

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
der Philipps-Universität Marburg.

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andreas Neubauer

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

Wirkung des Farnesyltransferaseinhibitors BZA-5B auf das Wachstum humaner Bronchialkarzinomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Andrea Gabriele Langhans
aus Erlangen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 06.10.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof.Dr Marcus Schuermann

Korreferent: Prof.Dr. Karl-Heinz Pflüger

Abkürzungen

APS	Amoniumpersulfat
BZA	Benzodiazepin
CA	Carcinoma
CAAX	C=Cystein A=aliphatische Aminosäure X=eine andere Aminosäure
Cat-L	Cathepsin L
cm	Zentimeter
CSF	Colony stimulating factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco-Vogts-modifiziertes-Kälber-Serum
DMSO	Dimethyl-Sulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FT	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GGT	Geranylgeranyltransferase
GNEF	Guanosin-Nucleotid-Austausch-Faktor
G-Protein	Guanylnucleotid-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HUK	humane Urokinase
IL	Interleukin
MAP	Mitogen activated protein
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
OD	optische Dichte

kD Kilodalton

K 8/18 Keratin 8/18

NGF Nerval growth factor

PBS Phosphate-buffered-saline

PDGF Platelet derived growth factor

PCR Polymerase chain reaction

RNA Ribonukleinsäure

RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction

SCLC Small cell lung carcinoma

Upm Umdrehungen pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG	9
3	MATERIAL UND METHODEN.....	10
3.1	MATERIALIEN	10
3.1.1	<i>Chemikalien und Lösungen.....</i>	<i>10</i>
3.1.2	<i>Zellkultur.....</i>	<i>10</i>
3.1.3	<i>Wachstumskinetik / Zellzählung.....</i>	<i>11</i>
3.1.4	<i>Radioaktiver Thymidineinbau.....</i>	<i>11</i>
3.1.5	<i>Semiquantitative RT-Polymerase-Kettenreaktion</i>	<i>12</i>
3.1.6	<i>Geräte.....</i>	<i>13</i>
3.1.7	<i>Sonstiges</i>	<i>13</i>
3.2	METHODEN.....	14
3.2.1	<i>Routinezellkultur</i>	<i>14</i>
3.2.2	<i>Die Zelllinien</i>	<i>14</i>
3.2.3	<i>Zellkultur.....</i>	<i>15</i>
3.2.4	<i>Auftauen von Zellen</i>	<i>16</i>
3.2.5	<i>Umsetzen und Vermehren von Zellen.....</i>	<i>16</i>
3.2.6	<i>Einfrieren von Zellen</i>	<i>17</i>
3.2.7	<i>Inhibitorzugabe</i>	<i>17</i>
3.2.8	<i>Fotodokumentation der Zellmorphologien</i>	<i>18</i>
3.2.9	<i>Zellzählung.....</i>	<i>18</i>
3.2.10	<i>Radioaktiver Thymidineinbau MMT-Test.....</i>	<i>19</i>
3.2.11	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>20</i>
3.2.12	<i>cDNA Synthese.....</i>	<i>21</i>
3.2.13	<i>Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	<i>22</i>
3.2.14	<i>Acryl-Amid-Gele 6%.....</i>	<i>24</i>
3.2.15	<i>Densitometrie.....</i>	<i>25</i>

4	ERGEBNISSE	26
4.1	AUSWIRKUNG AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE	26
4.1.1	<i>Ras transformierte und nicht transformierte Zellen werden gegenübergestellt.....</i>	26
4.1.2	<i>Vergleich der Morphologie der Zelllinie EPLC-32M1 mit und ohne Einsatz von 20µM BZA-5B.....</i>	26
4.1.3	<i>Vergleich der Morphologie der Zelllinie LCLC-97TM1 mit und ohne Einfluss von 20µM BZA-5B.....</i>	28
4.1.4	<i>Morphologie der Zelllinie NIH-3T3ras mit und ohne Einfluss von 20µM BZA-5B.....</i>	29
4.1.5	<i>NIH-3T3 nach Einsatz von 50µM BZA-5B</i>	30
4.2	WACHSTUMSKINETIKEN MIT HILFE VON ZELLZÄHLUNG AM COULTER COUNTER	30
4.2.1	<i>Erste Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien</i>	30
4.2.2	<i>Zweite Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien</i>	33
4.2.3	<i>Dritte Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien</i>	36
4.2.4	<i>Wachstumskinetik + / - BZA mit weiteren humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien.....</i>	38
4.2.5	<i>Wachstumskinetik mit Mausfibroblasten.....</i>	40
4.2.6	<i>Zusammenfassung der Wachstumskinetiken Tag 1-7</i>	42
4.3	PROLIFERATIONSTESTS MIT HILFE VON RADIOAKTIVEM THYMIDINEINBAU	43
4.3.1	<i>EPLC-32M1 im Vergleich zu LCLC-97TM1.....</i>	43
4.3.2	<i>LCLC-103H im Vergleich zu NCl-H23</i>	44
4.4	SEMIQUANTITATIVE RT-PCR, QUANTITATIVE AUSWERTUNG DES EXPRESSIONSGRADES MITTELS DENSITOMETRIE	45
4.4.1	<i>RT-Polymerase-Kettenreaktion mit Darstellung auf Acryl-Amid-Gelen</i>	45
5	DISKUSSION	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	64

1 Einleitung

Onkogene sind eigenständige genetische Einheiten, die für sich alleine Transformationsfähigkeit in Säugetierzellen besitzen. Sie entfalten ihre Wirkung entweder durch Überexpression eines bestimmten Proteins, welches das Wachstum stimuliert, oder über die Kodierung von Proteinen, die die Fähigkeit verloren haben, in negativer Weise reguliert zu werden. Die von Onkogenen abgeleiteten Produkte sind von ihrer Funktion her Tyrosinkinasen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Kernproteine und Guanylnukleotid bindende Proteine. Gemeinsam ist ihnen ihre Einbindung in Mechanismen der Signalübermittlung und der positiven Kontrolle des Wachstums.

Eines der ersten Onkogene, das man identifizieren konnte, war das virale *ras*-Gen. (Lowy and Willumsen, 1993). Umschriebene Mutationen der zugehörigen zellulären Homologe K-*ras*, N-*ras* und H-*ras* konnten als eine der häufigsten genetischen Alterationen in humanen Tumoren nachgewiesen werden. Diese Mutationen betreffen fast ausschließlich die Positionen innerhalb der Codons 12, 13 und 61 (M. Barbacid, 1987).

Mit den heutigen Nachweismethoden der selektiven Oligonukleotid-Hybridisierung, des RNase Protectionasseys in Kombination mit der Single Strand Conformational Polymorphism- (SSCP-) Technik bzw. der Polymerasekettenreaktion (PCR) findet man bei 90% der Pankreasadenokarzinome, 50% der kolorektalen und 50% der Schilddrüsentumoren sowie bei 30% der Lungenkarzinome eine Punktmutation in den Positionen Kodon 12, 13 und 61 (J.L. Bos, Review, 1989). Mit zunehmender Sensitivität der Nachweismethoden sind sie noch häufiger nachweisbar (Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

