediglich Aussagen über den Gesamt- $\beta$ -Catenin-Spiegel treffen. Zur

genaueren Beurteilung wären Messungen des nukleären gegenüber dem zytoplasmatischen  $\beta$ -catenin-Anteils notwendig. Weniger wahrscheinlich, jedoch im Rahmen der vorliegenden Studie nicht sicher auszuschließen, ist eine Katalyse der aktivierenden Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  an Tyrosin216 (Hughes et al. 1993), wie im Falle der Tyrosinkinase Fyn vorbeschrieben (Lesort et al. 1999) oder ein Ausfall der inhibitorischen Phosphorylierung des Enzyms an Serin9, wie im Falle der Inhibition von Akt beschrieben (Frame et al. 2001).

### 5.2.3 SB216763 und IM-12 als Tubulin-Inhibitoren

Während PDA66 keine GSK3-inhibitorische Funktion besitzt, zeigten die als GSK3-Inhibitoren beschriebenen Indolylmaleimide IM-12 und SB216763 depolymerisierende Effekte auf isoliertes Tubulin im VEC DIC-Mikroskopieverfahren. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der ebenfalls antiproliferativen Wirkung beider Substanzen auf das Wachstum der Progenitorzellen. Während die berichteten GSK3-inhibitorischen-IC<sub>50</sub> im nanomolaren Bereich liegen (Schmöle et al. 2010: 92nM für SB216763; 53nM für IM-12; Coghlan et al. 2000: 34nM für SB216763), zeigten sich die tubulin-inhibitorischen Effekte unter Einbeziehung einer leicht zu überschätzenden Messung durch das Mikroskopieverfahren (s.o.), im mikromolaren, also 100-1000fach höheren Konzentrationsbereich.

Entgegen den beschriebenen depolymerisierenden Effekten auf isoliertes Tubulin wurde in der Studie von Lange et al. kein Einfluss von SB216763 auf die Zellzyklus-Distribution der hNPZ beschrieben (Lange et al. 2011). Dabei wurde allerdings nur eine Konzentration von 3 $\mu$ M und damit ein Bereich, der in isoliertem Tubulin kaum Effekte hatte, getestet.

Eine Diskrimination zwischen mikrotubuli-abhängiger Zellzyklusarretierung ließe sich über die reine Bestimmung der Anteile von Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen nur schwer abgrenzen, da GSK3 $\beta$  selbst Einfluss auf den Zellzyklus ausübt. So führt die GSK3 $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Cyclin D zum Export und zur abschließenden Degradation dieses Proteins. Im Zusammenspiel mit den Cyclin-abhängigen-Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) bewirkt Cyclin D die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und führt damit zur G1-zu-S-Transition im Zellzyklus (Diehl et al. 1998). Da die Aktivität von GSK3 $\beta$  zur Zellzykluskontrolle beiträgt, schlagen Takahashi-Yanaga und Sasaguri sogar den Einsatz von GSK3 $\beta$ -Aktivatoren/GSK3-aktivierenden Mechanismen in der antineoplastischen Therapie vor (Takahashi-Yanaga und Sasaguri 2008). Demgegenüber beschreiben Wang et al. und Kunnimalaiyaan et al. die Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>, einem CDK-Inhibitor, und die daraus folgende Zellzyklus-Arretierung durch GSK3 $\beta$ -Inhibition (Wang et al. 2008, Kunnimalaiyaan et al. 2007). Während Wang et al. jedoch von einer Arretierung in der G1-Phase berichten - ein Ergebnis, das mit der Inhibition Cyclin-abhängiger-Kinasen durch p27 korrespondiert - berichten Kunnimalaiyaan et al. von einem G2/M-Arrest durch hohe Konzentrationen der GSK3-Inhibitoren SB216763 (bis zu 30 $\mu$ M) und Lithiumchlorid (bis zu 20mM). Im Falle von Lithiumchlorid berichteten auch Nowicki et al. von einer ähnlichen G2/M-Arretierung in Gliom-Zellen (Nowicki et al. 2008). In keiner der aufgeführten Studien wurden nähere Untersuchungen zur Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Mikrotubuli aufgeführt.

## 5 Diskussion

Vor dem Hintergrund der gezeigten Tubulin-inhibitorischen Wirkung verschiedener Indolylmaleimide wären diese Ergebnisse ebenfalls gut vereinbar mit einer Arretierung infolge eines antimikrotubulären Wirkmechanismus. In Anbetracht der hohen biologischen Aktivität von Indolen beispielsweise als Kinase-Inhibitoren, als Agonisten extra- und intrazellulärer Rezeptoren, als reverse Transkriptase-Inhibitoren oder als Spindelgifte (Zhao et al. 2008, Roach et al. 2008, Brancale und Silvestri 2007, Chambers et al. 1999, Xie et al. 1995) muss die Zuordnung von Wirksamkeiten in verschiedenen Signalwegen zum maßgeblichen antiproliferativen Effekt in Krebszellen mit Bedacht erfolgen: da überlappende Effekte nicht unwahrscheinlich sind, sollten passende Befunde, wie ein Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase, die Auslösung der intrinsischen Apoptosekaskade oder auffällige zellmorphologische Veränderungen Anlass zu einem Screening auf antimikrotubuläre Effekte geben, um diese einfachen strukturellen Veränderungen als ursächlich auszuschließen bzw. zu erkennen, bevor mögliche Veränderungen an Signalwegen weiter untersucht werden.

### **5.3 PDA66 als Zytostatikum in Krebszelllinien**

PDA66 zeigte in allen Krebszelllinien antiproliferative Effekte. Da die unbegrenzte Proliferation eine zentrale Eigenschaft aller Krebszelllinien darstellt und die Spindelgifte durch Inhibition der Mikrotubuli-Dynamik insbesondere in der Zellteilungsphase aktiv sind (Dumontet und Sikic 1999), ist eine prinzipielle Wirkung dieser Substanzen in allen teilungsaktiven Zellen zu erwarten. In enger Beziehung zu diesem Mechanismus steht die bessere Wirksamkeit der Spindelgifte in Zellen mit kürzerer Verdopplungszeit: je häufiger eine Zelle die vulnerable Phase - im Falle der Spindelgifte die Mitose - passiert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie in einem der Zyklen die Apoptose auslöst. In Anbetracht der Ergebnisse zur Reduktion des Wachstums über 72h in Anwesenheit von 3 und 10µM PDA66 bestätigte sich diese Annahme nur zum Teil: die humanen neuralen Progenitorzellen und die murinen Melanomzellen zeigten das stärkste Ansprechen auf die Behandlung mit dem Spindelgift und hatten die kürzesten Verdopplungszeiten aller getesteten Zelllinien (16 bzw. 15h). Die starke Endzellzahlreduktion in den Jurkat-T-ALL-Zellen erklärt sich hingegen ebenso wenig allein über die Verdopplungszeit wie die geringere antiproliferative Wirkung in SW480-, A549- und HepG2-Zellen.

Die drei exemplarisch ausgewerteten Zell-Linien hNPZ, B16F10 und A549 wurden konzentrationsabhängig durch PDA66 in ihrem Wachstum gehemmt. Die in den B16F10-Zellen ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für Paclitaxel bzw. Vinblastin lagen mit 0.8 nM bzw. 0.6nM geringfügig unter den in der Literatur gefundenen effektiven Dosen im zweistellig nanomolaren Wirkungsbereich. Die aktuell geringfügig höheren Konzentrationen in den Vergleichsarbeiten lassen sich zum einen auf die Verwendung einer anderen Methode in Form des MTT-Experiments (Koudelka et al. 2009) als Auswerteparameter für die Proliferation, zum anderen auf die fehlende Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte (Jordan et al. 1985) zurückführen. Auffällig war die höhere IC<sub>50</sub> in den A549-Lungenkarzinomzellen sowohl für Paclitaxel (im Vergleich zur niedrigsten IC<sub>50</sub> in den B16F10-Zellen um den Faktor 8.3) als

auch für PDA66 (im Vergleich zur niedrigsten  $IC_{50}$  in den hNPZ um den Faktor 16.9). Einen Anhaltspunkt für die geringere Sensitivität der Lungenkarzinomzellen bietet die Studie von Galán-Malo et al.: die Autoren zeigen, dass A549-Zellen höhere Spiegel des antiapoptotischen Protein Bcl-x<sub>L</sub> und ein höheres Verhältnis von Bcl-x<sub>L</sub> zum proapoptotischen Protein Bak aufweisen (Galán-Malo et al. 2012). Das geringere Ansprechen der Zelllinie auf das Spindelgift steht in Einklang mit dem von Gascoigne und Taylor sowie Matson und Stukenberg beschriebenen Modell, nach dem die Entscheidung über das Zellschicksal aus dem mitotischen Arrest infolge der Behandlung mit Spindelgiften einen Wettlauf zwischen proliferationsfördernden und proapoptotischen Zellmechanismen darstellt (Matson und Stukenberg 2011, Gascoigne und Taylor 2008). Durch hohe Spiegel des antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub> verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Richtung der proliferationsfördernden Mechanismen. Diese erlauben den Zellen, die Mitose zu verlassen (mitotic slippage) und die G1-Phase zu erreichen. Von dort können sie dem Zellzyklus folgen, seneszent werden oder p53-vermittelt die Apoptose auslösen (Galán-Malo et al. 2012, Gascoigne und Taylor 2009). Dieser Sachverhalt spiegelt ferner die undurchsichtige Situation in der klinischen Anwendung von Spindelgiften wider: die Annahme, dass Spindelgifte unabhängig von ihrem polymerisierenden oder depolymerisierenden Mechanismus in hohen Konzentrationen in klinisch relevanten Dosierungen gleichartig mit der Mikrotubuli-Dynamik interferieren, ist weit verbreitet (Risinger et al. 2009, Jordan und Wilson 2004). Nichtsdestotrotz sind die Einsatzbereiche in der antineoplastischen Therapie teils sehr unterschiedlich. Paclitaxel ist in der Behandlung solider Tumoren wie dem Mamma-Karzinom, dem Ovarial-Karzinom oder dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom zugelassen (Rowinsky und Donehower 1995). Demgegenüber erbrachten Studien zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen wie non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) mit Ansprechraten (Teil- und komplette Remissionen) von 17-23% bei rekurrenten bzw. stark vorbehandelten NHL (Kahl et al. 2005, Press et al. 1998, Wilson et al. 1995) keine überzeugenden Ergebnisse gegenüber der Standardtherapie. Lerner und Andrea diskutieren den fehlenden Vergleich zur Wirksamkeit von Paclitaxel in erstbehandelten NHL-Patienten und führen Studien, in denen Vincristin in der Behandlung vorbehandelter NHL-Patienten ähnlich moderate Ergebnisse zeigte, (26 bzw. 17% Ansprechen) an (Lerner und Andrea 2005, Desai et al. 1970, Carbone et al. 1968). Im Rahmen einer fundamentalen Kritik argumentieren Lerner und Andrea, dass Zellkultursysteme als Modelle für die Testung antimikrotubulärer Substanzen nicht die Komplexität von Neoplasien in vivo darstellen können (Lerner und Andrea 2005). Weiterhin stellen die Autoren den anti-mitotischen Wirkmechanismus der Spindelgifte in Zellkulturen als zentrale Ursache für klinische Effekte in Frage, da Substanzen wie die Vinca-Alkaloide ebenfalls apoptotische Effekte in nicht proliferierenden Zellen auslösen (Vilpo et al. 2000). Komlodi-Pasztor et al. führen das Versagen rein anti-mitotischer Substanzen wie Aurorakinase-, Polo-like-Kinase- und Kinesin-Spindle-Protein-Inhibitoren mit Ansprechraten von durchschnittlich 1.6% (eigene Meta-Analyse der Autoren) in einer Gruppe solider Tumoren auf die Fehlinterpretation der Mitose als effektivste Phase von Spindelgiften zurück



## 5 Diskussion

(Komlodi-Pasztor et al. 2012). Den Erfolg in präklinischen in vitro- und in vivo-Tumormodellen führen sie auf, für klinische Tumoren nicht beispielhafte, extrem hohe Teilungsraten zurück. Die klinische Effektivität klassischer Spindelgifte weisen die Autoren zellzyklusunabhängigen Zielen, wie den gestörten Verschiebeprozessen intrazellulärer Proteine zu.

Auch im Falle von Paclitaxel sprechen das Fehlen eines Vorteils langer Infusionszeiten von bis zu 96h gegenüber kurzen Infusionszeiten bis zu 3h in Mamma-, Ovarial- und verschiedenen Adenokarzinomen (Williams und Bryant 2011) ebenso wie die fehlende Überlegenheit dosis-dichter Behandlungsschemata in Patientinnen mit lymphknoten-positiven Mamma-Karzinomen (Moebus et al. 2010) für die vordergründige Wirkung zellzyklusunabhängiger Effekte.

