

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Neuroblastom .....</b>	<b>6</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie .....	6
1.1.2	Lokalisation und klinischer Verlauf .....	6
1.1.3	Stadieneinteilung .....	6
1.1.4	Molekularbiologie und Zytogenetik .....	8
1.1.5	Prognostische Faktoren und Risikostratifizierung .....	9
1.1.6	Therapie .....	10
<b>1.2</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Zellzyklus .....	10
1.2.2	p53 .....	12
1.2.3	p21 .....	13
1.2.4	Mdm2 .....	13
1.2.5	BAX .....	13
1.2.6	ABC(ATP-Binding Cassettes)-Transporter .....	15
<b>1.3</b>	<b>Aurorakinasen .....</b>	<b>15</b>
1.3.1	Aurorakinase A .....	16
1.3.2	Aurorakinase B .....	16
1.3.3	Aurorakinase C .....	17
<b>1.4</b>	<b>Der Panaurorakinaseinhibitor VX-680 .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1	Chemikalien, Zytostatika und Reagenzien .....	21
2.1.2	Geräte und Software .....	23
2.1.3	Verbrauchsmaterial .....	24
2.1.4	Nährmedium und Lösungen für die Zellkultur .....	25
2.1.4.1	Lösungen und Puffer für SDS-Page und Western Blot .....	26
2.1.4.2	Lösungen für den MTT-Assay .....	28
2.1.4.3	Lösungen für die Zellzyklusanalyse .....	29
2.1.5	Antikörper .....	29
2.1.5.1	Westernblotantikörper .....	29
2.1.5.2	FACS-Antikörper .....	30
2.1.6	Zelllinien .....	30

<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Zellkultur und Passagieren der Zellen .....	31
2.2.2	Zellviabilitätstest (MTT-Assay) und Berechnung von IC <sub>50</sub> -Werten .....	32
2.2.2.1	Grundlagen des MTT-Assays .....	32
2.2.2.2	Durchführung.....	33
2.2.2.3	Berechnung von IC <sub>50</sub> -Werten und Kombinationsindices .....	33
2.2.3	SDS-Page und Western Blot .....	34
2.2.3.1	Zellysate.....	34
2.2.3.2	Proteingehaltsbestimmung.....	35
2.2.3.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	35
2.2.3.4	Westernblot.....	36
2.2.3.5	ECL-Auswertung/ Detektion .....	36
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	37
2.2.4.1	Grundlagen .....	37
2.2.4.2	Zellzyklusanalyse nach der Propidiumiodid-Methode .....	38
2.2.4.3	Intrazelluläre FACS-Färbung .....	39
2.2.5	Transduktion.....	40
2.2.6	Statistische Analyse und Darstellung der Daten .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
3.1	Einfluss von VX-680 auf die Zellviabilität der untersuchten Neuroblastomzelllinien .....	42
3.2	Suppression von Phosphohiston H3 durch VX-680 in Neuroblastomzellen.....	43
3.2.1	Einfluss des P-gp-Inhibitors Verapamil auf die VX-680-Wirkung in UKF-NB-3 <sup>VCR</sup> <sup>10</sup> .....	48
3.3	Einfluss von VX-680 auf den Zellzyklus von Neuroblastomzellen .....	49
3.4	p53 und Targetproteine .....	52
3.4.1	p53 .....	53
3.4.2	p21 .....	53
3.4.3	Mdm2 .....	53
3.4.4	BAX .....	54
3.5	Aktivierung von BAX in UKF-NB-3 .....	55
3.6	Effekte von BCRP-1 Überexpression auf die VX-680-Wirkung .....	57
3.6.1	Reversion der BCRP-1-Überexpression mit Hilfe des PX-GFP-Vektors .....	59
3.7	VX-680 in Kombination mit anderen Zytostatika .....	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
4.1	Aktivität von Aurorakinase B in UKF-NB-3 und deren Inhibierung durch VX-680.....	65
4.2	P-gp-Überexpression verhindert die Aurorakinaseinhibierung durch VX-680 .....	66

4.3	VX-680 induziert Endoreduplikation in Neuroblastomzellen .....	66
4.4	Induktion von p53 und p21 .....	67
4.5	BAX-Aktivierung als Folge von VX-680-Behandlung .....	68
4.6	Rolle von p53 für die VX-680-Wirkung im Neuroblastom .....	70
4.7	BCRP-Überexpression generiert Resistenz gegen VX-680 .....	72
4.8	VX-680 in Kombination mit klassischen Zytostatika .....	73
4.9	Abschließende Bewertung .....	74
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>76</b>
6	<b>SUMMARY</b> .....	<b>77</b>
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>78</b>
8	<b>ANHANG</b> .....	<b>85</b>
8.1	Lebenslauf.....	85
8.2	Schriftliche Erklärung .....	86