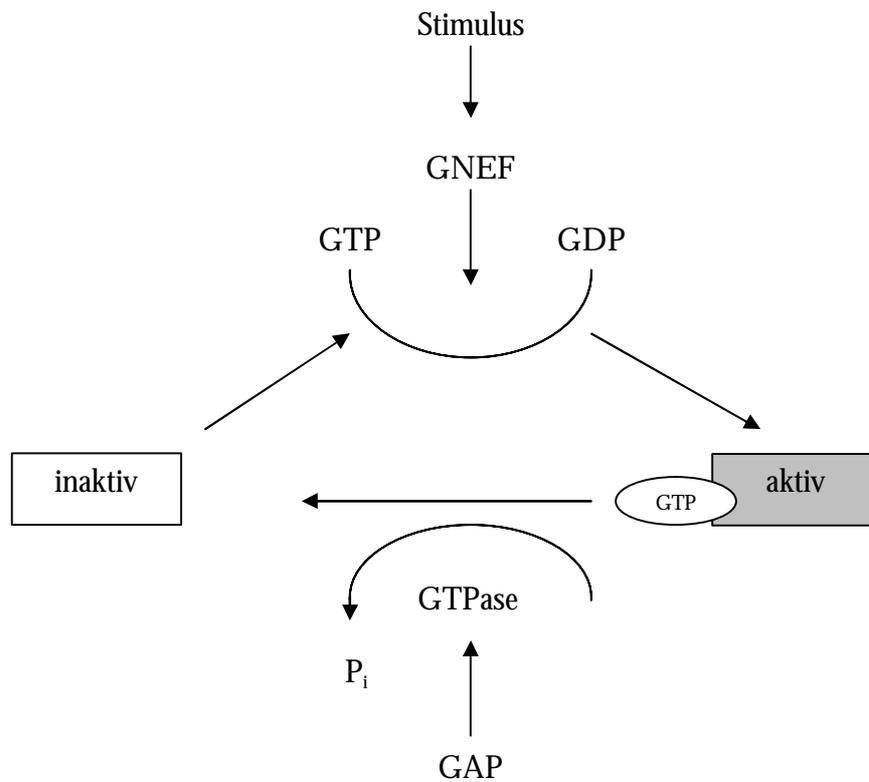
Die drei heute bekannten Varianten des *ras*-Onkogens H-*ras*, K-*ras* und N-*ras* haben alle die gleiche Exon-Intron-Struktur und kodieren jeweils ein 21 kilo Dalton Protein (p21^{ras}). Diese bestehen aus 188 oder 189 Aminosäuren und unterscheiden sich nur am Carboxylende (M. Barbacid, 1987). Das *ras*-Produkt wird als GTP/GDP-bindendes Protein ähnlich den G-Proteinen (G steht für Guanylnukleotid) verstanden, das als membrangebundenes Protein an der Signaltransduktion mittels Second-Messenger-System beteiligt ist. Viele Rezeptoren besitzen eigene Proteinkinaseaktivität oder sind eng mit einer solchen assoziiert. Protein-Tyrosinkinasen haben eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion (Ch. Wagner, 1996). Sowohl extrazelluläre Stimuli mit intrinsischer Tyrosinkinase Aktivität, wie die Rezeptoren für EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), NGF (Nerval Growth Factor), CSF1 (Colonie Stimulating Factor) und Insulin, als auch solche ohne intrinsische Tyrosinkinase Aktivi-

tät wie der T-Zell-Rezeptor, Interleukinrezeptoren IL-2, IL-3 und IL-5 und der Erythropoetin-Rezeptor, die über Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen arbeiten, können p21ras aktivieren. Der Thrombinrezeptor und α_2 muskarinische Rezeptoren aktivieren über heterotrimere G-Proteine das p21Ras. Auf diese Weise fungiert es als Umschaltstelle von der Rezeptor Tyrosin Kinase zur MAP Kinase Kaskade (Mitogen-Activated Protein). Auf der Membraninnenseite wird bereits gebundenes GDP nach Stimulation mit z.B. PDGF durch GTP ersetzt. Die Guanosin-nukleotid-Austauschfaktoren (GNEFs) konnten hier als verantwortliche Proteine isoliert werden (G. J. Pronk, J. L. Bos, Review, 1994). Dieser Zustand des gebundenen GTP entspricht der aktiven Form des Ras-Proteins (Ch. Wagner 1996). Die betroffene Zelle erhält ein mitogenes Signal, das zur Zellproliferation führt.

Um das p21ras wieder zu inaktivieren, bedarf es neben einer schwachen intrinsischen hydrolytischen GTPase Aktivität des Ras-Proteins zusätzlich eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP). Dieses katalysiert die Hydrolyse vom GTP der aktiven Form zum GDP der inaktiven Form (G.J. Pronk, J.L. Bos, Review 1994).

Onkogene Ras-Proteine befinden sich in einem Zustand, in dem die Hydrolyse des GTP zu GDP nicht möglich ist, es also dauerhaft „eingeschaltet“ bleibt und somit eine ständige Stimulation erfährt, die zu malignem Wachstum beizutragen scheint (N. Yan *et al.*, 1995).

Im vergangenen Jahrzehnt sind verschiedene Versuche, die onkogene Ras-Funktion zu blockieren fehlgeschlagen. Erst die Erkenntnis, dass das Ras-Protein eine posttranslationale Lipid-Modifikation erfährt, hat zur Entwicklung einer Generation von Substanzen geführt, die spezifisch auf die Ras-Funktion wirken sollen (J.B. Gibbs, 1991; J.B. Gibbs *et al.*, 1994).



GNEF = Guanosin-Nukleotid-Austausch-Faktoren

GAP = GTPase-aktivierendes-Protein

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer GDP/GTP vermittelten Signaltransduktion

Damit das Ras Protein an seinem Wirkort der Membran verankert werden kann (Lowy and Willumsen, 1993), muß es eine posttranslationale Modifikation durchlaufen (J.F. Hancock *et al.*, 1989). Dies geschieht in ungefähr 0,5% der Säugerzellen durch kovalente Bindung von Isoprenderivaten (entweder einem 15-Kohlenstoff-Farnesyl oder einem 15-Kohlenstoff-Geranylgeranyl) über Thioetherbindung an das carboxylterminale Cystein solcher Proteine, die eine CAAX Sequenz enthalten (C=Cystein; A=aliphatische Aminosäure; X=eine andere Aminosäure) (M.B. Dalton *et al.*, 1995). Schätzungsweise 80 bis 90% der durch Isoprenderivate modifizierten Proteine erhalten einen Geranylgeranyl-Rest. Die zellulären Proteine Prelamin A, Lamin B und auch das p21Ras werden dagegen farnesyliert.

Die Farnesylation stellt den ersten Schritt der Prozessierung dar. Sie wird gefolgt von endoproteolytischer Abspaltung der drei carboxylterminalen Aminosäuren und S-Adenosylmethionin abhängigem Anhängen einer Methylgruppe an die freie Carboxylgruppe des farnesylierten Cysteinrestes. All diese Schritte sind jeder für sich enzymabhängig.

Der für die Prozessierung des p21Ras Proteins wichtige Schritt der Farnesylation wird durch die Farnesyl-Protein-Transferase (FPTase) katalysiert. Es handelt sich um ein heterodimeres, Zn^{+} und Mg^{2+} abhängiges Enzym, das die Bindung von Farnesyl-diphosphat an die CAAX-Sequenz des Akzeptorproteins katalysiert; X steht hier meist für einen Serin- oder Methioninrest, im Falle des p21Ras für einen Serin-Rest.

Da die Funktion des p21Ras von seiner Lokalisation an der Plasmamembraninnenseite abhängig ist, und die Membranverankerung nach Farnesylation des Proteins erfolgt, lag die Überlegung nahe, die Proteinfunktion durch Blockade der FPTase zu hemmen, um so die Ras-abhängige Zelltransformation zu unterbinden. Zwar werden neben Ras auch noch andere Proteine farnesyliert, die meisten Substrate der Isoprenmodifikation erhalten aber einen Geranylgeranyl-Rest, der mit Hilfe einer Gruppe von Geranylgeranyl-Protein-Transferasen (GGPTase-I bzw. -II) übertragen wird (N.E. Kohl *et al.* 1993). So ist sichergestellt, dass der größte Teil der posttranslationalen Modifikationen zellulärer Proteine durch einen spezifisch entwickelten Farnesyltransferase-Inhibitor nicht beeinträchtigt werden würde.

Das Tetrapeptid CAAX ist die kleinste benötigte Einheit für die Erkennung des Ras durch die FPTase. Man fand, dass Tetrapeptide mit der gleichen carboxylterminalen Sequenz wie die Substrate der FPTase als kompetitive Hemmstoffe wirken. Solche mit Serin oder Methionin an letzter Stelle gelten als wirksame Inhibitoren der FPTase.

Entwicklung von Farnesyl Protein Transferase Inhibitoren

Verschiedene Gruppen von Forschern haben sich mit der Entwicklung von FPTase-Inhibitoren beschäftigt (z.B.: K. Leftheris *et al.* 1996; Y. Qian *et al.* 1996; Hunt *et al.* 1996; C. Hall *et al.* 1995; M. S. Kang *et al.* 1995; E. C. Lerner *et al.* 1995; Y. Qian *et al.* 1994; M. Nigam *et al.* 1993; A. M. Garcia *et al.* 1993).

Dabei sind eine Reihe von Substanzgruppen entstanden.

Die Arbeitsgruppe um Nancy E. Kohl, Merck Research Laboratories veröffentlichte beispielsweise im Juni 1993 Ergebnisse über die Entwicklung eines selektiven, synthetischen, organischen FPTase-Inhibitors.