Die Beurteilung der Wirkung von Spindelgiften auf zellulärer Ebene wird zusätzlich erschwert durch die von Gascoigne und Taylor sowie Weaver und Cleveland postulierten unterschiedlichen Reaktionen nicht nur in unterschiedlichen Zelllinien, sondern auch in unterschiedlichen Zellen einer Zelllinie (Gascoigne und Taylor 2008, Weaver und Cleveland 2005).

Ein weiteres Beispiel für die begrenzte Aussagekraft von Zellkulturmodellen für die klinische Wirksamkeit sind Substanzgruppen wie die Cryptophycine oder Dolastatine, die in Zelllinien potente Effekte erbrachten, in klinischen Studien jedoch keine Wirkung zeigten (Edelman 2003, Krug et al. 2000).

Unabhängig von den Differenzen in präklinischen Modellen und klinischen Therapiestudien lässt sich die Wirkung eines Pharmakons als Determinante seiner Pharmakokinetik und seiner Pharmakodynamik beschreiben. Beide Eigenschaften sind hochvariabel zwischen den verschiedenen Substanzen und zum Teil durch typische Resistenzen in Krebszellen belegt.

Im Falle der Vinca-Alkaloide konnten Jackson und Bender zeigen, dass deren Wirksamkeit in murinen und humanen Leukämiezellen eine Funktion der Behandlungszeit und Substanzkonzentration darstellt (Jackson und Bender 1979). Anhand von Beobachtungen in humanen Hepatozyten konnten Zhou et al. einen Zusammenhang zwischen intrazellulärer Substanzkonzentration und Lipophilie der Strukturen herstellen (Zhou et al. 1994).

Ferguson und Cass beobachteten in HL-60-Leukämie-Zellen einen „Konzentrierungs-Effekt“ der Vinca-Alkaloide Vincristin und Vinblastin (intra-zu-extrazelluläres Konzentrationsverhältnis jeweils >100) und sahen in der nachfolgenden schnelleren Depletierung von Vinblastin eine mögliche Erklärung für die stärkeren antiproliferativen Effekte von Vincristin (Ferguson und Cass 1985).

Auch wenn Ferguson und Cass zeigen konnten, dass der Ausstrom von Vinblastin aus HL-60-Zellen energieunabhängig erfolgt, wurde in verschiedensten Zellkulturmodellen gezeigt, dass die häufig hochmolekularen und aus natürlichen Quellen stammenden Spindelgifte gute Substrate für ABC-Transporter wie P-Glycoprotein (Ambudkar et al. 1999) darstellen und die Zellen damit resistent gegenüber diesen Substanzen machen. Eine Übersicht dazu bietet die Arbeit von Lage (Lage 2008).

## 5 Diskussion

Niedermolekulare Substanzen sind teilweise selbst Substrate der Transporter und sind parallel in der Lage die Aktivität der Transporter inhibitorisch zu modulieren (Mandery et al. 2012) und die intrazellulären Konzentrationen der anderer Substrate zu erhöhen. Dieser Umstand könnte hinweisend auf eine vorteilhafte Ko-Applikation von PDA66 mit anderen Medikationen sein, auch wenn der klinische Beweis für die Vorteilhaftigkeit von Transporter-Modulatoren bislang ausblieb (Lee 2010). Inwiefern PDA66 aufgrund seiner Struktur als Substrat von ABC-Transportern in Frage kommt und ob die Substanz therapeutische Spiegel erreichen kann, müssen weitere Studien in Zellkulturexperimenten erbringen.

Als weitere Ursache für die unterschiedliche Wirkung von Spindelgiften in unterschiedlichen Zelltypen wird die variierende Expression von Tubulin-Isotypen in verschiedenen Geweben diskutiert (Jordan und Wilson 1998). Während die Verteilung der Tubulin-Isotypen spezifisch für die verschiedenen Körpergewebe ist, wurden Veränderungen insbesondere des  $\beta$ -Tubulin-Anteils - und damit der Bindungsstelle der meisten Tubulin-inhibitorischen Substanzen (Downing 2000) - in verschiedenen resistenten Zellkulturmodellen und Patientenmaterialien beobachtet (Kavallaris et al. 2001, Kavallaris et al. 1997). Veränderungen der Tubulin-Isotypen, besonders die Veränderung der  $\beta$ -III-Tubulin-Spiegel, spielen Sève und Dumontet zu Folge eine besondere Rolle in der Resistenzbildung gegenüber Taxanen und Vinca-Alkaloiden (Sève und Dumontet 2008). Dabei wirkt die erhöhte Expression von  $\beta$ -III-Tubulin nach Gan et al. sowohl über einen tubulin-abhängigen Resistenzmechanismus bei niedrigen Spindelgiftkonzentrationen und einen tubulin-unabhängigen Resistenzmechanismus bei hohen Spindelgiftkonzentrationen (Gan et al. 2010). Stengel et al. zeigen die uneingeschränkte Wirkung von Liganden der Colchicin-Bindungsstelle in Mamma-Karzinomzelllinien mit verändertem  $\beta$ -III-Tubulin-Spiegel (Stengel et al. 2009). Eine potentielle Wirkung von PDA66 in Tumoren mit  $\beta$ -III-Tubulin-vermittelten Resistenzen muss in der Folge näher untersucht werden.

Gehäuft finden sich in Berichten zu neuen tubulin-inhibitorischen Substanzen Experimente mit Spindelgift-resistenten Zelllinien (Li et al. 2012, Liberatore et al. 2008). Barlow et al. konnten zeigen, dass die Etablierung resistenter Tumorzelllinien zu dauerhaften Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik und damit zur Entstehung Spindelgift-abhängiger Zelllinien führt (Barlow et al. 2002). Hari et al. zeigen darüber hinaus eine erhöhte Sensitivität für Paclitaxel in Colcemid- und Vinblastin-resistenten Zellen (Hari et al. 2003). Da die Züchtung Spindelgift-abhängiger Zellen mit deutlich erhöhter Sensitivität für Spindelgifte mit anderem Wirkmechanismus wenig klinische Relevanz hat, müssen Studien zu Resistenzen gegen Spindelgifte auf dem Boden selektionierter Zelllinien sehr kritisch betrachtet werden.

### **5.4 Toxische Nebenwirkungen von PDA66**

#### **5.4.1 Akuttoxizität im in vivo Modell**

Die Proliferationsversuche mit dem Indolylmaleimid PDA66 ergaben in allen untersuchten Zelllinien höhere  $IC_{50}$ -Werte und somit eine geringere Potenz im Vergleich zu den klinisch etablierten Spindelgiften Paclitaxel und Vinblastin.

Neben der Fähigkeit, möglichst effektiv Tumorzellen zu schädigen, entscheidet über die klinische Anwendbarkeit klassischer Zytostatika, die durch fehlende Spezifität auch physiologische Gewebe schädigen, ein möglichst günstiges Nebenwirkungsprofil. Hypersensitivitätsreaktionen (HSR) im Sinne einer Typ I-Immunreaktion sind eine häufige Nebenwirkung der Behandlung mit Paclitaxel. In der Übersichtsarbeit von Weiss et al. zeigen 32 von 301 berichteten Patienten (15,5%) typische Zeichen einer Hypersensitivitätsreaktion wie Dyspnoe, Hypotension, Bronchospasmen, Urtikaria und Ausschlag zumeist innerhalb der ersten 10 Minuten nach Behandlung (Weiss et al. 1990). Wenngleich eine Prämedikation mit Glukokortikoiden und Anti-Histaminika zum klinischen Standard gehört, werden Hypersensitivitätsreaktionen teils mit fatalem Ausgang nach wie vor beobachtet (Kloover et al. 2004, Kwon et al. 2002). Wang et al. beschreiben in ihrer Arbeit die Untersuchung anaphylaktischer Reaktionen in Mäusen über eine Akut-Beobachtung, die Messung der Histaminausschüttung und Komplementaktivierung im Serum sowie über die histopathologische Begutachtung der Lunge (Wang et al. 2013).

In der mit PDA66-durchgeführten Akut-Toxizitätsstudie ließ sich bei Beschränkung auf die Akutbeobachtung der Tiere sowie die histopathologische Untersuchung der Organe kein Anhalt für eine akut-toxische Wirkung im Sinne einer anaphylaktischen Reaktion erheben. Die verlängerten Erholungszeiten für PDA66-behandelte Tiere gegenüber Kontrolltieren ab einer Dosis von 50mg/kg KG und mehr lässt einen substanzeigenen Effekt vermuten.

Einen weiteren indirekten Hinweis auf das Erreichen von Substanzspiegeln im Blutplasma und die Entfaltung einer in-vivo-Wirksamkeit erbrachte die Untersuchung des Blutbildes: die einmalige intraperitoneale Behandlung von Versuchstieren mit 100mg/kg KG PDA66 reduzierte 48h post injectionem die Zahl der Leukozyten (signifikant) und Erythrozyten. Dies steht in Übereinstimmung mit dem vermuteten unspezifischen, Mikrotubuli-abhängigen Wirkmechanismus, der insbesondere Gewebe mit hoher Teilungsaktivität wie die Zellen der Hämatopoese schädigt.

Der daraus folgenden häufigen Nebenwirkung der Neutropenien wird in heutigen Therapieschemata mit koloniestimulierenden Wachstumsfaktoren begegnet (Graczyk et al. 2013).

Die minimale Erhöhung der Thrombozytenzahl unter PDA66-Behandlung steht im Gegensatz zur angenommenen unspezifischen Schädigung proliferierender Gewebe, da auch die Megakaryozyten als Generatoren der Thrombozyten aus schnell proliferierenden myeloischen Progenitorzellen entstehen (Lüllmann-Rauch 2012). Da die Einzelwerte für diesen Parameter jedoch eine hohe Variation zeigten, ist am ehesten von einem unspezifischen Ergebnis auszugehen.

### 5.4.2 Neurotoxizität im in vitro Modell

Während Hypersensitivitätsreaktionen sowie hämatologische Toxizität weitestgehend über Begleitmedikationen kontrolliert werden können, bleiben die durch Spindelgifte hervorgerufenen Neuropathien eine häufige und teils dosislimitierende Nebenwirkung (Carlson und Ocean 2011). Während Persohn et al. neurotoxische Schäden im Tiermodell über neurophysiologische Messungen und neuropathologische Befundung evaluierten (Persohn et al. 2005), bleibt in Anbetracht einer hohen Zahl neuer Substanzen unter verschiedensten Indikationen die Notwendigkeit für Tierexperiment-freie Ansätze mit hoher Durchsatzkapazität. In ihrer Übersichtsarbeit diskutieren Breier et al. die Vor- und Nachteile der Verwendung multipotenter neuraler Progenitorzellen für Toxizitätsanalysen: während diese Zellen eine stabile und schnell reproduzierbare Ressource für die Testung neuronaler Gewebe darstellen, bleibt in den immortalisierten Zelllinien ein Unsicherheitsfaktor über die Konsequenzen der Transformierung für die Ähnlichkeit zur physiologischen Entwicklung (Breier et al. 2010). Die humane neurale Progenitorzelllinie ReNCell Cx wurde, analog zu den ReNCell VM, mit v-myc immortalisiert und wurde bereits durch Breier et al. zur Testung potentiell neurotoxischer Substanzen verwendet (Breier et al. 2008). Die Autoren leiteten den Einfluss der Substanzen auf die Proliferation, gemessen über die BrdU-Inkorporation sowie auf die Vitalität, bestimmt über die Fähigkeit zur Propidium-Iodid-Exklusion, ab.

Auch die in dieser Studie verwendeten neuralen Progenitorzellen ReNcell VM weisen die Fähigkeit zur trilineären Differenzierung auf und sind somit in oben aufgeführter Begrenzung geeignet für eine einfache Screeninguntersuchung.

Sowohl PDA66 als auch Paclitaxel in äquimolarer Konzentration reduzierten wie erwartet die Formazan-Salz-Spaltung in proliferierenden Zellen signifikant, analog zu den von Breier et al. beobachteten Wirkungen bekannter antiproliferativer Substanzen in ReNcell Cx-Zellen (Breier et al. 2008). Demgegenüber war die inhibitorische Wirkung von PDA66 in differenzierten Zellen deutlich geringer (in 3µM: 91,9±2,9; in 10µM: 89,4±6,7 der Kontrolle) und nicht signifikant, während die Reduktion durch Paclitaxel signifikant stärker ausfiel (3µM: 77,6±4,0%; 10µM: 65,6±8,3% der Kontrolle). Eine geringer ausfallende Wirkung ist in differenzierten Zellen, welche die Proliferation einstellen und damit für phasenspezifische Chemotherapeutika wie Spindelgifte weniger vulnerabel sind, erwartbar. Weiterhin müssen die Ergebnisse vor dem Hintergrund der oben aufgeführten deutlich geringeren antiproliferativen Potenz von PDA66 gegenüber Paclitaxel betrachtet werden. Jedoch belegt die deutliche Reduktion des Formazan-Metabolismus durch Paclitaxel in Übereinstimmung mit der klinisch relevanten Neurotoxizität dieser Substanz einen proliferationsunabhängigen Effekt dieses Spindelgifts. Die große Differenz beider Substanzen bei allenfalls geringfügiger und nicht signifikanter Reduktion der Formazan-Spaltung durch PDA66 in differenzierten Progenitorzellen lässt eine selektiv geringere Wirkung von PDA66 in differenzierten neuronalen Zellen vermuten. Die von Wienecke und Bacher beschriebene niedermolekulare Substanz Indibulin (D-24851, ZIO-301) trägt ebenfalls ein Indol-Motiv und zeigt eine unterschiedliche Wirkung auf reifes neuronales Tubulin bzw. unreifes Tubulin und andere Tubulin-Isoformen

(Wienecke und Bacher 2009). Dabei deuten die Autoren den unterschiedlichen Effekt durch eine Verlegung der Indubulin-Bindungsstelle an posttranslational - durch Acetylierung, Phosphorylierung, Polyglutamation, Detyronisierung und Polyglykilylierung - modifizierten neuronalen Tubulinisofomen. Inwiefern der geringere inhibitorische Effekt von PDA66 auf differenzierte Progenitorzellen über einen derartigen Mechanismus zu erklären ist, bleibt zu untersuchen. Die immunhistochemisch erstellten Färbungen von Mikrotubuli in differenzierten Progenitorzellen zeigen jedoch eine ausgeprägte Veränderung des Zytoskeletts mit konsekutiver Abrundung der Zellen. Kritisch könnten die unterschiedlichen Effekte über eine Maximalwirkung in den proliferierenden Progenitorzellen - die getesteten Konzentrationen von 3 und 10  $\mu\text{M}$  liegen für beide Substanzen um ein Vielfaches über den ermittelten  $\text{IC}_{50}$  - und eine Konsequenz der niedrigeren Potenz des Indolylmaleimids in den differenzierten Zellen erklärt werden. In diesem Falle wäre eine Paclitaxel-ähnliche toxische Wirkung auf die differenzierten hNPZ in höheren Konzentrationen zu erwarten. Die durchgeführten Untersuchungen an differenzierten Progenitorzellen weisen auf einen potentiell geringeren neurotoxischen Effekt von PDA66 im Vergleich zu klassischen Spindelgiften hin, zur Sicherung dieser Vermutung sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich.

### **5.5 Untersuchung weiterer Derivate**

Eine Reduktion des Wachstums in Kolonkarzinomen durch Inhibition von GSK3 $\beta$  auf genetischer und pharmakologischer Ebene wurde bereits durch Shakoori et al. demonstriert (Shakoori et al. 2005). Die deutliche Wachstumsreduktion der SW480-Zellen durch die GSK3 $\beta$ -inhibitorischen Indolylmaleimide SB-216763 und IM-12 steht in Übereinstimmung mit diesem Bericht. Auch wenn sich kein additiver Effekt für eine Kombinationsbehandlung mit jeweils 3  $\mu\text{M}$  PDA66 und IM-12 nachweisen ließ, fiel der antiproliferative Effekt stärker aus als durch die höchste verwendete PDA66-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ). Verschiedenen Studien (Sun et al. 2009, Watcharasit et al. 2008, Beurel und Jope 2006) zufolge ist GSK3 $\beta$  ein Förderer des intrinsischen Apoptosesystems, also jener Kaskade, welche auch infolge der Behandlung mit Spindelgiften ausgelöst wird. Die verstärkte antiproliferative Wirkung durch Kombination eines GSK3 $\beta$ -Inhibitors mit einem Spindelgift war nicht erwartbar und steht in Kontrast zu diesen Studien. In Anbetracht dieser Dissonanz muss hinterfragt werden, ob IM-12 auch in SW480-Kolon-Karzinomzellen als GSK3 $\beta$ -Inhibitor wirkt. Auch ließe sich spekulieren, ob eine zusätzliche Wirksamkeit durch Hybridsubstanzen aus GSK3 $\beta$ -Inhibitoren und Spindelgiften nicht zumindest in GSK3 $\beta$ -abhängigen Krebszellen wie Kolon-, Ovarial- oder Pankreaskarzinomen denkbar wäre. Das Potential, entsprechende Substanzen aus der Gruppe der Indolylmaleimide zu entwickeln ist, wie am Beispiel der tubulin-inhibitorischen Wirkung hoher Konzentrationen von SB216763 und IM-12 sichtbar, gegeben und erfordert weitere Untersuchungen.

Die Wirkmechanismen hinter den antiproliferativen Effekten der weiteren Indolylmaleimid-Derivate in den neuronalen Progenitor- und Krebszellen bleibt in Anbetracht der hohen

## 5 Diskussion

biologischen Potenz von Indolen spekulativ. Um eine möglichst effektive Entwicklung neuer potenter Strukturen gewährleisten zu können, bietet sich eine Screeninglösung mit Abfrage von Parametern wie Wachstumsinhibition, neurotoxischer Effekt, tubulin- sowie GSK3 $\beta$ -inhibitorische Wirkung in neuralen Progenitorzellen und verschiedenen Krebszelllinien an. Dabei sollte eine Selektion der Substanzen nach den Kriterien Potenz, vorteilhaftes Nebenwirkungsprofil und eventuell neuartige Wirkungsmechanismen oder deren Kombination erfolgen.

## **6 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass das Indolylmaleimid PDA66 in vitro die Polymerisation von Tubulin hemmt und in neuronalen Progenitorzellen entsprechend zur Veränderung des Zytoskeletts führt. Ferner konnte eine Arretierung der humanen Progenitorzellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus sowie eine signifikante Vermehrung frühapoptotischer Zellen infolge der PDA66-Behandlung gezeigt werden. In humanen neuronalen Progenitorzellen wurde ein deutlicher konzentrations- und behandlungszeitabhängiger antiproliferativer und antimetabolischer Effekt nachgewiesen. Die antiproliferative Wirkung konnte in Krebszelllinien unterschiedlicher Ursprungsgewebe bestätigt werden, fiel im Vergleich mit klinisch etablierten Vertretern von Spindelgiften jedoch geringer aus. Als Hinweis auf ein möglicherweise vorteilhafteres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu etablierten Spindelgiften konnte ein geringerer Einfluss der Substanz auf den Zellmetabolismus differenzierter neuraler Progenitorzellen gegenüber Paclitaxel gezeigt werden. Weiterhin erbrachte die intraperitoneale Injektion der Substanz in Mäusen keinen Anhalt für eine mögliche Akut-Toxizität, wie für klinisch angewendete Spindelgifte beschrieben, zeigte jedoch nach einer Wirkungszeit von 48h erste Hinweise auf eine unspezifische Nebenwirkung in Form einer Beeinträchtigung der Hämatopoese.

PDA66 ist, anders als die GSK3 $\beta$ -inhibitorischen Indolylmaleimide SB216763 und IM-12, nicht in der Lage,  $\beta$ -catenin zu akkumulieren. Beide Substanzen wirken jedoch in hohen Konzentrationen inhibitorisch auf die Tubulin-Polymerisation, was einen Klasseneffekt vermuten lässt. Während die weitere Derivatisierung von PDA66 zahlreiche Vertreter mit ähnlicher Wirkung in verschiedenen Krebszelllinien erbrachte, zeigte auch die Kombinationsbehandlung mit PDA66 und IM-12 potente antiproliferative Effekte in Kolonkarzinomzellen.

Da die Potenz von PDA66, im Vergleich zu klinisch etablierten Vertretern dieser Wirkungsklasse geringer ausfällt und sich teils ähnliche Nebenwirkungen in Form einer Hemmung der Hämatopoese andeuten, muss in weiteren Studien geprüft werden, ob eine antineoplastische Wirkung in vivo nachgewiesen werden kann. Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob die geringere neurotoxische Wirkung auch in vivo bestätigt werden und als vorteilhaftes Nebenwirkungsprofil der Substanz interpretiert werden kann. In Anbetracht der enormen Fülle neuer Strukturen sowie dem wachsenden Feld der gezielten Therapien muss eine Weiterentwicklung der Substanz kritisch hinterfragt werden. Im Falle einer fehlenden klinischen Wirksamkeit oder ausgeprägten Nebenwirkungen sollten die Bemühungen eher auf die Entwicklung weiterer, potenterer und nebenwirkungsärmerer Derivate abzielen. Die Struktur PDA66 kann dabei als gute Grundlage für die Entwicklung neuer Strukturen aus der Substanzklasse der Indolylmaleimide für die antineoplastische Therapie dienen.

Maßgeblich entscheidend ist dabei ob sich deutlich vorteilhafte Eigenschaften wie ein günstiges Nebenwirkungs- oder Pharmakokinetikprofil oder eine selektive Wirkung in Tumorzellen ergeben.

## 7 Thesen

1. Indolylmaleimide mit der Leitsubstanz SB216763 wurden als Modulatoren des Wnt-Signalwegs und der Differenzierung neuraler Progenitorzellen über ihre GSK3 $\beta$ -inhibitorische Wirkung beschrieben (Schmöle et al. 2010). In Voruntersuchungen zeigten einzelne Derivate zytotoxische Effekte in proliferierenden humanen neuralen Progenitorzellen (hNPZ), wobei das Derivat PDA66 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,532 $\mu$ M am stärksten antiproliferativ wirkte.
2. Über in vitro-Studien mit isoliertem Tubulin, Zellzyklusanalysen und Apoptosemessungen in hNPZ wurde der zugrunde liegende Mechanismus untersucht.
3. Dabei zeigte sich in der Propidium-Iodid-basierten durchflusszytometrischen Auswertung eine konzentrations- und zeitabhängige Arretierung der hNPZ in der G2/M-Phase des Zellzyklus (Maximum nach 16h; EC<sub>50</sub>=2,63 $\mu$ M)
4. In der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen über die Annexin V-Färbung war der Anteil frühapoptischer Zellen nach 9h signifikant erhöht (38,9 $\pm$ 1,7%).
5. Photometrisch und mikroskopisch inhibierte PDA66 die Polymerisation isolierten Tubulins. In immunhistochemischen Färbungen gegen  $\alpha$ -Tubulin wurde das Zytoskelett differenzierter hNPZ deutlich verändert.
6. Eine über die Tubulin-inhibitorische Wirkung vermittelte Zytotoxizität des Derivats PDA66 ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der weitere niedermolekulare tubulin-inhibitorische Strukturen mit Indol-Kern beschrieben werden, (Brancale und Silvestri 2007) anzunehmen.
7. In einem ELISA zum Gesamt- $\beta$ -catenin-Gehalt differenzierender hNPZ bewirkte PDA66 gegenüber SB216763, dass zu einer Akkumulation von  $\beta$ -catenin führte, eine signifikante Reduktion des  $\beta$ -catenin-Gehalts.
8. Die Behandlung mit PDA66 führte zu einer signifikant geringeren Reduktion des Metabolismus in differenzierten gegenüber proliferierenden Progenitorzellen (proliferierend: 50,2 $\pm$ 4,2% der Kontrolle; differenziert: 89,7 $\pm$ 3,4% der Kontrolle).
9. Die Behandlung mit PDA66 wirkte antiproliferativ in verschiedenen Krebszelllinien (A549; B16F10; Jurkat; HepG2; MCF-7; SW480). Gegenüber den klinisch etablierten Spindelgiften Paclitaxel und Vinblastin lag der IC<sub>50</sub>-Wert um mehrere Zehnerpotenzen höher.
10. Eine Akuttoxizitätsuntersuchung in Mäusen mit einmaliger intraperitonealer Behandlung ergab bis zu Dosen von 200mg/kg Körpergewicht keine signifikanten Nebenwirkungen unter Anwendung eines OECD-adaptierten Scoringssystems. Die Untersuchung des kleinen Blutbilds nach 48h zeigte eine signifikante Reduktion der Leukozyten in einer Dosierung von 100mg/kg Körpergewicht.
11. Weitere Indolylmaleimid-Derivate waren antiproliferativ aktiv in hNPZ sowie in den Krebszelllinien A549 und SW480.



## 8 Literaturverzeichnis

Acta Chirurgica Austriaca (2000). 32. Aufl.: Springer-Verlag.

Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. In: *Nature* (6), S. 615–616.

Agarwal, S.; Hartz, A. M. S.; Elmquist, W. F.; Bauer, B. (2011): Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. In: *Curr. Pharm. Des.* 17 (26), S. 2793–2802.

Alberts, B. (2002): Molecular biology of the cell. 4. Aufl. New York: Garland.

Allen, R. D.; Allen, N. S.; Travis, J. L. (1981): Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. In: *Cell Motil.* 1 (3), S. 291–302.

Altieri, D. C. (2003): Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. In: *Oncogene* 22 (53), S. 8581–8589.

Altwein, J. E. (2000): Internistische Onkologie. 339 Tabellen. 2. Aufl. Hg. v. Wolfgang Wilmanns. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter 1. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1), S. 361–398.

Anderson, H. (2001): Measuring changes in human tumour vasculature in response to therapy using functional imaging techniques. In: *Br. J. Cancer* 85 (8), S. 1085–1093.

Argyriou, A. A.; Koltzenburg, M.; Polychronopoulos, P.; Papapetropoulos, S.; Kalofonos, H. P. (2008): Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66 (3), S. 218–228.