Von dem CAAX-Motiv als Vorbild ausgehend und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass im K4A-Ras Cystein-Isoleucin-Isoleucin-Methionin (CIIM) diese Sequenz darstellen, entstanden die beiden Tetrapeptidanaloga L-731,734 und L-731,735.

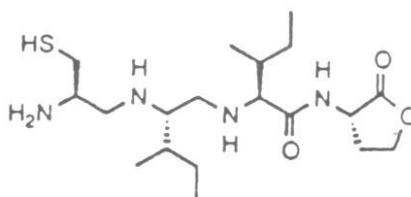


Abbildung 2: CaaX analog prodrug L-731,734 (N. Kohl et al.1993)

Bei beiden Peptiden sind die NH_2 -terminalen Peptidbindungen reduziert, um sie vor Hydrolyse durch Aminopeptidasen, die normalerweise in Zellextrakten nachweisbar sind, zu schützen. Außerdem wurde beim L-731,735 das Methionin durch Homoserin ersetzt, beim L-731,734 durch Homoserin-Lakton. Diese beiden Aminosäuren Homoserin und Homoserin-Lacton sind strukturell dem Serin sehr ähnlich, welches man an der X-Position des H-Ras sowie des Ras 2 von *S. cerevisiae* findet. Daher nahm man an, dass man diese Aminosäuren austauschen kann.

Mit dem Homoserin an der X-Position hatte man einen wirksamen *in vitro* Inhibitor (L-731,735) entwickelt. Die Ladung des Carboxylendes wird aber dafür verantwortlich gemacht, dass dieses Tetrapeptid nicht in intakte Zellen eindringen kann. Zyklisierung des Homoserins zu einem Lakton brachte den gewünschten Erfolg. Die Membranpassage wird so erleichtert, weil das anionische Carboxylat maskiert ist, was die Lipidlöslichkeit der Substanz (L-731,734) erhöht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Kontrollzellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, die Ras-Proteine hauptsächlich membrangebunden aufweisen, während in mit dem FPTase-Inhibitor behandelten Zellen Ras fast vollständig im Zytosol gelöst vorkommt. Die Prozessierung, die für die Membranverankerung unerlässlich ist, hat also hier nicht stattgefunden.

Man geht davon aus, dass die beschriebene Substanz L-731,734 die Ras Farnesylierung *in vivo* hemmt; und dass sie spezifisch auf *ras*-transformierte Zellen und nicht generell zytotoxisch wirkt. Letzteres führt man darauf zurück, dass der Inhibitor nur ein einziges Enzym hemmt, das direkt für die biologische Aktivität des Ras verantwortlich ist.

Etwa zur gleichen Zeit entwickelte der Arbeitskreis um James, Goldstein und Brown, mit Genentech Inc. South San Francisco ebenfalls einen Farnesyl Transferase Inhibitor, der die CAAX-Sequenz zunächst als Modell hatte. Solche Tetrapeptide, die einen aromatischen Rest an dritter Stelle im CAAX-Motiv haben (wie Cystein-Valin-Phenylalanin-Methionin = CVFM), können die Farnesyltransferase *in vitro* inhibieren, ohne selbst dabei farnesyliert zu werden. Die Wirkung führte man sowohl auf den aromatischen Ring, als auch auf die Ladung des NH₂-Restes zurück. Auch diese Peptide sind nicht membrangängig.

Da die Farnesyltransferase Zn²⁺-abhängig ist, stellte man einen Vergleich der Tertiärstrukturen zinkbindender Substanzen an und fand ein -Cys-X-X-Cys-Motiv, das hier gehäuft auftrat und als Modell für die CAAX-Sequenz in gebundenem Zustand dienen konnte. Zum Beispiel ordnen sich die Schwefelwasserstoffreste der beiden Cysteine der Aspartat-Transcarbamylase so an ein einzelnes Zn²⁺-Atom an, dass sie eine Tetrapeptid-schleife bewirken. Nach diesem Vorbild entwarf man eine CAAX-Sequenz, die sich ebenfalls über einen Schwefelwasserstoffrest einerseits und das Carboxylende andererseits an ein Zn²⁺ anlagert, so dass der dazwischen liegende Teil des Tetrapeptides eine Schleife bildet. Die Schleife wurde durch ein nicht-Peptid-Gerüst ersetzt, welches eine schlaufenähnliche räumliche Struktur aufweist. Die NH₂ - und COOH- Reste wurden beibehalten.

Eine der Verbindungen hatte als Ersatz für die aliphatischen Aminosäuren der CAAX-Sequenz ein 3-Amino-1-Carboxy-Methyl-5-Phenyl-Benzodiazepin-2-eins (BZA) erhalten. Das BZA-Gerüst ist hydrophob, also lipidgängig und man erhält wirksame Inhibitoren der CAAX-Farnesyltransferase. Man hat verschiedene BZA-Verbindungen hergestellt die jeweils in zwei Diastereomeren (-A oder -B) vorkommen. Sie wurden alle getrennt getestet und haben unterschiedliche Wirkstärken. Diese sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Substanz		IC ₅₀ (nM)	Anzahl der Versuche
Name	Struktur		
CVFM	CysValPheMet	39 (14-64)*	11
BZA-1A	Cys(BZA)Met-COOH	380, 450	2
BZA-1B	Cys(BZA)Met-COOH	430, 450	2
BZA-2A	Cys(N-Me)(BZA)Met-COOH	350, 390	2
BZA-2B	Cys(N-Me)(BZA)Met-COOH	0,85 (0,26-1,8) *	11
BZA-3A	Cys(N-Me)(BZA)Ser-COOH	≥ 10.000	2
BZA-3B	Cys(N-Me)(BZA)Ser-COOH	8,2 (6,2-10)*	3
BZA-4A	Cys(N-Me)(BZA)Leu-COOH	84, 100	2
BZA-4B	Cys(N-Me)(BZA)Leu-COOH	1,3 (0,5-2,1)*	4
BZA-5B	Cys(N-Me)(BZA)Met-COOMe	32, 50	2
BZA-6B	Cys(N-Me)(BZA)Met-CONH ₂	6,6, 19	2

nach G. L. James *et al.* 1993

*Mittelwerte und Streubreite

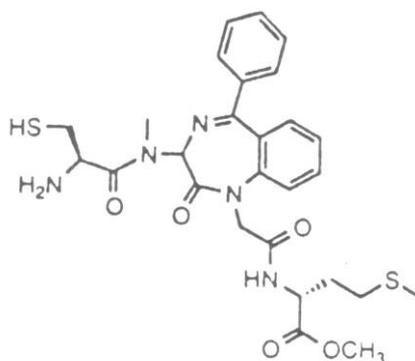


Abbildung 3: CaaX analog prodrug BZA-5B (G.L. James *et al.* 1993) und die Wirkstärken der verschiedenen BZA Diastereomeren

Lungentumoren

Das Bronchialkarzinom ist der häufigste zum Tode führende Tumor des Mannes in der Bundesrepublik und in den meisten anderen industrialisierten Ländern. Bei den Frauen folgt es als zweithäufigster Tumor dem Mammakarzinom, wobei die Zahlen eine steigende Tendenz aufweisen. Insgesamt macht das Bronchialkarzinom circa 25% aller Karzinome aus, bei einer Inzidenz von 60 / 100.000 Personen / Jahr und einem Ver-

hältnis Männer: Frauen von 3:1. Eine Ausnahme bildet das Adenokarzinom mit m:w = 1:6. Die Altersverteilung zeigt ein Maximum bei 55 - 60 Jahren, 5% der Patienten sind unter 40 Jahren.

Nach klinischen und histopathologischen Gesichtspunkten unterscheidet man das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC = *Small Cell Lung Carcinoma*), das vom bronchialen APUD-System (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation-System*) ausgeht, vom nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC = *Non Small Cell Lung Carcinoma*), das sich von den Epithelien der Bronchien und Bronchiolen herleitet. Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome bestehen histologisch zu 40-50% aus Plattenepithelkarzinomen, zu ca. 25% aus Adenokarzinomen, zu 5-10% aus entdifferenzierten großzelligen Karzinomen und aus einigen Mischformen.

NSCLC stellen mit etwa 80% den weitaus größeren Anteil der Bronchialkarzinome dar.

Weniger als 30% aller diagnostizierten Bronchialkarzinome sind einer chirurgischen Therapie zuführbar. Die schnell wachsenden SCLCs sind zum Zeitpunkt der Diagnose zu rund 80% bereits metastasiert und somit nicht mehr operabel. Sie zeigen häufig gutes Ansprechen auf systemische Chemotherapie, meist jedoch mit nur kurzer Remissionsdauer.