Austin, M. B.; O'Maille, P. E.; Noel, J. P. (2008): Evolving biosynthetic tangos negotiate mechanistic landscapes. In: *Nat Chem Biol* 4 (4), S. 217–222.

Bacher, G.; Nickel, B.; Emig, P.; Vanhoefer, U.; Seeber, S.; Shandra, A.; Klenner, T.; Beckers, T. (2001): D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity in vivo, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells, and lacks neurotoxicity. In: *Cancer Res.* 61 (1), S. 392–399.

Barlow, S. B.; Gonzalez-Garay, M. L.; Cabral, F. (2002): Paclitaxel-dependent mutants have severely reduced microtubule assembly and reduced tubulin synthesis. In: *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 17), S. 3469–3478.

Benson, J. D.; Chen, Y. N.; Cornell-Kennon, S. A.; Dorsch, M.; Kim, S.; Leszczyniecka, M.; Sellers, W. R.; Lengauer, C. (2006): Validating cancer drug targets. In: *Nature* 441 (7092), S. 451–456.

Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology Annual Review* (11), S. 127–152.

Beurel, E.; Jope, R. S. (2006): The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. In: *Prog. Neurobiol.* 79 (4), S. 173–189.

Bhalla, K. N. (2003): Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. In: *Oncogene* 22 (56), S. 9075–9086.

- Bhat, R. V.; Shanley, J.; Correll, M. P.; Fieles, W. E.; Keith, R. A.; Scott, C. W.; Lee, C. M. (2000): Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cellular and animal models of neuronal degeneration. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (20), S. 11074–11079.
- Bianchi, L.; Riede, U. N. (2004): Allgemeine und spezielle Pathologie. 168 Tabellen. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. In: *Cancer Res* 38 (11 Pt 1), S. 3751–3757.
- Biedler J. L., Helson L. Spengler B.A. (1973): Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. In: *Cancer Res* (33), S. 2643–2652.
- Bilim, V.; Ougolkov, A.; Yuuki, K.; Naito, S.; Kawazoe, H.; Muto, A.; Oya, M.; Billadeau, D.; Motoyama, T.; Tomita, Y. (2009): Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. In: *Br J Cancer* 101 (12), S. 2005–2014.
- Boll, I. T.; Fuchs, G. (1970): A kinetic model of granulocytopoiesis. In: *Exp. Cell Res.* 61 (1), S. 147–152.
- Brancale, A.; Silvestri, R. (2007): Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. In: *Med. Res. Rev.* 27 (2), S. 209–238.
- Breier, J. M.; Gassmann, K.; Kayser, R.; Stegeman, H.; Groot, D. d.; Fritsche, E.; Shafer, T. J. (2010): Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: State of the science☆. In: *Neurotoxicology and Teratology* 32 (1), S. 4–15.
- Breier, J. M.; Radio, N. M.; Mundy, W. R.; Shafer, T. J. (2008): Development of a High-Throughput Screening Assay for Chemical Effects on Proliferation and Viability of Immortalized Human Neural Progenitor Cells. In: *Toxicological Sciences* 105 (1), S. 119–133.
- Calligaris, D.; Verdier-Pinard, P.; Devred, F.; Villard, C.; Braguer, D.; Lafitte, D. (2010): Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (7), S. 1089–1104.
- Cao, Q.; Lu, X.; Feng, Y. J. (2006): Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. In: *Cell Res* 16 (7), S. 671–677.
- Carbone, P. P.; Spurr, C.; Schneiderman, M.; Scotto, J.; Holland, J. F.; Shnider, B. (1968): Management of patients with malignant lymphoma: a comparative study with cyclophosphamide and vinca alkaloids. In: *Cancer Res.* 28 (5), S. 811–822.
- Carlson, K.; Ocean, A. J. (2011): Peripheral neuropathy with microtubule-targeting agents: occurrence and management approach. In: *Clin. Breast Cancer* 11 (2), S. 73–81.
- Castelo-Branco, G.; Rawal, N.; Arenas, E. (2004): GSK-3 $\beta$  inhibition/ $\beta$ -catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. In: *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 24), S. 5731–5737.
- Chabner, B. A.; Roberts, T. G. (2005): Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. In: *Nat Rev Cancer* 5 (1), S. 65–72.
- Chambers, M. S.; Street, L. J.; Goodacre, S.; Hobbs, S. C.; Hunt, P.; Jelley, R. A.; Matassa, V. G.; Reeve, A. J.; Sternfeld, F.; Beer, M. S.; Stanton, J. A.; Rathbone, D.; Watt, A. P.; MacLeod, A. M. (1999): 3-(Piperazinylpropyl)indoles: Selective, Orally Bioavailable h5-HT 1D Receptor Agonists as Potential Antimigraine Agents. In: *J. Med. Chem.* 42 (4), S. 691–705.

- Cheung, C. H. A.; Chen, H. H.; Kuo, C. C.; Chang, C. Y.; Coumar, M. S.; Hsieh, H. P.; Chang, J. Y. (2009): Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers. In: *Mol. Cancer* 8, S. 43.
- Coghlan, M. P.; Culbert, A. A.; Cross, D. A.; Corcoran, S. L.; Yates, J. W.; Pearce, N. J.; Rausch, O. L.; Murphy, G. J.; Carter, P. S.; Roxbee Cox, L.; Mills, D.; Brown, M. J.; Haigh, D.; Ward, R. W.; Smith, D. G.; Murray, K. J.; Reith, A. D.; Holder, J. C. (2000): Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. In: *Chem. Biol.* 7 (10), S. 793–803.
- Cohen, P.; Goedert, M. (2004): GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. In: *Nat Rev Drug Discov* 3 (6), S. 479–487.
- Cohen, Y.; Chetrit, A.; Sirota, P.; Modan, B. (1998): Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. In: *Med. Oncol.* 15 (1), S. 32–36.
- Cross, D. A.; Culbert, A. A.; Chalmers, K. A.; Facci, L.; Skaper, S. D.; Reith, A. D. (2001): Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. In: *J. Neurochem.* 77 (1), S. 94–102.
- Cross, D. A. E.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. In: *Nature* 378 (6559), S. 785–789.
- Crown, J.; O'Leary, M.; Ooi, W. S. (2004): Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. In: *Oncologist* 9 Suppl 2, S. 24–32.
- Cuconati, A.; Mukherjee, C.; Perez, D.; White, E. (2003): DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. In: *Genes Dev.* 17 (23), S. 2922–2932.
- Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. (2001): Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . In: *Cell* 105 (6), S. 721–732.
- Darshan, M. S.; Loftus, M. S.; Thadani-Mulero, M.; Levy, B. P.; Escuin, D.; Zhou, X. K.; Gjyzezi, A.; Chanel-Vos, C.; Shen, R.; Tagawa, S. T.; Bander, N. H.; Nanus, D. M.; Giannakakou, P. (2011): Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. In: *Cancer Res.* 71 (18), S. 6019–6029.
- Darzynkiewicz, Z. (1997): Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). In: *Cytometry* (27), S. 1–20.
- Debernardis, D.; Siré, E. G.; Feudis, P. de; Vikhanskaya, F.; Valenti, M.; Russo, P.; Parodi, S.; D'Incalci, M.; Brogini, M. (1997): p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. In: *Cancer Res.* 57 (5), S. 870–874.
- Derry, W. B.; Wilson, L.; Jordan, M. A. (1995): Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. In: *Biochemistry* 34 (7), S. 2203–2211.
- Desal, D. V.; Ezdinli, E. Z.; Stutzman, L. (1970): Vincristine therapy of lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. In: *Cancer* 26 (2), S. 352–359.
- Diehl, J. A.; Cheng, M.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. (1998): Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. In: *Genes Dev.* 12 (22), S. 3499–3511.
- Ding, Q.; He, X.; Xia, W.; Hsu, J. M.; Chen, C. T.; Li, L. Y.; Lee, D. F.; Yang, J. Y.; Xie, X.; Liu, J. C.; Hung, M. C. (2007): Myeloid Cell Leukemia-1 Inversely Correlates with Glycogen Synthase Kinase-3 Activity and Associates with Poor Prognosis in Human Breast Cancer. In: *Cancer Research* 67 (10), S. 4564–4571.

- Doble, B. W.; Woodgett, J. R. (2003): GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. In: *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 7), S. 1175–1186.
- Don, S.; Verrills, N. M.; Liaw, T. Y. E.; Liu, M. L. M.; Norris, M. D.; Haber, M.; Kavallaris, M. (2004): Neuronal-associated microtubule proteins class III beta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs. In: *Mol. Cancer Ther.* 3 (9), S. 1137–1146.
- Donato, R.; Miljan, E. A.; Hines, S. J.; Aouabdi, S.; Pollock, K.; Patel, S.; Edwards, F. A.; Sinden, J. D. (2007): Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. In: *BMC Neurosci* 8, S. 36.
- Dong, Z.; Birrer, M. J.; Watts, R. G.; Matrisian, L. M.; Colburn, N. H. (1994): Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (2), S. 609–613.
- Downing, K. H. (2000): Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (1), S. 89–111.
- Duffy, B. C.; Zhu, L.; Decornez, H.; Kitchen, D. B. (2012): Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. In: *Bioorg. Med. Chem.* 20 (18), S. 5324–5342.
- Dumontet, C.; Jordan, M. A. (2010): Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. In: *Nat Rev Drug Discov* 9 (10), S. 790–803.
- Dumontet, C.; Sikic, B. I. (1999): Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. In: *J. Clin. Oncol.* 17 (3), S. 1061–1070.
- Eli Lilly and Company (2006-2013): PRELUDE: Study to Investigate the Prevention of Relapse in Lymphoma Using Daily Enzastaurin. A Phase 3 Clinical Study to Investigate the Prevention of Relapse in Lymphoma Using Daily Enzastaurin. In: *ClinicalTrials.gov*. Online verfügbar unter <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00332202>.
- Embi, N.; Rylatt, D. B.; Cohen, P. (1980): Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. In: *Eur. J. Biochem.* 107 (2), S. 519–527.
- Erickson, H. P. (1975): Negatively stained vinblastine aggregates. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253, S. 51–52.
- Ferguson, P. J.; Cass, C. E. (1985): Differential cellular retention of vincristine and vinblastine by cultured human promyelocytic leukemia HL-60/Cl cells: the basis of differential toxicity. In: *Cancer Res.* 45 (11 Pt 1), S. 5480–5488.
- Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Gerber, H. P.; Novotny, W. (2004): Case history: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. In: *Nat Rev Drug Discov* 3 (5), S. 391–400.
- Fojo, A. T.; Menefee, M. (2005): Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). In: *Semin. Oncol.* 32 (6 Suppl 7), S. S3-8.
- Frame, S.; Cohen, P. (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. In: *Biochem. J.* 359 (Pt 1), S. 1–16.
- Frame, S.; Cohen, P.; Biondi, R. M. (2001): A Common Phosphate Binding Site Explains the Unique Substrate Specificity of GSK3 and Its Inactivation by Phosphorylation. In: *Molecular Cell* 7 (6), S. 1321–1327.

- Galán-Malo, P.; Vela, L.; Gonzalo, O.; Calvo-Sanjuán, R.; Gracia-Fleta, L.; Naval, J.; Marzo, I. (2012): Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 258 (3), S. 384–393.
- Gan, P. P.; McCarroll, J. A.; Po'uha, S. T.; Kamath, K.; Jordan, M. A.; Kavallaris, M. (2010): Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin. In: *Mol. Cancer Ther.* 9 (5), S. 1339–1348.
- Gan, P. P.; Pasquier, E.; Kavallaris, M. (2007): Class III -Tubulin Mediates Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs in Non Small Cell Lung Cancer. In: *Cancer Research* 67 (19), S. 9356–9363.
- Gascoigne, K. E.; Taylor, S. S. (2008): Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. In: *Cancer Cell* 14 (2), S. 111–122.
- Gascoigne, K. E.; Taylor, S. S. (2009): How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? In: *J. Cell. Sci.* 122 (Pt 15), S. 2579–2585.
- Ghosh, J. C.; Altieri, D. C. (2005): Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3beta in colorectal cancer cells. In: *Clin. Cancer Res.* 11 (12), S. 4580–4588.
- Giannakakou, P.; Gussio, R.; Nogales, E.; Downing, K. H.; Zaharevitz, D.; Bollbuck, B.; Poy, G.; Sackett, D.; Nicolaou, K. C.; Fojo, T. (2000): A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (6), S. 2904–2909.
- Giannakakou, P.; Sackett, D.; Fojo, T. (2000): Tubulin/Microtubules: Still a Promising Target for New Chemotherapeutic Agents. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 92 (3), S. 182–183.
- Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *J Natl Cancer Inst* 51 (5), S. 1417–1423.
- Goa, K. L.; Faulds, D. (1994): Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy. In: *Drugs Aging* 5 (3), S. 200–234.
- Gonçalves, A.; Braguer, D.; Kamath, K.; Martello, L.; Briand, C.; Horwitz, S.; Wilson, L.; Jordan, M. A. (2001): Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (20), S. 11737–11742.
- Graczyk, J.; Cheung, M. C.; Buckstein, R.; Chan, K. (2013): Granulocyte colony-stimulating factor as secondary prophylaxis of febrile neutropenia in the management of advanced-stage Hodgkin lymphoma treated with adriamycin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine chemotherapy: a decision analysis. In: *Leuk. Lymphoma*.
- Gregory, M. A.; Qi, Y.; Hann, S. R. (2003): Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. In: *J. Biol. Chem.* 278 (51), S. 51606–51612.
- Grimes, C. A.; Jope, R. S. (2001): The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3β in cellular signaling. In: *Progress in Neurobiology* 65 (4), S. 391–426.
- Grisold, W.; Cavaletti, G.; Windebank, A. J. (2012): Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. In: *Neuro-Oncology* 14 (suppl 4), S. iv45.