NSCLCs dagegen sprechen schlechter auf Chemotherapeutika an, weshalb man in lokal begrenzten Stadien die kurative Operation (H. Hoffmann *et al.* 2002), eventuell mit Nachbestrahlung (PORT Meta-analysis Trialists Group 1998) anstrebt. Die adjuvante Chemotherapie nach primärer Operation eines NSCLC ist noch nicht etabliert und bisher nur im Rahmen von Studien zu empfehlen (M. Serke, V. Rudat 2002).

Jedoch sind ca. 2/3 aller Patienten mit Bronchialkarzinomen bereits bei Aufnahme in eine Klinik inoperabel und damit einer operativen Therapie mit kurativem Ansatz nicht zugänglich. Bei metastasiertem NSCLC stellt die Chemotherapie die Standardbehandlung dar.

Die in vielen Fällen späte Diagnose beruht zum einen auf mangelnden Frühsymptomen, zum anderen häufig auf der Unzulänglichkeit bildgebender und invasiv-bronchoskopischer Methoden. Sogenannte Screening-Methoden wie die zytologische Befundung von Sputum- und Bronchial-Lavage Präparaten sind bisher nur selten erfolgreich.

2 Zielsetzung

Die zuvor beschriebene schlechte Überlebensprognose der Patienten mit behandeltem Bronchialkarzinom legt es nahe, neue Therapiemodalitäten in die Behandlung zu integrieren. Auf diesem Gebiet waren zu Beginn der Arbeit eine Reihe von Farnesyltransferase-Inhibitoren entwickelt und auf ihre Wirksamkeit hin überprüft worden. Sie wurden teils *in vitro* (N. E. Kohl, 1993), teils an Tumorzelllinien (G. L. James *et al.*, 1993; M. B. Dalton *et al.*, 1995) und teilweise im Tierversuch (J. Sun *et al.*; 1995) getestet. Inzwischen liegen auch klinische Studien vor (F. Caponigro *et al.* 2003), diese zumeist in Kombination mit konventionellen Zytostatika oder Strahlentherapie.

Es war Ziel dieser Arbeit, die bisher vielversprechenden Ergebnisse über Farnesyltransferaseinhibitoren am Beispiel der Substanz BZA-5B an nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom Zelllinien, zu überprüfen. Ein besonderer Schwerpunkt lag darin, die Wirksamkeit auf *K-ras*-transformierte Tumorzellen der auf Tumorzellen ohne *K-ras*-Transformation gegenüber zu stellen.

Es sollte damit geprüft werden, ob Farnesyltransferaseinhibitoren Einfluss auf Ras-abhängige Funktionen haben und somit experimentell zur Blockade einsetzbar wären.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid	Merck / Darmstadt
10% APS (Amoniumpersulfat)	Hoechst / Frankfurt
BZA-5B(3-Amino-1-Carboxy-Methyl-5-Phenyl-Benzodiazepin-2-eins-5B)	Genentech Inc./ S. Francisco
DMSO	Merck / Darmstadt
DTT (1,4-Dithiotreitoll)	Merck / Darmstadt
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethyl-Ethylendiamin)	Promega / Heidelberg

10 x TBE-Puffer:	540 g Tris-Base
	240 g Borat
	200 ml 0,5 M EDTA ad 5l dH ₂ O

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2	Behring / Marburg
	8,0 g NaCl
	0,2 g Kcl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1l dH ₂ O

3.1.2 Zellkultur

Zellkulturgefäße:

Kulturflaschen, steril	Greiner / Frickenhausen
Kulturfläche 25 cm ²	Volumen 50 ml
75 cm ²	250 ml
175 cm ²	650 ml

Gewebekulturplatten, steril	Greiner / Frickenhausen
6 Kavitäten (6-well-Platten)	
24 Kavitäten (24-well-Platten)	
96 Kavitäten (96-well-Platten)	

Kloning-Schalen Durchmesser 3 cm	Nunc / Wiesbaden
Einfrierampulle 1ml; Gesamtvolumen 1,2 ml	Nunc / Wiesbaden
Probenröhrchen mit Schraubverschluß	Falcon / Heidelberg
Durchmesser 17 cm	Volumen 15 ml
30 cm	50 ml
Zellkulturmedien:	
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco-BRL / Eggenstein
DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium)	Gibco-BRL / Eggenstein
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco-BRL / Eggenstein
L-Glutamin, 200 mM	Seromed / Berlin
Sonstiges:	
EDTA (Ethylen-diamin-tetraacetat) 0,02%	
in PBS, steril	
Einwegpipetten	Boehringer / Mannheim
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	
Pipetierhilfe Pipetman	Eppendorf / Hamburg
Mycoplasma Tissue Culture Mycoplasmen-Test	Gilson, Abimed / Villiers-le-bel, Frankreich Gen-Probe über Hermann Biermann / Bad Nau- heim
3.1.3 Wachstumskinetik / Zellzählung	
Coulter counter fluid; isotonische Verdünnungslösung	Merck / Darmstadt
Cell coun trainer 1 Gefäße	Müller ratiolab / Dreieich
3.1.4 Radioaktiver Thymidineinbau	
Szintillationsröhrchen 6 ml mit Schraub-/Steckverschluß	Dunn / Asbach
Szintillationsflüssigkeit	Roth / Karlsruhe
Thymidin [$6\text{-}^3\text{H}$] in wässriger Lösung	Amersham / Braunschweig

3.1.5 Semiquantitative RT-Polymerase-Kettenreaktion

3.1.5.1 RNA-Isolierung

RNAzol™ B	Biotex Laboratories, Inc / Houston, Texas
Chloroform	Merck / Darmstadt
Isopropanol	Merck / Darmstadt
Ethanol 75%	Riedel-de Haen AG

3.1.5.2 cDNA-Synthese

Oligo dT ₁₂₋₁₈ Primer	Gibco-BRL / Eggenstein
RNasin	Boehringer / Mannheim
MMLV-RT	Boehringer / Mannheim

3.1.5.3 RT-PCR-Methode

dNTP Set (Desoxyribonukleotidtriphosphat Set)	Boehringer / Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Boehringer / Mannheim
³³ P Nukleotide in wässriger Lösung	DuPont NEN / Dreieich
Bromphenolblau	Sigma / München
1 kb-Leiter (DNA-Standard)	Gibco-BRL / Eggenstein
PCR- Mineralöl	Sigma / München
Oligonukleotidprimer	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung / Mar- burg

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

(5'-primer) 5' - CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA

(3'-primer) 3' - CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT

humane Urokinase (hUK)

(5'-primer) 5' - TCC ATC GAA CTG TGA CTG TC

(3'-primer) 3' - TCA TGC ACC ATG CAC TCT TG

Cathepsin L (Cat L)

(5'-primer) 5' - AAG GCT GCA ATG GTG GCC TAA TGG

(3'-primer) 3' - GGC AAT TCC ACA ATG GTT TCT CCG

Keratin 8 (K8)

(5'-primer) 5' - GCA GTT ACG GTC AAC CAG AG

(3'-primer) 3' - GTA CTG TGC CTT GAC CTC AG

3.1.6 Geräte

Mikroskop Labovert	Leitz / Wetzlar
Mikrofotoeinrichtung Wild MPS 05/12	Leica / Bensheim
Wasserbad	Heraeus /Hanau
Zellzählgerät Coulter Counter ZM	Coulter Electronics / Luton, England
Biofuge A Tischzentrifuge	Heraeus Christ / Osterode
Biofuge 13 Tischzentrifuge	Heraeus / Hanau
Minifuge RF	Heraeus Christ / Osterode
Cytoperm Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus / Hanau
PHD cell harvester	Cambridge Technologie, über Dunn / Asbach
β-counter LKB Wallac 1219 Rackbeta	LKB Wallac OY / Turku, Finnland
Photometer DU-6 Spectrophotometer	Beckmann / München
Heizblock Techne Dri-Block DB 3	Techne / Wertheim
Robo-Cycler PCR-Gerät	Stratagene / Heidelberg
Geltrockner (Gel Dryer Model 583)	BioRad / München

3.1.7 Sonstiges

Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak / New York
Farb-Diafilm Ektachrome 100 ASA	Kodak / New York
Reaktionsgefäße mit Deckel 0,75 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf / Hamburg
Reaktionsgefäße ohne Deckel 1,5 ml	Eppendorf / Hamburg
Software Densitometrie: Gel-Scan 3.1	Lab Office Firma BioSieTec Dr. R. Jäger / Frankfurt

3.2 Methoden

3.2.1 Routinezellkultur

Alle Versuche wurden mit humanen Bronchialkarzinomzelllinien und Mausfibroblasten-Zelllinien durchgeführt.

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an der Sterilbank mit Zellkulturflaschen. Diese haben den Vorteil, dass die Kontaminationsgefahr im Vergleich zu den Kulturschalen deutlich geringer ist.

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in 5% CO₂-begasten Brutschränken bei 90% Luftfeuchtigkeit und 37°C.

Die Zellen wurden zweimal in der Woche passagiert und mit frischem, im Wasserbad auf 37°C angewärmtem Medium versorgt. War das Medium zwischen den Passagen gelblich verfärbt (Indikator für die Änderung des pH-Wertes) und somit verbraucht, wurde es gewechselt, indem das alte Medium steril abgesaugt und durch 20 ml frisches, angewärmtes Medium ersetzt wurde.

Eine Kulturflasche konnte sechs bis acht Wochen verwendet werden.

3.2.2 Die Zelllinien

3.2.2.1 LCLC-97TM1

Die Zelllinie LCLC-97TM1 wurde 1978 in Zusammenarbeit der hämatologisch-onkologischen Abteilung der Philipps Universität Marburg mit der humangenetischen Abteilung der Liebig Universität Gießen aus einem Xenotransplantat eines Primärtumors etabliert, der histologisch ein großzelliges Bronchialkarzinom darstellt.

Die Zellen wachsen in oben beschriebenen R 10 Medium adhärent mit einer Verdopplungszeit von 26 Stunden (G. Bepler *et al.*, 1988) und weisen eine Mutation des *ras*-Gens auf (Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

3.2.2.2 EPLC-32M1

Die Zellen wurden ebenfalls von den beiden o.a. Instituten der Philipps Universität und der Liebig Universität etabliert. Histologisch wenig differenzierte Zellen der Linie EPLC-32M1 eines squamösen epitheloidzelligen Karzinoms wurden zunächst aus einem menschlichen Primärtumor gewonnen, dann aber wegen Kontamination durch die sekundäre Zelllinie eines Nacktmaus-Transplantats ersetzt.

Auch diese Zellen wachsen adhärenent mit einer Verdopplungszeit von 16 Stunden (G. Bepler *et al.* 1988), es sind aber keine Mutationen des K-*ras*-Gens oder N-*ras*-Gens nachweisbar (Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

3.2.2.3 LCLC-103H

Eine weitere Linie, die von den beiden oben erwähnten Arbeitsgruppen in Zellkultur etabliert wurde, zeigt das histologische Bild eines großzelligen Bronchialkarzinoms mit Riesenzellen. Sie wurde LCLC-103H benannt. Die menschlichen Tumorzellen wurden aus dem Punktat eines Pleuraergusses gewonnen.

Bei adhärenentem Wachstum weisen sie eine Verdopplungszeit von 40 Stunden auf (G. Bepler *et al.* 1988). Auch hier ist keine Mutation im K-*ras*-Gen oder N-*ras*-Gen nachweisbar (Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

3.2.2.4 NCI-H23

Das histologische Bild eines Adenokarzinoms bietet die Zelllinie NCI-H23, die ebenfalls adhärenentes Wachstum (D. N. Carney *et al.*,1985) und eine *ras*-Mutation aufweist (Mitsudomi,1991).

3.2.2.5 NIH-3T3 und NIH-3T3ras

Mausfibroblasten NIH-3T3 und NIH-3T3ras. Etabliert 1988 durch Transfektion mit dem Plasmid pMS-ras (M. Schuermann *et al.* 1990).

3.2.3 Zellkultur

Die Zellen der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom- (NSCLC = Non Small Cell Lung Carcinoma) Zelllinien wurden in RPMI-Medium kultiviert, dem vor der Verwendung 10% wärmeinaktiviertes fetales Kälberserum (RPMI-Medium + 10% FCS = R 10) und 1% L-Glutamin zugesetzt wurden.

Die Zelllinien der Mausfibroblasten wurden in Dulbecco-Vogts-modifiziertem-Eagle-Medium DMEM (Dulbecco und Vogt, 1954), ebenfalls mit 10% wärmeinaktiviertem fetalem Kälberserum (DMEM + 10% FCS = D 10) und 1% L-Glutamin versetzt, kultiviert. Die Inkubation erfolgte in mit 5% CO₂ begasten Brutschränken bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit.

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf Mykoplasmenkontamination getestet und gegebenenfalls mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin therapiert. Die Zellen konnten getestet werden, nachdem sie drei Tage in antibiotikafreiem Medium kultiviert worden waren.

Als Test-Kit wurde ein DNA-Sonden Test zum Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen verwendet, der auf dem Prinzip der Nukleinsäure-Hybridisierung beruht (Mycoplasma Tissue Culture von Gen-Probe). Mit Hilfe einer spezifischen H-3-markierten DNA-Sonde, die die komplementäre ribosomale RNA Sequenz der Mykoplasmen erkennt, werden die Erreger direkt nachgewiesen. Die Aktivität wurde im β -Counter mit dem Programm A2 gemessen.

Im Falle eines positiven Mykoplasmen Nachweises, wurden die Zelllinien über mehrere Wochen mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin-Hydrochlorid behandelt. Es wurde in einer Konzentration von $50\mu\text{g} / \text{ml}$ eingesetzt und bei jedem Mediumwechsel, also etwa zweimal pro Woche dem Medium zugesetzt.

Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen erneut einem Mykoplasmen-Test unterzogen. Erst bei negativem Mykoplasmen-Test wurden die Zelllinien für die Versuche eingesetzt und kultiviert.

3.2.4 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipetiert. Langsam und unter Schwenken wurden 10 ml 37°C warmen Mediums dazugegeben und noch einmal vorsichtig durchmischt. Um das DMSO des Einfriermediums herauszuwaschen wurden die Zellen 5 min bei 800 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Sie wurden in 5 ml Medium resuspendiert und mit weiteren 15 ml Medium in eine Kulturflasche mit 25 cm^2 Kulturfläche ausgebracht.

3.2.5 Umsetzen und Vermehren von Zellen

Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, müssen die Zellen ca. 80% konfluent sein, bevor sie passagiert werden. Das Vermehren der Zellen und somit des verfügbaren Materials erfolgte durch Aufteilen des vorhandenen Materials auf mehrere Kulturflaschen oder auf Flaschen mit größerer Kulturfläche. Sollte eine Zelllinie in Kultur gehalten werden, ohne vermehrt zu werden, wurde beim Passagieren ein Teil der Zellen wieder auf die alte Kulturfläche ausgebracht, die anderen Teile wurden verworfen.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml EDTA gewaschen und mit weiteren 2 ml EDTA inkubiert bis sie sich abgerundet und vom Kulturflaschenboden gelöst hatten. Sie wurden in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und nochmals 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und wiederum die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Im Verhältnis 1:2 bis 1:5 wurden die Zellen auf Kulturflaschen ausgebracht.

3.2.6 Einfrieren von Zellen

Die Zellen sollen sich zum Zeitpunkt des Einfrierens in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, d. h. sie sollen ca. 70-80% konfluent sein.

Zunächst wurde eine DMSO-Lösung angesetzt. Dafür wurden 1 ml DMSO zu 6,2 ml Medium pipetiert und auf Eis gestellt. Aus den Kulturflaschen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml EDTA gewaschen, bevor sie mit 2 ml EDTA / Trypsin abgelöst wurden. Während der Inkubationszeit wurden die Einfrierampullen beschriftet. Die abgelösten Zellen wurden in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 800 Upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die vorbereitete DMSO-Lösung wurde langsam dazupipetiert und die Zellsuspension auf die Ampullen verteilt, die sofort auf Eis gestellt wurden. Für eine Ampulle benötigt man 0,5 ml Resuspensionsmedium und 0,7 ml DMSO-Lösung, für zwei Ampullen 1 ml Medium und 1,2 ml Lösung, für drei Ampullen 1,5 ml Medium und 1,8 ml Lösung. In Styroporbehältern mit Deckel wurden die Zellen bei -80°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.7 Inhibitorzugabe

Der Farnesyltransferaseinhibitor BZA-5B der Firma Genentec Inc. wurde laut Firmenangaben als 100 mM Stammlösung in 100% DMSO bei -20°C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:100 in frischem 10 mM DTT / PBS verdünnt. Anschließend wurde diese Lösung langsam 1:10 (bzw. 1:20; 1:25; 1:33,33; 1:50 und 1:100) mit 1 mM DTT / Medium Lösung versetzt und kräftig gemischt, so dass sich kein Präzipitat bildete. Die Endkonzentrationen betragen für BZA-5B 50 μM (bzw. 25 μM ; 20 μM ; 15 μM ; 10 μM und 5 μM), für DTT 0,5 mM und für DMSO 0,05%.