- Gross, R.; Lambers, K. (1958): Erste Erfahrungen in der Behandlung maligner Tumoren mit einem neuen N-Lost-Phosphamidester. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 83 (12), S. 458–462.
- Gstraunthaler, G. (2008): Zell- und Gewebekultur : von den Grundlagen zur Laborbank. S.135. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Hamel, E. (1992): Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: maytansine, rhizoxin, phomopsin A, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. In: *Pharmacol. Ther.* 55 (1), S. 31–51.
- Hamel, E. (1996): Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. In: *Med Res Rev* 16 (2), S. 207–231.
- Hans, F.; Dimitrov, S. (2001): Histone H3 phosphorylation and cell division. In: *Oncogene* 20 (24), S. 3021–3027.
- Hari, M.; Wang, Y.; Veeraraghavan, S.; Cabral, F. (2003): Mutations in alpha- and beta-tubulin that stabilize microtubules and confer resistance to colcemid and vinblastine. In: *Mol. Cancer Ther.* 2 (7), S. 597–605.
- Hartigan, J. A. (1999): Transient Increases in Intracellular Calcium Result in Prolonged Site-selective Increases in Tau Phosphorylation through a Glycogen Synthase Kinase 3beta - dependent Pathway. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (30), S. 21395–21401.
- Henry, C. M.; Hollville, E.; Martin, S. J. (2013): Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. In: *Methods*.
- Henson, E. S.; Hu, X.; Gibson, S. B. (2006): Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (3 Pt 1), S. 845–853.
- Herbst, R. S.; Oh, Y.; Wagle, A.; Lahn, M. (2007): Enzastaurin, a Protein Kinase C Selective Inhibitor, and Its Potential Application as an Anticancer Agent in Lung Cancer. In: *Clinical Cancer Research* 13 (15), S. 4641s.
- Hiddemann, H. B. (Hg.) (2010): Die Onkologie. 2. Aufl. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.
- Hoeflich, K. P.; Luo, J.; Rubie, E. A.; Tsao, M. S.; Jin, O.; Woodgett, J. R. (2000): Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. In: *Nature* 406 (6791), S. 86–90.
- Howard, S.; Deroo, T.; Fujita, Y.; Itasaki, N. (2011): A positive role of cadherin in Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition. In: *PLoS ONE* 6 (8), S. e23899.
- Hu, Y.; Gu, X.; Li, R.; Luo, Q.; Xu, Y. (2010): Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition induces nuclear factor- $\kappa$ B-mediated apoptosis in pediatric acute lymphocyte leukemia cells. In: *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29, S. 154.
- Hughes, K.; Nikolakaki, E.; Plyte, S. E.; Totty, N. F.; Woodgett, J. R. (1993): Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. In: *EMBO J.* 12 (2), S. 803–808.
- Imai, K.; Takaoka, A. (2006): Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. In: *Nat Rev Cancer* 6 (9), S. 714–727.
- Jackson, D. V.; Bender, R. A. (1979): Cytotoxic thresholds of vincristine in a murine and a human leukemia cell line in vitro. In: *Cancer Res.* 39 (11), S. 4346–4349.
- Jordan, M. A.; Himes, R. H.; Wilson, L. (1985): Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro. In: *Cancer Res.* 45 (6), S. 2741–2747.

## 8 Literaturverzeichnis

- Jordan, M. A.; Toso, R. J.; Thrower, D.; Wilson, L. (1993): Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (20), S. 9552–9556.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. (1998): Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1), S. 123–130.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. (2004): Microtubules as a target for anticancer drugs. In: *Nat Rev Cancer* 4 (4), S. 253–265.
- Kahl, B. S.; Bailey, H. H.; Smith, E. P.; Turman, N.; Smith, J.; Werndli, J.; Williams, E. C.; Longo, W. L.; Kim, K. M.; McGovern, J.; Jumonville, A. (2005): Phase II study of weekly low-dose paclitaxel for relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma: a Wisconsin Oncology Network Study. In: *Cancer Invest.* 23 (1), S. 13–18.
- Kanthou, C.; Tozer, G. M. (2007): Tumour targeting by microtubule-depolymerising vascular disrupting agents. In: *Expert Opin. Ther. Targets* 11 (11), S. 1443–1457.
- Karow, T.; Lang-Roth, R.: Zytostatika. In: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*, S. 895–912.
- Karow, Thomas; Lang-Roth, Ruth (Hg.) (2012): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2012. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis.* 20. Aufl. Köln: im Selbstverlag.
- Kavallaris, M. (2010): Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. In: *Nat Rev Cancer* 10 (3), S. 194–204.
- Kavallaris, M.; Kuo, D. Y.; Burkhart, C. A.; Regl, D. L.; Norris, M. D.; Haber, M.; Horwitz, S. B. (1997): Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. In: *J. Clin. Invest.* 100 (5), S. 1282–1293.
- Kavallaris, M.; Tait, A. S.; Walsh, B. J.; He, L.; Horwitz, S. B.; Norris, M. D.; Haber, M. (2001): Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. In: *Cancer Res.* 61 (15), S. 5803–5809.
- Kerbel, R.; Folkman, J. (2002): Clinical translation of angiogenesis inhibitors. In: *Nat Rev Cancer* 2 (10), S. 727–739.
- Kloover, J. S.; Bakker, M. A. d.; Gelderblom, H.; van Meerbeeck, J. P. (2004): Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. In: *Br J Cancer* 90 (2), S. 304–305.
- Klotz, D. M.; Nelson, S. A.; Kroboth, K.; Newton, I. P.; Radulescu, S.; Ridgway, R. A.; Sansom, O. J.; Appleton, P. L.; Nathke, I. S. (2012): The microtubule poison vinorelbine kills cells independently of mitotic arrest and targets cells lacking the APC tumour suppressor more effectively. In: *Journal of Cell Science* 125 (4), S. 887–895.
- Komlodi-Pasztor, E.; Sackett, D. L.; Fojo, A. T. (2012): Inhibitors Targeting Mitosis: Tales of How Great Drugs against a Promising Target Were Brought Down by a Flawed Rationale. In: *Clinical Cancer Research* 18 (1), S. 51–63.
- Koudelka, S.; Turanek-Knötigova, P.; Masek, J.; Korvasova, Z.; Skrabalova, M.; Plockova, J.; Bartheldyova, E.; Turanek, J. (2009): Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: Preparation, characterisation and in vivo anticancer effect. In: *J. Pharm. Sci.*, S. n/a.
- Krishan, A. (1975): Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. In: *The Journal of Cell Biology* 66, S. 188–193.

- Krug, L. M.; Miller, V. A.; Kalemkerian, G. P.; Kraut, M. J.; Ng, K. K.; Heelan, R. T.; Pizzo, B. A.; Perez, W.; McClean, N.; Kris, M. G. (2000): Phase II study of dolastatin-10 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. In: *Ann. Oncol.* 11 (2), S. 227–228.
- Krysko, D. V.; Vanden Berghe, T.; D'Herde, K.; Vandenabeele, P. (2008): Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. In: *Methods* 44 (3), S. 205–221.
- Kunnimalaiyaan, M.; Vaccaro, A. M.; Ndiaye, M. A.; Chen, H. (2007): Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. In: *Mol. Cancer Ther.* 6 (3), S. 1151–1158.
- Kwon, J. S.; Elit, L.; Finn, M.; Hirte, H.; Mazurka, J.; Moens, F.; Trim, K. (2002): A comparison of two prophylactic regimens for hypersensitivity reactions to paclitaxel. In: *Gynecol Oncol* 84 (3), S. 420–425.
- Lage, H. (2008): An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (20), S. 3145–3167.
- Lai, M. J.; Chang, J. Y.; Lee, H. Y.; Kuo, C. C.; Lin, M. H.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Wu, J. S.; Wu, S. Y.; Shey, K. S.; Liou, J. P. (2011): Synthesis and biological evaluation of 1-(4'-Indolyl and 6'-Quinoliny) indoles as a new class of potent anticancer agents. In: *Eur J Med Chem* 46 (9), S. 3623–3629.
- Lange, C.; Mix, E.; Frahm, J.; Glass, A.; Müller, J.; Schmitt, O.; Schmöle, A. C.; Klemm, K.; Ortinau, S.; Hübner, R.; Frech, M. J.; Wree, A.; Rolfs, A. (2011): Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells. In: *Neurosci. Lett.* 488 (1), S. 36–40.
- Lee, C. H. (2010): Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. In: *Methods Mol. Biol.* 596, S. 325–340.
- Lee, J. C.; Timasheff, S. N. (1977): In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. In: *Biochemistry* 16 (8), S. 1754–1764.
- Lee, J. J.; Swain, S. M. (2006): Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. In: *J. Clin. Oncol.* 24 (10), S. 1633–1642.
- Lerner, A.; Andrea, N. (2005): Vinca Alkaloids vs. Taxanes as Therapy in Lymphoid Malignancies: Do Our Experimental Models Obscure Our Understanding of How These Drugs Really Work? In: *LCNV* 23 (1), S. 100–102.
- Lesort, M.; Jope, R. S.; Johnson, G. V. (1999): Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and Fyn tyrosine kinase. In: *J. Neurochem.* 72 (2), S. 576–584.
- Li, C. M.; Lu, Y.; Ahn, S.; Narayanan, R.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. (2010): Competitive mass spectrometry binding assay for characterization of three binding sites of tubulin. In: *J. Mass Spectrom.* 45 (10), S. 1160–1166.
- Li, C. M.; Lu, Y.; Chen, J.; Costello, T. A.; Narayanan, R.; Dalton, M. N.; Snyder, L. M.; Ahn, S.; Li, W.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. (2012): Orally bioavailable tubulin antagonists for paclitaxel-refractory cancer. In: *Pharm. Res.* 29 (11), S. 3053–3063.
- Liao, P.-C.; Tan, S.-K.; Lieu, C.-H.; Jung, H.-K. (2008): Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. In: *J. Cell. Biochem.* 104 (4), S. 1509–1523.
- Liberatore, A. M.; Coulomb, H.; Pons, D.; Dutruel, O.; Kasprzyk, P. G.; Carlson, M.; Nelson, A. S.; Newman, S. P.; Stengel, C.; Auvray, P.; Hesry, V.; Foll, B.; Narboux, N.; Morlais, D.; Le Moing, M.; Bernetiere, S.; Dellile, R.; Camara, J.; Ferrandis, E.; Bigg, D. C.; Prévost, G.