Vor der Inhibitorzugabe wurden 4000 Zellen / ml ausgebracht und über Nacht inkubiert damit sie adhärent werden konnten. Alle drei Tage erfolgte ein Inhibitor- und Me-

diumwechsel, wobei ein Teil der ohne Inhibitor inkubierten Vergleichszellen mit entsprechenden Konzentrationen DTT und DMSO versetzt wurden, um BZA-5B unspezifische Effekte erkennen zu können.

3.2.8 Fotodokumentation der Zellmorphologien

Nach dem Ausbringen der Zellen NIH-3T3 und NIH-3T3ras auf 6-well-Platten, wurden sie über Nacht inkubiert, damit sie adhärent werden konnten. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, wobei in jeweils drei Kavitäten einer Platte Inhibitor zugegeben wurde. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop zur Dokumentation fotografiert.

3.2.9 Zellzählung

Die verschiedenen o. g. Zelllinien wurden mit jeweils 4000 Zellen / ml auf 24-well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Dafür wurde 0,5 ml Zellsuspension je Kavität ausgebracht.

Nach 24 Stunden (Tag 1) wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei 0,5 ml frischen Mediums und 0,5 ml der Inhibitorlösung bzw. der Kontrolllösung mit DTT / DMSO bzw. für den Leerwert weitere 0,5 ml frischen Mediums je Kavität eingesetzt wurden.

Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte an Tag 4.

Die Messungen mit dem Coulter Counter wurden an Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7 durchgeführt.

Tag 0	Aussaat
1	Messung 1. Platte
2	Inhibitorzugabe und Mediumwechsel
3	Messung 2. Platte
4	Inhibitor- und Mediumwechsel
5	Messung 3. Platte
6	
7	Messung 4. Platte

Für eine Messung wurde das Medium jeweils einer 24-well-Platte abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit EDTA gewaschen und mit 0,5 ml EDTA / Trypsin-Lösung inkubiert.

Dabei ist darauf zu achten, dass immer nur drei Kavitäten gleichzeitig abgesaugt werden, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturplatte wurden die Zellen jeder Kavität in 9,5 ml isotoner Coulter Counter Lösung behutsam suspendiert und aufgenommen.

Jedes der 24 Coulter Counter Gefäße wurde vor der Messung gegen einen Leerwert von 10 ml isotoner Lösung drei mal langsam umgeschüttelt um eventuell abgesunkene Zellen gleichmäßig in der Lösung zu suspendieren. Nach der Messung wurden die Proben verworfen.

Die erhaltenen Werte wurden in Tabellen eingetragen und nach Errechnung der Mittelwerte halblogarithmisch aufgetragen.

3.2.10 Radioaktiver Thymidineinbau MMT-Test

Um neben der absoluten Zellzahl ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit der kultivierten Zellen zu haben, wurde in der Zellkultur radioaktiv markiertes Thymidin angeboten, welches während der Zellproliferation in das Genom eingebaut wird. Je stärker die Proliferation in der Kultur, desto höher ist nach Inkubation die Konzentration an radioaktiv markiertem Thymidin in der dann hergestellten Zellsuspension. Die von der Suspension ausgehende Strahlung kann dann in einem β -Counter-Gerät gemessen und quantifiziert werden. Die Menge der abgegebenen Strahlung kann als Maß für die Proliferation der jeweiligen Zellkultur herangezogen werden.

Für den Proliferationstest wurden 16×10^3 Zellen / ml auf 96-well-Platten ausgebracht, wobei in jede Kavität 50 μ l Zellsuspension mit der Multipette pipetiert wurden. Die Platten wurden über Nacht inkubiert, um die Zellen adhärent werden zu lassen.

Nach 24 Stunden wurde der Farnesyltransferaseinhibitor wie beschrieben auf eine Konzentration von 15 μ M verdünnt und in die Hälfte der 96 Kavitäten einer Platte je 50 μ l dazupipetiert. Die restlichen Kavitäten wurden mit je 50 μ l der entsprechenden Konzentration DMSO / DTT / Medium versehen. 10 μ l Tritium-Thymidin wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß in 5 ml PBS verdünnt. Mit der Multipette wurden je 10 μ l dieser Lösung in jede Kavität pipetiert und die Platten nochmals über Nacht inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium mit dem Cell-Harvester vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit 50 μ l EDTA sorgfältig gewaschen, mit 50 μ l EDTA / Trypsin Lösung überschichtet und inkubiert. Unter wiederholter Mikroskopkontrolle wurde abgewartet, bis die Zellen sich nach einigen Minuten abgerundet und von der Unterlage gelöst hatten.

Mit dem Cell-Harvester wurden die Zellen abgesaugt, dabei in Filtern gesammelt und in Szintillationsröhrchen überführt, die vorher mit je 2 ml gebrauchsfertiger Szintillationslösung befüllt worden waren.

Nach dem Verschließen der Szintillationsröhrchen wurden sie im β -Counter mit dem Programm A2 gemessen.

3.2.11 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurde mit den oben beschriebenen Zelllinien LCLC-97TM1 und EPLC-32M1 eine Inhibitionskinetik durchgeführt. Die Zellen wurden auf 14 Kloningschalen (3 cm Durchmesser) je Zelllinie mit 16×10^3 Zellen / ml ausgesät. Die Schalen wurden zu sieben verschiedenen Zeitpunkten nach Inhibition mit $15 \mu\text{M}$ BZA-5B bzw. nach Zugabe der entsprechenden DMSO / DTT / Medium Lösung geerntet. Hierfür wurde das RNA-Isolierungs-Reagens RNazol B verwendet. Als Zeitpunkte wurden 0 Stunden, 2, 4, 8, 12, 24, und 48 Stunden gewählt.

3.2.11.1 Homogenisierung

Aus den vier gleichzeitig zu erntenden Kloningschalen wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zwei mal mit PBS gewaschen, bevor in jede Schale $300 \mu\text{l}$ RNazol B pipetiert wurden. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das Lysat mehrfach auf und ab pipetiert und dann in jeweils ein $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf-Röhrchen überführt.

3.2.11.2 RNA-Extraktion

Jeder Probe wurden $30 \mu\text{l}$ Chloroform zugegeben; die Röhrchen wurden fest verschlossen, 15 Sekunden lang umgeschüttelt und für 5 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min in der Minifuge A bei 4°C im Kühlraum. Das Homogenat zeigte nach Zentrifugation eine untere blaue Phenol-Chloroform-Phase, eine obere wässrige Phase und eine Interphase, in der sich DNA und Proteine befinden. In der wässrigen Phase ist die RNA gelöst.

3.2.11.3 RNA-Präzipitation

Die obere Phase wurde in frische Eppendorf-Röhrchen überführt, 1:1 mit Isopropanol versetzt, und 15 min auf Eis gestellt. 15 minütige Zentrifugation bei 12.000 g in der Minifuge A im Kühlraum ergab ein zum Teil mit bloßem Auge nicht sichtbares RNA-Pellet.

3.2.11.4 Waschen der RNA

Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert, das Pellet mit je 300 µl 75% igem Ethanol versetzt, kurz gevortext und nochmals für 8 min bei 7.500 g in der Minifuge A im Kühlraum zentrifugiert.

3.2.11.5 Trocknen der RNA

Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets bei 37°C im Heizblock ca. 30 min getrocknet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Pellets nicht vollständig trocken werden, weil dies die Löslichkeit der RNA herabsetzen würde.

3.2.11.6 Einfrieren der RNA

Jedes RNA-Pellet wurde in 30 µl DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) Wasser verdünnt und bei - 80°C eingefroren.

3.2.12 cDNA Synthese

3.2.12.1 Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration

3 µl jeder RNA-Lösung wurden mit H₂O auf 1 ml Gesamtvolumen verdünnt und gut gemischt. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette gegen Wasser als Nullabgleich bei 260 nm im Spectrophotometer.