- P. (2008): IRC-083927 is a new tubulin binder that inhibits growth of human tumor cells resistant to standard tubulin-binding agents. In: *Mol. Cancer Ther.* 7 (8), S. 2426–2434.
- Lindl, T.; Lewandowski, B.; Schreyögg, S.; Stäudte, A. (2005): An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. In: *Altern Lab Anim* 33 (6), S. 591–601.
- Loganzo, F.; Discafani, C. M.; Annable, T.; Beyer, C.; Musto, S.; Hari, M.; Tan, X.; Hardy, C.; Hernandez, R.; Baxter, M.; Singanallore, T.; Khafizova, G.; Poruchynsky, M. S.; Fojo, T.; Nieman, J. A.; Ayril-Kaloustian, S.; Zask, A.; Andersen, R. J.; Greenberger, L. M. (2003): HTI-286, a synthetic analogue of the tripeptide hemiasterlin, is a potent antimicrotubule agent that circumvents P-glycoprotein-mediated resistance in vitro and in vivo. In: *Cancer Res.* 63 (8), S. 1838–1845.
- Lopez-Fanarraga, M.; Avila, J.; Guasch, A.; Coll, M.; Zabala, J. C. (2001): Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. In: *J. Struct. Biol.* 135 (2), S. 219–229.
- Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. (2006): Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker. 16. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Ma, C.; Wang, J.; Gao, Y.; Gao, T. W.; Chen, G.; Bower, K. A.; Odetallah, M.; Ding, M.; Ke, Z.; Luo, J. (2007): The role of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the transformation of epidermal cells. In: *Cancer Res.* 67 (16), S. 7756–7764.
- Mandery, K.; Glaeser, H.; Fromm, M. F. (2012): Interaction of innovative small molecule drugs used for cancer therapy with drug transporters. In: *British Journal of Pharmacology* 165 (2), S. 345–362.
- Markman, M. (2003): Managing taxane toxicities. In: *Support Care Cancer* 11 (3), S. 144–147.
- Matson, D. R.; Stukenberg, P. T. (2011): Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. In: *Mol. Interv.* 11 (2), S. 141–150.
- Mazor, M.; Kawano, Y.; Zhu, H.; Waxman, J.; Kypta, R. M. (2004): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. In: *Oncogene* 23 (47), S. 7882–7892.
- McGuire, W. P. (1989): Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms. In: *Ann Intern Med* 111 (4), S. 273.
- McLaughlin, P.; Grillo-López, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F.; Jain, V.; Ho, A. D.; Lister, J.; Wey, K.; Shen, D.; Dallaire, B. K. (1998): Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. In: *J. Clin. Oncol.* 16 (8), S. 2825–2833.
- Miyashita, K.; Kawakami, K.; Nakada, M.; Mai, W.; Shakoory, A.; Fujisawa, H.; Hayashi, Y.; Hamada, J.-i.; Minamoto, T. (2009): Potential Therapeutic Effect of Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition against Human Glioblastoma. In: *Clinical Cancer Research* 15 (3), S. 887–897.
- Moebus, V.; Jackisch, C.; Lueck, H.-J.; Du Bois, A.; Thomssen, C.; Kurbacher, C.; Kuhn, W.; Nitz, U.; Schneeweiss, A.; Huober, J.; Harbeck, N.; Minckwitz, G. von; Runnebaum, I. B.;

- Hinke, A.; Kreienberg, R.; Konecny, G. E.; Untch, M. (2010): Intense Dose-Dense Sequential Chemotherapy With Epirubicin, Paclitaxel, and Cyclophosphamide Compared With Conventionally Scheduled Chemotherapy in High-Risk Primary Breast Cancer: Mature Results of an AGO Phase III Study. In: *Journal of Clinical Oncology* 28 (17), S. 2874–2880.
- Mollinedo, F.; Gajate, C. (2003): Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. In: *Apoptosis* 8 (5), S. 413–450.
- Mooney, C. J.; Nagaiah, G.; Fu, P.; Wasman, J. K.; Cooney, M. M.; Savvides, P. S.; Bokar, J. A.; Dowlati, A.; Wang, D.; Agarwala, S. S.; Flick, S. M.; Hartman, P. H.; Ortiz, J. D.; Lavertu, P. N.; Remick, S. C. (2009): A phase II trial of fosbretabulin in advanced anaplastic thyroid carcinoma and correlation of baseline serum-soluble intracellular adhesion molecule-1 with outcome. In: *Thyroid* 19 (3), S. 233–240.
- Morgan, P. J.; Ortinau, S.; Frahm, J.; Kruger, N.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2009): Protection of neurons derived from human neural progenitor cells by veratridine. In: *Neuroreport* 20 (13), S. 1225–1229.
- Musacchio, A.; Salmon, E. D. (2007): The spindle-assembly checkpoint in space and time. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (5), S. 379–393.
- Mutschler, E. (2012): Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 10. vollst. neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Natarajan, K.; Senapati, S. (2012): Understanding the basis of drug resistance of the mutants of  $\alpha\beta$ -tubulin dimer via molecular dynamics simulations. In: *PLoS ONE* 7 (8), S. e42351.
- Noble, R. L.; Beer, C. T.; Cutts, J. H. (1958): Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 76 (3), S. 882–894.
- Nogales, E.; Grayer Wolf, S.; Khan, I. A.; Ludueña, R. F.; Downing, K. H. (1995): Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. In: *Nature* 375 (6530), S. 424–427.
- Nowicki, M. O.; Dmitrieva, N.; Stein, A. M.; Cutter, J. L.; Godlewski, J.; Saeki, Y.; Nita, M.; Berens, M. E.; Sander, L. M.; Newton, H. B.; Chiocca, E. A.; Lawler, S. (2008): Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3. In: *Neuro-Oncology* 10 (5), S. 690–699.
- Nunez, R. (2001): DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. In: *Curr. Issues Mol. Biol.* 3 (3), S. 67–70.
- O'Dwyer, M. E.; Mauro, M. J.; Druker, B. J. (2003): STI571 as a targeted therapy for CML. In: *Cancer Invest.* 21 (3), S. 429–438.
- OECD (2000): Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints; ENV Monograph No 36: Scientific Criteria for Validation of In Vitro Toxicity Tests Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation (Testing of Chemicals, 19). Online verfügbar unter [www.oecd.org](http://www.oecd.org) > Suche: "Series on Testing and Assessment: Testing for Human Health"; Nummer 19. Letzte Abfrage 07.10.2013.  
<http://search.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO%282000%297&docLanguage=En>.
- O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. (1997): Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. In: *Cell* 88 (2), S. 277–285.
- Ougolkov, A. V.; Bone, N. D.; Fernandez-Zapico, M. E.; Kay, N. E.; Billadeau, D. D. (2007): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear

## 8 Literaturverzeichnis

- factor B target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. In: *Blood* 110 (2), S. 735–742.
- Ougolkov, A. V.; Fernandez-Zapico, M. E.; Savoy, D. N.; Urrutia, R. A.; Billadeau, D. D. (2005): Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. In: *Cancer Res.* 65 (6), S. 2076–2081.
- Patterson, D.; Rustin, G. (2007): Vascular Damaging Agents. In: *Clinical Oncology* 19 (6), S. 443–456.
- Peifer, M.; Polakis, P. (2000): Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. In: *Science* 287 (5458), S. 1606–1609.
- Perry, M. C. (Hg.) (1992): The chemotherapy source book. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Persohn, E.; Canta, A.; Schoepfer, S.; Traebert, M.; Mueller, L.; Gilardini, A.; Galbiati, S.; Nicolini, G.; Scuteri, A.; Lanzani, F.; Giussani, G.; Cavaletti, G. (2005): Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. In: *European Journal of Cancer* 41 (10), S. 1460–1466.
- Plyte, S. E.; Hughes, K.; Nikolakaki, E.; Pulverer, B. J.; Woodgett, J. R. (1992): Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1114 (2-3), S. 147–162.
- Polakis, P. (2012): Wnt signaling in cancer. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (5).
- Postma, T. J.; Aaronson, N. K.; Heimans, J. J.; Muller, M. J.; Hildebrand, J. G.; Delattre, J. Y.; Hoang-Xuan, K.; Lantéri-Minet, M.; Grant, R.; Huddart, R.; Moynihan, C.; Maher, J.; Lucey, R. (2005): The development of an EORTC quality of life questionnaire to assess chemotherapy-induced peripheral neuropathy: The QLQ-CIPN20. In: *European Journal of Cancer* 41 (8), S. 1135–1139.
- Press, O. W.; LeBlanc, M.; O'Rourke, T. J.; Gagnet, S.; Chapman, R. A.; Balcerzak, S. P.; Fisher, R. I. (1998): Phase II trial of paclitaxel by 24-hour continuous infusion for relapsed non-Hodgkin's lymphomas: Southwest Oncology Group trial 9246. In: *J. Clin. Oncol.* 16 (2), S. 574–578.
- Ring, D. B.; Johnson, K. W.; Henriksen, E. J.; Nuss, J. M.; Goff, D.; Kinnick, T. R.; Ma, S. T.; Reeder, J. W.; Samuels, I.; Slabiak, T.; Wagman, A. S.; Hammond, M.-E. W.; Harrison, S. D. (2003): Selective Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Potentiate Insulin Activation of Glucose Transport and Utilization In Vitro and In Vivo. In: *Diabetes* 52 (3), S. 588–595.
- Risinger, A. L.; Giles, F. J.; Mooberry, S. L. (2009): Microtubule dynamics as a target in oncology. In: *Cancer Treat. Rev.* 35 (3), S. 255–261.
- Roach, S. L.; Higuchi, R. I.; Adams, M. E.; Liu, Y.; Karanewsky, D. S.; Marschke, K. B.; Mais, D. E.; Miner, J. N.; Zhi, L. (2008): Discovery of nonsteroidal glucocorticoid receptor ligands based on 6-indole-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (12), S. 3504–3508.
- Robert-Koch-Institut (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. Hg. v. Robert Koch-Instituts und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Online verfügbar unter [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de) (Stichwortsuche "Krebs in Deutschland", Dokumententyp "Text"), Abrufdatum 15.06.2013.
- Rowinsky, E. K.; Donehower, R. C. (1995): Paclitaxel (taxol). In: *N. Engl. J. Med.* 332 (15), S. 1004–1014.

- Rusan, N. M.; Fagerstrom, C. J.; Yvon, A. M.; Wadsworth, P. (2001): Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. In: *Mol. Biol. Cell* 12 (4), S. 971–980.
- Ryan, K. S.; Drennan, C. L. (2009): Divergent Pathways in the Biosynthesis of Bisindole Natural Products. In: *Chemistry & Biology* 16 (4), S. 351–364.
- Sander, S.; Calado, D. P.; Srinivasan, L.; Köchert, K.; Zhang, B.; Rosolowski, M.; Rodig, S. J.; Holzmann, K.; Stilgenbauer, S.; Siebert, R.; Bullinger, L.; Rajewsky, K. (2012): Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis. In: *Cancer Cell* 22 (2), S. 167–179.
- Sawyers, C. L. (1999): Chronic Myeloid Leukemia. In: *N Engl J Med* 340 (17), S. 1330–1340.
- Scheffold, C.; Berdel, W.; Kienast, J. (2010): Hochdosischemotherapie und Stammzelltransplantation. In: H. B. Hiddemann (Hg.): *Die Onkologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl, S. 536–562.
- Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. In: *Nature* 277 (5698), S. 665–667.
- Schmöle, A. C.; Brennfürer, A.; Karapetyan, G.; Jaster, R.; Pews-Davtyan, A.; Hübner, R.; Ortinau, S.; Beller, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2010): Novel indolylmaleimide acts as GSK-3 $\beta$  inhibitor in human neural progenitor cells. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (18), S. 6785–6795.
- Schmöle, A. C.; Hübner, R.; Beller, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2012): Small Molecules in Stem Cell Research. In: *Curr Pharm Biotechnol* (Epub ahead of print).
- Sève, P.; Dumontet, C. (2008): Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? In: *Lancet Oncol.* 9 (2), S. 168–175.
- Shakoori, A.; Ougolkov, A.; Yu, Z. W.; Zhang, B.; Modarressi, M. H.; Billadeau, D. D.; Mai, M.; Takahashi, Y.; Minamoto, T. (2005): Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (4), S. 1365–1373.
- Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. (1973): Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 (3), S. 765–768.
- Shoemaker, R. H. (2006): The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. In: *Nat Rev Cancer* 6 (10), S. 813–823.
- Si, J.; Mueller, L.; Collins, S. J. (2011): GSK3 inhibitors enhance retinoic acid receptor activity and induce the differentiation of retinoic acid-sensitive myeloid leukemia cells. In: *Leukemia* 25 (12), S. 1914–1918.
- Siemann, D. W. (2011): The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. In: *Cancer Treatment Reviews* 37 (1), S. 63–74.
- Silberstein, S. D.; McCrory, D. C. (2003): Ergotamine and Dihydroergotamine: History, Pharmacology, and Efficacy. In: *Headache* 43 (2), S. 144–166.
- Smith, D. G.; Buffet, M.; Fenwick, A. E.; Haigh, D.; Ife, R. J.; Saunders, M.; Slingsby, B. P.; Stacey, R.; Ward, R. W. (2001): 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (5), S. 635–639.
- Sparks, A. B.; Morin, P. J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1998): Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. In: *Cancer Res.* 58 (6), S. 1130–1134.

- Statistisches Bundesamt (2011): Krebs immer häufiger Todesursache. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html>.
- Stengel, C.; Newman, S. P.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. (2009): Class III  $\beta$ -tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. In: *Br J Cancer* 102 (2), S. 316–324.
- Sun, M.; Meares, G.; Song, L.; Joep, R. S. (2009): XIAP associates with GSK3 and inhibits the promotion of intrinsic apoptotic signaling by GSK3. In: *Cellular Signalling* 21 (12), S. 1857–1865.
- Takahashi-Yanaga, F.; Sasaguri, T. (2008): GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. In: *Cellular Signalling* 20 (4), S. 581–589.
- Takanari, H.; Yosida, T.; Morita, J.; Izutsu, K.; Ito, T. (1990): Instability of pleomorphic tubulin paracrystals artificially induced by Vinca alkaloids in tissue-cultured cells. In: *Biol. Cell* 70 (1-2), S. 83–90.
- Tamaoki, T.; Nomoto, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F. (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135 (2), S. 397–402.
- Tas, J.; Westerneng, G. (1981): Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nuclei acids studied in a model system of polyacrylamide films. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29 (8), S. 929–936.
- Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J. (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (3), S. 231–241.
- Tomek S., Zielinski C. C. (2000): Neue Zytostatika — Trends der Medikamentenentwicklung an der Jahrtausendwende. In: *Acta Chirurgica Austriaca*, Bd. 6. 32. Aufl.: Springer-Verlag, S. 270–275. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02949153>.
- Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. (2005): Disrupting tumour blood vessels. In: *Nat. Rev. Cancer* 5 (6), S. 423–435.
- Vats, T.; Buchanan, G.; Mehta, P.; Ragab, A.; Hvizdale, E.; Nitschke, R.; Link, M.; Beardsley, G. P.; Maybee, D.; Krischer, J. (1992): A study of toxicity and comparative therapeutic efficacy of vindesine-prednisone vs. vincristine-prednisone in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. A Pediatric Oncology Group study. In: *Invest New Drugs* 10 (3), S. 231–234.
- Verdier-Pinard, P.; Wang, F.; Martello, L.; Burd, B.; Orr, G. A.; Horwitz, S. B. (2003): Analysis of tubulin isotypes and mutations from taxol-resistant cells by combined isoelectrofocusing and mass spectrometry. In: *Biochemistry* 42 (18), S. 5349–5357.
- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *Journal of Immunological Methods* 184, S. 39–51.
- Vilpo, J. A.; Koski, T.; Vilpo, L. M. (2000): Selective toxicity of vincristine against chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. In: *Eur. J. Haematol.* 65 (6), S. 370–378.
- Wade, R. H. (2009): On and Around Microtubules: An Overview. In: *Mol Biotechnol* 43 (2), S. 177–191.
- Wahl, A. F.; Donaldson, K. L.; Fairchild, C.; Lee, F. Y.; Foster, S. A.; Demers, G. W.; Galloway, D. A. (1996): Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. In: *Nat. Med.* 2 (1), S. 72–79.

- Wang, H.; Cheng, G.; Du, Y.; Ye, L.; Chen, W.; Zhang, L.; Wang, T.; Tian, J.; Fu, F. (2013): Hypersensitivity reaction studies of a polyethoxylated castor oil-free, liposome-based alternative paclitaxel formulation. In: *Mol Med Rep* 7 (3), S. 947–952.
- Wang, T. H.; Wang, H. S.; Soong, Y. K. (2000): Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. In: *Cancer* 88 (11), S. 2619–2628.
- Wang, Z.; Smith, K. S.; Murphy, M.; Piloto, O.; Somervaille, T. C. P.; Cleary, M. L. (2008): Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. In: *Nature* 455 (7217), S. 1205–1209.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. (1971): Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. In: *J. Am. Chem. Soc.* 93 (9), S. 2325–2327.
- Watcharasit, P.; Thiantanawat, A.; Satayavivad, J. (2008): GSK3 promotes arsenite-induced apoptosis via facilitation of mitochondria disruption. In: *J Appl Toxicol* 28 (4), S. 466–474.
- Weaver, B. A. A.; Cleveland, D. W. (2005): Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. In: *Cancer Cell* 8 (1), S. 7–12.
- Weinstein, I. B. (2002): Cancer: Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. In: *Science* 297 (5578), S. 63–64.
- Weiss, R. B.; Donehower, R. C.; Wiernik, P. H.; Ohnuma, T.; Gralla, R. J.; Trump, D. L.; Baker, J. R.; van Echo, D. A.; Hoff, D. D. von; Leyland-Jones, B. (1990): Hypersensitivity reactions from taxol. In: *J. Clin. Oncol.* 8 (7), S. 1263–1268.
- Wienecke, A.; Bacher, G. (2009): Indibulin, a novel microtubule inhibitor, discriminates between mature neuronal and nonneuronal tubulin. In: *Cancer Res.* 69 (1), S. 171–177.
- Williams, C.; Bryant, A. (2011): Short versus long duration infusions of paclitaxel for any advanced adenocarcinoma. In: *Cochrane Database Syst Rev* (5), S. CD003911.
- Wilson, W.; Baldwin, A. S. (2008): Maintenance of Constitutive I B Kinase Activity by Glycogen Synthase Kinase-3 / in Pancreatic Cancer. In: *Cancer Research* 68 (19), S. 8156–8163.
- Wilson, W. H.; Chabner, B. A.; Bryant, G.; Bates, S.; Fojo, A.; Regis, J.; Jaffe, E. S.; Steinberg, S. M.; Goldspiel, B. R.; Cheson, B. D. (1995): Phase II study of paclitaxel in relapsed non-Hodgkin's lymphomas. In: *J. Clin. Oncol.* 13 (2), S. 381–386.
- Wilson, W. R.; Li, A. E.; Cowan, D. S. M.; Siim, B. G. (1998): Enhancement of tumor radiation response by the antivasular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. In: *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 42 (4), S. 905–908.
- Xie, G.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; William L. J. (1995): Protein kinase C- $\alpha$  inhibitors; structure-activity relationships in bis-indole series. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5 (5), S. 497–500.
- Yardley, D. A. (2008): Activity of ixabepilone in patients with metastatic breast cancer with primary resistance to taxanes. In: *Clin. Breast Cancer* 8 (6), S. 487–492.
- Yu, D.; J. T.; Liu, B.; Yao, J.; Tan, M.; McDonnell, T. J.; Hung, M. C. (1998): Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. In: *Mol. Cell* 2 (5), S. 581–591.
- Yu, J. L. (2002): Effect of p53 Status on Tumor Response to Antiangiogenic Therapy. In: *Science* 295 (5559), S. 1526–1528.

- Zhang, C. C.; Yang, J. M.; White, E.; Murphy, M.; Levine, A.; Hait, W. N. (1998): The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. In: *Oncogene* 16 (12), S. 1617–1624.
- Zhao, H.; Quan, H.; Xie, C.; Xu, Y.; Xie, F.; Hu, Y.; Lou, L. (2012): YHHU0895, a novel synthetic small-molecule microtubule-destabilizing agent, effectively overcomes P-glycoprotein-mediated tumor multidrug resistance. In: *Cancer Letters* 314 (1), S. 54–62.
- Zhao, Z.; Wolkenberg, S. E.; Sanderson, P. E. J.; Lu, M.; Munshi, V.; Moyer, G.; Feng, M.; Carella, A. V.; Ecto, L. T.; Gabryelski, L. J.; Lai, M. T.; Prasad, S. G.; Yan, Y.; McGaughey, G. B.; Miller, M. D.; Lindsley, C. W.; Hartman, G. D.; Vacca, J. P.; Williams, T. M. (2008): Novel indole-3-sulfonamides as potent HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2), S. 554–559.
- Zhou, F. Q. (2005): Cell Biology: GSK-3 and Microtubule Assembly in Axons. In: *Science* 308 (5719), S. 211–214.
- Zhou, P. (2001): MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. In: *Blood* 97 (12), S. 3902–3909.
- Zhou, X. J.; Placidi, M.; Rahmani, R. (1994): Uptake and metabolism of vinca alkaloids by freshly isolated human hepatocytes in suspension. In: *Anticancer Res.* 14 (3A), S. 1017–1022.
- Zivny, J.; Klener, P.; Pytlik, R.; Andera, L. (2010): The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. In: *Curr. Pharm. Des.* 16 (1), S. 11–33.
- Zweifel, M.; Jayson, G. C.; Reed, N. S.; Osborne, R.; Hassan, B.; Ledermann, J.; Shreeves, G.; Poupard, L.; Lu, S.-P.; Balkissoon, J.; Chaplin, D. J.; Rustin, G. J. S. (2011): Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer. In: *Ann. Oncol.* 22 (9), S. 2036–2041.

## 9 Anhang

### 9.1. Tabellen und Abbildungen

**Tabelle 9.1.1** Die antiproliferativen Effekte der GSK3 $\beta$ -Inhibition in verschiedenen Tumorentitäten

Tumorlinie	Zusammenfassung	Referenz
Pankreas-Karzinom	Pankreas-Ca-Linien exprimieren aktiven GSK3-Pool. Inhibition von GSK3 $\beta$ führt zu Apoptose; niedrigerer Proliferation. Inhibition des NF $\kappa$ B-Signalwegs distal von IKK.	(Ougolkov et al. 2005)
	GSK3 unterstützt Proliferation und Überleben von Pankreas-Ca-Linien via konstitutivem NF $\kappa$ B-Signalling. GSK3 $\alpha$ -Inhibition effektiver. GSK3 unterstützt IKK-Aktivität in Pankreas-Ca-Zelllinien	(Wilson und Baldwin 2008)
Kolon-Karzinom	Höhere GSK3 und GSK3 $\beta^{Y216}$ -Level in getesteten Kolon-Karzinomen. GSK3-Inhibition reduziert Proliferation und fördert Apoptose in Kolon-Karzinom-Zelllinien.	(Shakoori et al. 2005)
	Pharmakologische GSK3-Inhibition resultiert in höheren p53-, p21-Spiegeln und verminderter Expression des p53-Antagonisten Mdm2. Inhibiert Wachstum von Kolon-Karzinom-Zelllinien in vivo.	(Ghosh und Altieri 2005)
Glioblastom	Höhere Level GSK3/GSK3 $^{Y216}$ in Patientenmaterialien und Zelllinien. Inhibition führt zu höheren p53/p21-Spiegeln und höherer Sensitivität gegenüber Strahlung/Chemotherapeutika in Zelllinien.	(Miyashita et al. 2009)
Ovarial-Karzinom	Höhere GSK3 $^{Y216}$ -Spiegel in Zelllinien, vergesellschaftet mit höheren cyclinD1-Spiegeln. Inhibition mit LiCl inhibiert Tumorstadium in vitro und in vivo.	(Cao et al. 2006)
Leukämien	GSK3-Inhibition induziert Apoptose in B-CLL-Zelllinien. GSK3 akkumuliert im Nukleus und interferiert mit der Transkription von NF $\kappa$ B-Zielgenen wie Bcl-2, XIAP. Inhibition von GSK3 führt zu epigenetischem Silencing dieser Zielgene .	(Ougolkov et al. 2007)
	GSK3 ist für den Erhalt von MLL (AML/ALL) Leukämien durch Destabilisierung von p27 $^{kip1}$ notwendig. GSK3-Inhibition führt speziell in MLL Leukämien zur Reduktion von Proliferation/Tumorbildung in vitro und in vivo.	(Wang et al. 2008)
	All-trans-retinoic-acid-induzierte (ATRA) Differenzierung	(Si et al. 2011)

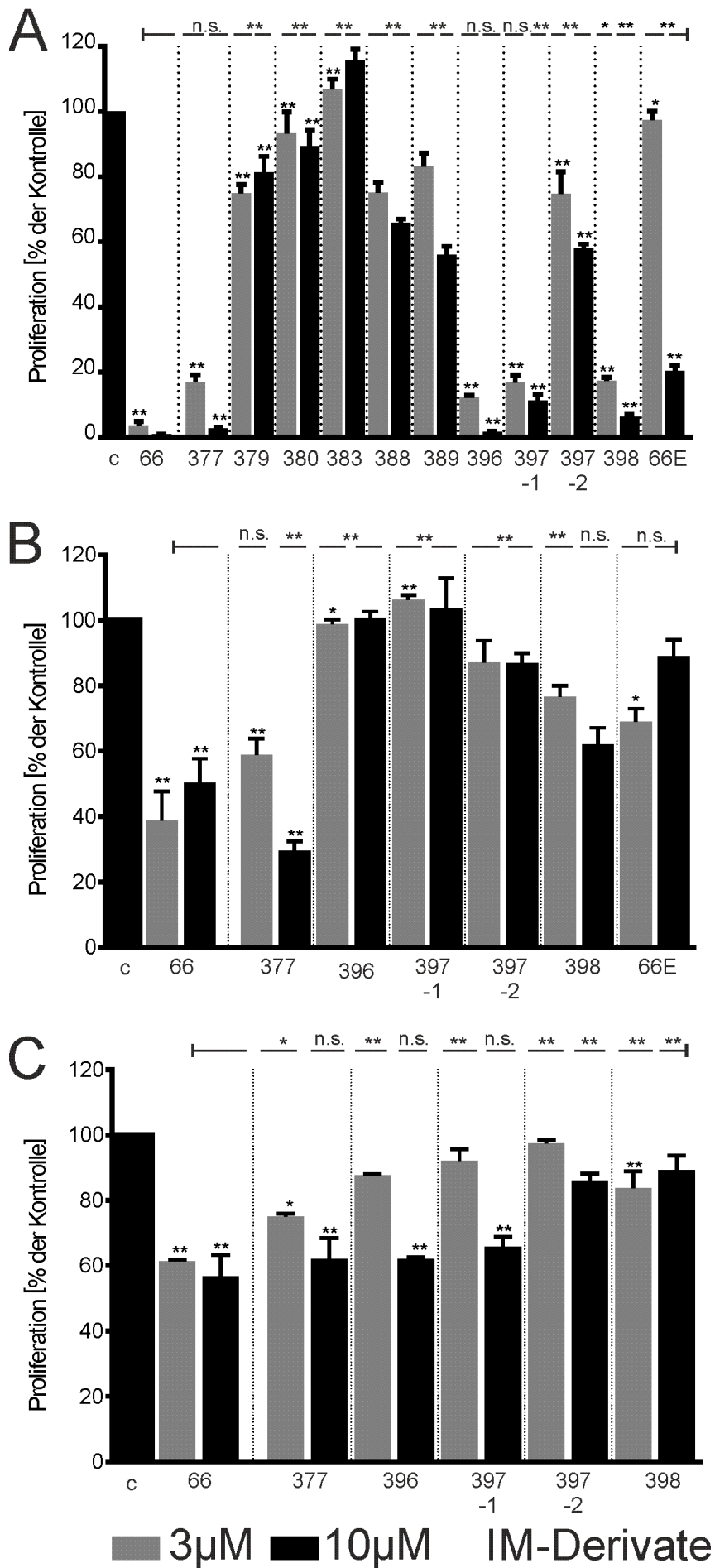


## 9 Anhang

	in sensitiven, myeloischen Leukämie-Linien führt zur GSK3-Inhibition. GSK3-Inhibition wirkt synergistisch mit ATRA-RAR $\alpha$ -Bindung/ in Transkription von Zielgenen/ Differenzierung.	
	GSK3-Akkumulation in primären ALL-Zellen. GSK3-Inhibition löst Apoptose infolge verminderter NF $\kappa$ B-Zielgen Transkription aus.	(Hu et al. 2010)
Medulläres Schilddrüsen-Karzinom	GSK3-inhibition mit LiCl und SB-216763 inhibiert Wachstum von SD-Ca-Zelllinien in vitro und vivo über die Stabilisierung der CDK-Inhibitoren p21/p27/p15.	(Kunnimalaiyaan et al. 2007)
Prostata-Karzinom	GSK3-Inhibition senkt die Aktivität des Androgen-Rezeptors, während die genetische Inhibition von $\beta$ -catenin seine Aktivität fördert. GSK3-Inhibition senkt Androgen-Rezeptor-Protein-Level und verlangsamt das Wachstum in hormon-resistenten Prostata-Karzinom-Zelllinien	(Mazor et al. 2004)