Die Absorbtion (OD 260) x 2 entspricht der RNA Konzentration in µg / µl.

3.2.12.2 cDNA Synthese

Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte ein Angleichen der Konzentrationen aller 28 Proben mit H₂O-DEPC.

Für die cDNA Synthese wurde zunächst ein Puffermix angesetzt:

Oligo dT (0,5 µg / µl)	:	2,5 µl	72,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	:	je 3,6 µl	je 104,4 µl
RNasin(30-40 U / µl)	:	2,0 µl	x 29 58,0 µl
5 x RT-Puffer	:	8,0 µl	232,0 µl
0,1 M DTT	:	4,0 µl	161,0 µl
MMLV-RT (200 U / µl)	:	1,5 µl	43,5 µl
		-----	-----
		32,4 µl	939,6 µl

Die 28 Proben RNA wurden zunächst für 10 min bei 70°C im Heizblock inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Für den Reaktionsansatz wurden jeweils 7,6 µl RNA in DEPC-Wasser, für den Leerwert 7,6 µl DEPC-Wasser eingesetzt, die in frische 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert wurden. Zu jedem Ansatz und dem Leerwert wurden 32,4 µl Puffermix gegeben. Die Inkubationszeit im Heizblock betrug 150 min bei 37°C und anschließend 10 min bei 95°C. Hiernach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und bei -20°C eingefroren.

3.2.13 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaktion = PCR), Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt (K. Mullis, F. Faloon; 1987), bietet die Möglichkeit aus einer kleinen Menge vorgegebener DNA eine große Menge von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren.

Das Enzym DNA-Polymerase bedient sich einzelsträngiger DNA als Matritze für einen neuen, komplementären Strang. Einzelstrang-DNA erhält man im Denaturierungsschritt, indem man Doppelstrang-DNA auf Temperaturen um 94°C erhitzt.

Außerdem benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, um die Synthese zu beginnen. Somit kann man den Startpunkt der Synthese auswählen, indem man Oligonukleotidprimer hinzugibt, die sich an gewünschter Stelle anlagern und so die Synthese eines speziellen DNA-Bereiches starten (engl. *prime*). Das Binden (engl. *annealing*) der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA geschieht bei Temperaturen von 37-60°C. Die Annealingtemperatur ist entscheidend für die Spezifität der PCR, wobei niedrige Temperaturen eine hohe Amplifikationsrate und mehr unspezifische Primerbindungen und hohe Temperaturen eine geringe Amplifikationsrate jedoch spezifische Primerbindungen zur Folge haben.

Im dritten Schritt, der Extension, findet die eigentliche Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz statt, indem sich die zugegebenen Desoxynukleotide (dNTPs), katalysiert durch die DNA-Polymerase, anlagern. Die verwendete *Taq*-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welches in heißen Quellen bei einer Temperatur von 75°C lebt. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum von 72°C und bestimmt damit die Extensionstemperatur, ist aber auch noch bei 94°C stabil (A.Chien *et al.* 1976), weshalb es nach einmaliger Zugabe auch die Denaturierungsschritte unbeschadet übersteht.

Nach dem Extensionsschritt folgt wieder ein kurzer Denaturierungsschritt, in dem die neu polymerisierten, doppelsträngigen DNA-Fragmente in Einzelstrangfragmente aufgetrennt werden. So können diese im folgenden Zyklus als neue Matrizen für die Zielsequenz fungieren. Der Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealingschritt und Extension, wird 30-60 mal wiederholt.

Es wurde ein Mixansatz pipetiert:

dNTPs	:	8 μ l	240 μ l
10 x PCR-Puffer	:	5 μ l	150 μ l
H ₂ O	:	26 μ l	780 μ l
3'-Primer	:	5 μ l = 50 pmol x 30	150 μ l
5'-Primer	:	5 μ l = 50 pmol	150 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	:	0,2 μ l = 1 U	6 μ l
		-----	-----
		49,2 μ l	1476 μ l

In 0,75 ml Eppendorf Reaktionsgefäße wurden nach dem Auftauen von jeder der 28 oben beschriebenen cDNA-Proben 1 μ l vorgelegt. Dem Mix wurde 0,1 μ l $\alpha^{(33)}$ P)dCTP pro Ansatz, also 3 μ l des radioaktiven Markers zugegeben, bevor 49,3 μ l des Mixansatzes in jedes vorbereitete Reaktionsgefäß pipetiert wurden. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde mit zwei Tropfen PCR-Öl überschichtet, die Röhrchen wurden fest verschlossen und in das vorgeheizte PCR-Gerät Robo-Cycler gestellt. Das Programm lief mit 60°C Annealing-Temperatur, 72°C Extensions-Temperatur und 95°C Denaturierung-Temperatur in 30 (=28+2) Zyklen.

Als Primer wurden humane Urokinase (HUK), Keratin 8 (K 8) und Cathepsin L (Cat L) verwendet.

Keratin 18 (K18) und das coexprimierte Keratin 8 sind Filamentproteine, die in normalem Epithelgewebe und persistierend in vielen Karzinomen vorkommen. Starke Expression findet man in Karzinomen epithelialer Organe wie Leber, Pankreas, Dick- und Dünndarm, Mamma, Uterus und Harntrakt. In *ras*-transformierten Zellen ist sie um ein vielfaches höher als in Zellen, die den Wildtyp aufweisen. K8 und K18 werden in besonderem Maße für das invasive Verhalten und somit auch für die Metastasierungstendenz der betreffenden Tumoren verantwortlich gemacht (R. Pankov *et al.* 1994).

Cathepsin L ist ein proteolytisches Enzym, das man unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in Lysosomen antrifft. Die Expression dieser Cystein-Proteinase auf mRNA Ebene als auch die Enzymaktivität sind in Lungentumoren nachweislich höher als in normalem Lungengewebe (P. Ledakis *et al.* 1996). Sie korreliert zudem mit der Expression des Ras-Proteins (A. F. Chambers *et al.* 1992). Die Genexpression wird aber durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren reguliert (M. Nilsen-Hamilton; 1991).

Humane Urokinase, ein direkter Aktivator der Plasminogen-Plasmin-Umwandlung, wird von verschiedenen Tyrosin-Kinasen reguliert und ist unter anderem abhängig von der *ras*-Aktivität (E. Lengyel *et al.* 1995). Weitere Faktoren wie Zytokine zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren spielen hier ebenfalls eine regulierende Rolle für die Expression (E. Lengyel *et al.* 1995).

3.2.14 Acryl-Amid-Gele 6%

Für ein Gel werden ca. 40 ml benötigt.

8 ml Acryl-Amid und 2 ml TBE wurden auf 40 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 800 µl 10% igem APS (Amoniumpersulfat) und 80 µl TEMED versetzt.

Die Gele wurden mit Kämmen für 16 Spuren gegossen.

Wenn die Gele fest geworden waren, wurden die Gelkammern vorbereitet. Als Laufpuffer wurde $\frac{1}{2}$ x TBE verwendet, das aus 10 x TBE mit Aqua bidest 1:20 verdünnt wurde. Die Gele wurden eingespannt, angeschlossen und konnten vorlaufen.

In 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße ohne Deckel wurden für jede Probe und den Blank 2 µl Blaumarker vorgelegt und 10 µl jeder Probe pipetiert. Dabei war darauf zu achten, mit der Pipettenspitze durch das Öl in die wässrige Probenphase zu gelangen.

Mit den 28 Proben und Blank wurden zwei Acryl-Amid-Gele beladen wobei in die erste Spur jedes Gels DNA-Größen-Leiter aufgetragen wurde. Die Proben liefen bei 85 bis 120 Volt und wurden bei 56 °C für 45 bis 90 min auf dem Geltrockner getrocknet und in eine Filmkassette eingelegt.

Der aufgelegte Röntgenfilm wurde nach ca. 24 Stunden in der Entwicklungsmaschine der Röntgenabteilung entwickelt.

3.2.15 Densitometrie

Zur objektiven Quantifizierung der erhaltenen Banden wurde eine Densitometrie durchgeführt. Die Software Gel-Scan 3.1 stellte freundlicherweise Dr. R. Jäger Lab Office, Firma BioSieTec zur Verfügung. Das Programm misst die Dichteunterschiede der PCR-Banden und stellt sie graphisch dar.