**Tabelle 9.1.2** zeigt die Verteilung unterschiedlicher Tubulin-Isoformen in physiologischen und pathologischen Geweben. Adaptiert nach Kavallaris et al. (Kavallaris 2010)

Tubulin-Isoform	Gensymbol	Vorkommen
$\beta$ I	TUBB	Konstitutive Expression
$\beta$ II	TUBB2a TUBB2b	Hauptform in Neuronen. Niedrig in Lunge, Niere, Milz, Magen, Thymus. Erhöht in Prostataadenokarzinomen
$\beta$ III	TUBB3	Neurone und testikuläre Sertolizellen. Erhöht in einer großen Zahl von Tumoren.
$\beta$ IVa	TUBB4	Hirn-spezifisch
$\beta$ IVb	TUBB2c	Konstitutiv, höchste Spiegel in Testisgewebe. In postranslationell modifizierter Form erhöht in HCC
$\beta$ V	TUBB6	Adenocarcinome Uterus und Endometrium
$\beta$ VI	TUBB1	Spezifisch in Zellen der Hämatopoese: Megakariozyten, Thrombozyten



**Abbildung 9.1.1 zeigt den antiproliferativen Effekt verschiedener Indolylmaleimid-Derivate (IM-Derivate) im Vergleich mit PDA66 in hNPZ, A549- und SW480-Zellen.**

**A hNPZ.** Die Derivate 377, 396 und 397-1 zeigten mit PDA66 vergleichbare Effekte in einer Konzentration von 3µM (keine signifikanten Unterschiede). In einer Konzentration von jeweils 10µM war die antiproliferative Wirkung von PDA377 und PDA396 nur geringfügig schlechter als die entsprechende PDA66-Konzentration (Unterschiede nicht signifikant). Gegenüber der DMSO-Kontrolle zeigten einzig die Derivate PDA 383 (10µ), 388 und 389 (je beide Konzentrationen) keine signifikanten Unterschiede.

**B A549.** Aus dem Substanzscreening in den Progenitorzellen wurden die Derivate PDA377, 396, 397-1, 397-2, 398 und 66E ausgewählt. Nur PDA377 (3µM), 398 (10µ) und 66E (beide Konzentrationen) reduzierten die Proliferation nicht signifikant schlechter als die entsprechende PDA66-Konzentration. Das Derivat PDA377 übertraf den antiproliferativen Effekt von PDA66 in einer Konzentration von 10µM signifikant (PDA377: 29,5±5,2%; PDA66: 50,3±13,0%). Gegenüber der DMSO-Kontrolle verringerten PDA66 (beide Konzentrationen), 377 (beide Konzentrationen), 396 (beide Konzentrationen).

**C SW480.** In den Kolon-Karzinomzellen reduzierte kein Derivat die Proliferation in stärkerem Ausmaß als PDA66. Die Substanzen PDA377, 396 und 397-1 erreichten jeweils in einer Konzentration von 10µM Endzellzahlen, die nicht signifikant höher als in den mit PDA66 behandelten Proben ausfielen.

Gegenüber der Kontrolle waren die Endzellzahlen in Anwesenheit von PDA66 (beide Konzentrationen), 377 (beide Konzentrationen), 396 (10µM), 397-1 (10µM) und 398 (3µM) signifikant niedriger.

Endzellzahl normiert gegen DMSO-Kontrolle. Signifikanzangaben über der Abbildung geben das Niveau gegen PDA66, äquimolar an. \*p<0,05; \*\*p<0,01

**Tabelle 9.1.3** zeigt die antiproliferative Wirkung verschiedener Indolylmaleimid-Derivate in hNPZ, Lungen (A549)- und Kolon (SW480)-Karzinomzelllinien. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Endzellzahl gegenüber der DMSO-Kontrolle.

	<u>hNPC</u>		<u>A549</u>		<u>SW480</u>	
	3µM	10µM	3µM	10µM	3µM	10µM
<b>66</b>	3,6±1,8	0,9±0,3	38,9±15,4	50,3±13,0	61,3±1,0	56,6±11,5
<b>377</b>	17,1±3,7	2,7±0,7	58,8±8,5	29,5±5,2	75,0±1,5	62,1±11,0
<b>396</b>	12,1±1,2	1,7±0,4	98,7±2,6	100,7±3,4	87,7±0,7	62,0±1,0
<u><b>Derivat</b></u> <b>397-1</b>	16,8±4,0	11,2±3,2	106,3±2,4	103,6.6±16,1	92,0±6,3	65,9±5,1
<b>397-2</b>	74,7±11,9	58,1±2,2	87,0±11,7	87,0±5,1	97,5±1,7	86,0±3,7
<b>398</b>	17,3±1,9	6,2±1,3	76,6±5,8	62,1±8,7	83,8±8,8	89,2±7,8
<b>66E</b>	97,4±2,7	20,3±1,7	68,0±4,0	89,0±4,9		

**Tabelle 9.1.4** Geräte

Beschreibung	Gerät	Firma
--------------	-------	-------

## 9 Anhang

Durchflussszytometer	FACScalibur	Becton Dickenson, Heidelberg
Entwässerungsgerät, Tissue Processor	TP1020	Leica Biosystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Inkubator	CB150	Binder, Tuttlingen
Kamera	DS2M	Nikon, Kingston, UK
Kühlzentrifuge	Universalzentrifuge Z383K	Hermle, Wehingen
Mikroliterzentrifuge	Z233-MK	Hermle, Wehingen
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
Plate Reader	Tecan500	Tecan, Crailsheim
Rotationsmikrotom	RM2245	Leica Biosystems, Wetzlar
Sterilwerkbank	Antares48	Heraeus, Berlin
Vakuumpumpe	Univac	UniEquip, Martinsried
VEC-DIC-Mikroskopie	Diaphot 300	Nikon, Japan
Zellkultur-Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Kingston, UK
Zellzähler	Casy TT-Model	Roche, Mannheim

**Tabelle 9.1.5 Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Artikel-Nummer	Vertrieb
FACS-Röhrchen, 5ml	337033	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen epT.I.P.S.; 10; 100; 1000µl	0030000811 0030000870 0030000919	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße; 1,5ml	0030125150	Eppendorf, Hamburg
Corning Zentrifugen Röhrchen; 15; 50ml	CLS430791 CLS430290	Sigma-Aldrich, Hamburg
Serologische Pipetten; 5; 10; 25ml	606107 607107 760107	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturschalen; 6; 48; 96 Kavitäten	657160 677180 650180	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturflasche; T75cm <sup>2</sup>	658170	Greiner Bio-One, Solingen

**Tabelle 9.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze**

Artikel	Artikel-	Vertrieb
---------	----------	----------

## 9 Anhang

	<b>Nummer</b>	
B27	17504-044	Invitrogen, Darmstadt
Benzonase	E1014	Sigma-Aldrich, Hamburg
bFGF	PHG6015	Invitrogen, Darmstadt
EGF	PHG0311	Invitrogen, Darmstadt
DMEM (4,5g/l Glucose), 4,5g/l Glucose	11960-044	Invitrogen, Darmstadt
DMEM/F12	11320-033	Invitrogen, Darmstadt
FBS (fetales Kälberserum)	10091-148	Invitrogen, Darmstadt
HBSS	14170-120	Invitrogen, Darmstadt
Heparin-Natrium-Salz	H3149	Sigma-Aldrich, Hamburg
Humanes Serum Albumin	A9080	Sigma-Aldrich, Hamburg
Laminin	3400-010-01	Trevigen, Gaithersburg, USA
MEM (nicht-essentielle Aminosäuren; 2.2g/l L-Glutamin)	11095-080	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 100x	15140-122	Invitrogen, Darmstadt
RPMI1640	11875-093	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	25200-056	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-Inhibitor	T6522	Sigma-Aldrich, Hamburg

## **9.2 Danksagungen**

Die höchste Eisenbahn.

Die Doktorarbeit ist endlich geschrieben – Zeit, all denen zu danken, die mich während der langen Zeit unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Rolfs für die Gelegenheit, dieses spannende Thema im AKos bearbeiten zu dürfen, für seine kritischen und wertvollen Hinweise.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Moritz Frech – Danke für alles und vor allem fürs Fels in der Brandung-Sein!- und Dr. Anne Schmöle, die sich die Zeit genommen hat, mich auf meinen allerersten Schritten im Labor zu begleiten. Auch allen anderen jetzigen und vorherigen Mitarbeitern des AKos möchte ich für Ihre Unterstützung danken: Jan, Norman, Ellen, Sebastian, Lea, Michi, Anne, Rayk, Caro, Peter, Andrea, Venkata und Xin.

Prof. Matthias Beller und Dr. Anahit Pews-Davtyan vom Leibniz-Institut für Katalyse danke ich für die stets sehr angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit.

Prof. Friedrich Prall vom Institut für Pathologie der Universität Rostock danke ich für die freundliche Mitbegutachtung der histologischen Präparate und für mehr als nur ein interessantes Gespräch über wissenschaftliche Themen.

Ebenfalls danke ich Prof. Christian Junghanß, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universität Rostock, für die kritische Mitbegutachtung und Kommentierung der Daten sowie

Dr. Sergei Kuznetsov vom Mikroskopiezentrum Rostock für seine Unterstützung in der Durchführung der Experimente zur Tubulin-Videomikroskopie.

Und am Schluss sei den wichtigsten Personen gedankt: meinen Freunden und meiner Familie. Danke für eure Geduld, danke fürs Dasein – ihr seid toll.

## 9.3 Publikationen

### 9.3.1 Originalarbeiten

**Eisenlöffel, C.**; Schmöle, A. C.; Pews-Davtyan, A.; Brennführer, A.; Kuznetsov, S. A.; Hübner, R.; Frech, S.; Schult, C.; Junghanss, C.; Beller, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2013): Interference of a novel indolylmaleimide with microtubules induces mitotic arrest and apoptosis in human progenitor and cancer cells. In: *Biochem. Pharmacol.* 85 (6), S. 763–771.

Kretzschmar, C.; Roolf, C.; Langhammer, T. S.; Sekora, A.; Pews-Davtyan, A.; Beller, M.; Frech, M. J.; **Eisenlöffel, C.**; Rolfs, A.; Junghanss, C. (2014): The novel arylindolylmaleimide PDA-66 displays pronounced antiproliferative effects in acute lymphoblastic leukemia cells. In: *BMC Cancer* 14, S. 71.

### 9.3.2 Vorträge

21st European Students' Conference – Dimensions of cancer (Berlin), 10-2010

„Characterization of a novel anti-mitotic agent – An approach on multiple cellular levels“

## **9.4 Lebenslauf**

### **Persönliche Informationen**

Geburtsort	Greifswald
Geburtsdatum	15.02.1986

### **Hochschulausbildung**

10/2006 – 10/2012	<b>Studium der Humanmedizin</b> , Universität Rostock
08/2011 – 06/2012	<b>Praktisches Jahr</b>
08/2011 – 12/2011	Institut für Pathologie, Universität Rostock, Rostock
12/2011 – 01/2012	Innere Medizin, Klinikum Südstadt, Rostock
01/2012 – 03/2012	Innere Medizin, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
03/2012 – 06/2012	Chirurgie, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum St. Georg, Leipzig
10/2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12/2012	Approbation als Arzt
Seit 07/2013	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeit in der Abteilung f. Neuropathologie, Universitätsklinikum Leipzig