4 Ergebnisse

Die im folgenden beschriebenen Testreihen wurden sämtlich mit BZA-5B durchgeführt, das uns von der Firma Genentech Inc. South San Francisco zur Verfügung gestellt wurde. Als Lösungsmittel wurde die von der Herstellerfirma vorgegebene Mischung DTT/DMSO verwendet.

Wir verglichen die Wirksamkeit der Substanz an Zelllinien mit und ohne *K-ras*-Mutation verschiedener humaner Karzinomzelllinien sowie Mausfibroblasten-Linien mit und ohne *ras*-Mutation, da die Arbeitsgruppe um James, Goldstein und Brown der Firma Genentech, die BZA-5B entwickelten, eine spezifisch auf das G-Protein Ras bezogene Wirkung beschrieben haben (G.L. James *et al.*; 1994).

4.1 Auswirkung auf die Zellmorphologie

Die Auswahl der Fotografien zeigt die Auswirkungen des Einsatzes von BZA-5B auf NSCLC-Zelllinien und NIH-3T3 Mausfibroblasten. Erkennbar ist die Wirkung auf die Morphologie und auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien.

4.1.1 Ras transformierte und nicht transformierte Zellen werden gegenübergestellt.

Die *ras* transformierten Zellen revertierten in Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit nach Zugabe von BZA-5B und zeigten dann eine Morphologie und ein Wachstumsverhalten vergleichbar zu den gleichzeitig kultivierten, nicht *ras* transformierten Zelllinien. Die nicht *ras* transformierten Zelllinien blieben in dieser Untersuchung von der Wirkung des BZA-5B unbeeinflusst.

Die Zellen wurden in Zellkultur ausgebracht und nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde einem Teil der Kulturen FT-Inhibitor zugesetzt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop täglich beurteilt und nach 48 Stunden zur Dokumentation fotografiert.

4.1.2 Vergleich der Morphologie der Zelllinie EPLC-32M1 mit und ohne Einsatz von 20 μ M BZA-5B

Es lässt sich kein Unterschied im Wachstumsverhalten der mit BZA-5B kultivierten Zellen gegenüber jenen, die ohne BZA-5B kultiviert wurden, erkennen. Die Zellen dieser Zelllinie ohne *ras*-Mutation wachsen adhärent und kontaktinhibiert.

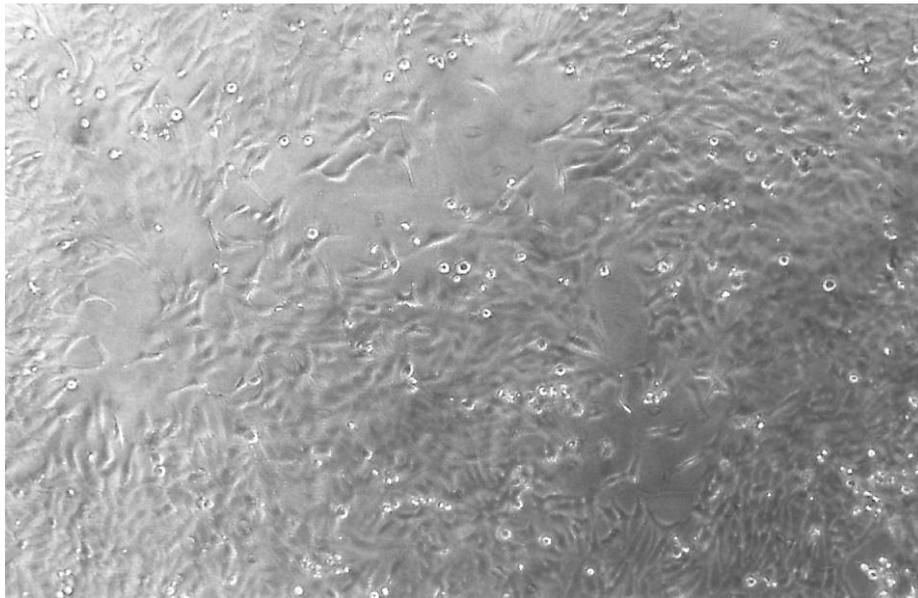


Abbildung 4: Morphologie der Zelllinie EPLC-32M1 ohne Einsatz von 20 μ M BZA-5B

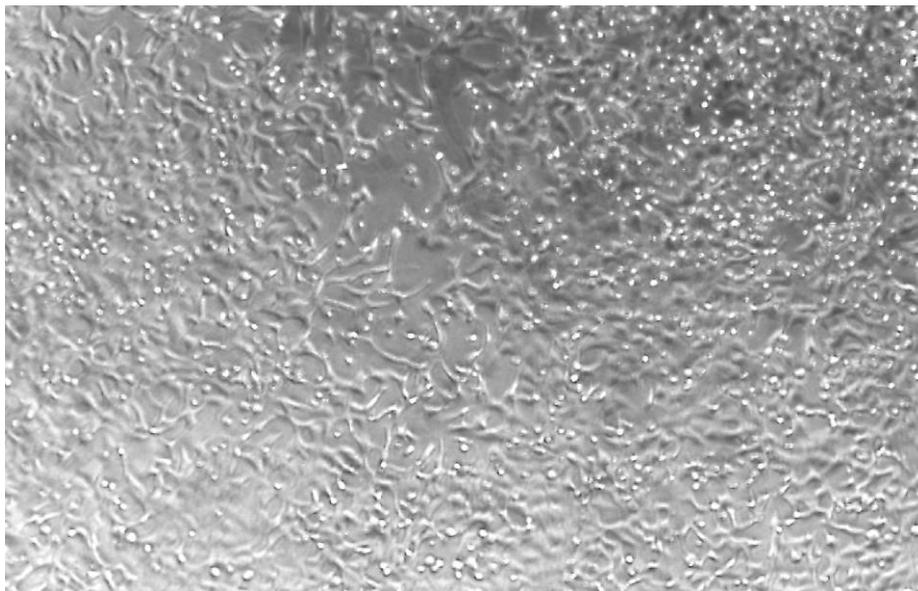


Abbildung 5: Unveränderte Morphologie der Zelllinie EPLC-32M1 nach Einsatz von 20 μ M BZA-5B im Vergleich zu den unbehandelten Zellen

4.1.3 Vergleich der Morphologie der Zelllinie LCLC-97TM1 mit und ohne Einfluss von 20 μ M BZA-5B.

Zu erkennen ist ein Unterschied der Zellzahl und deutlich kleinere Kolonien bei den mit Inhibitor inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kulturen, die ohne Zusatz inkubiert wurden. Dies legt einen wachstumsinhibierenden Einfluss des BZA-5B auf die Zelllinie mit *ras*-Mutation nahe.

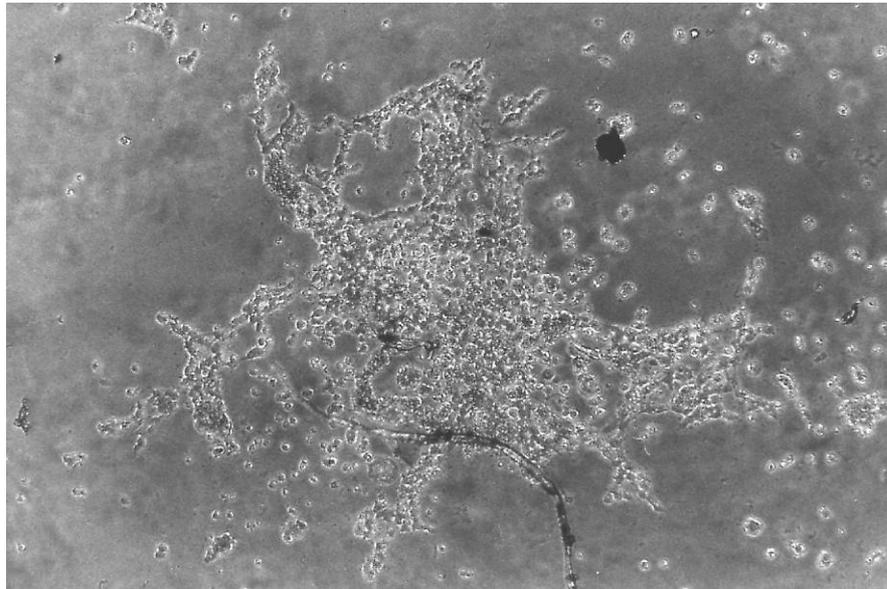


Abbildung 6: Morphologie der Zelllinie LCLC-97TM1 ohne Einfluss von 20 μ M BZA-5B

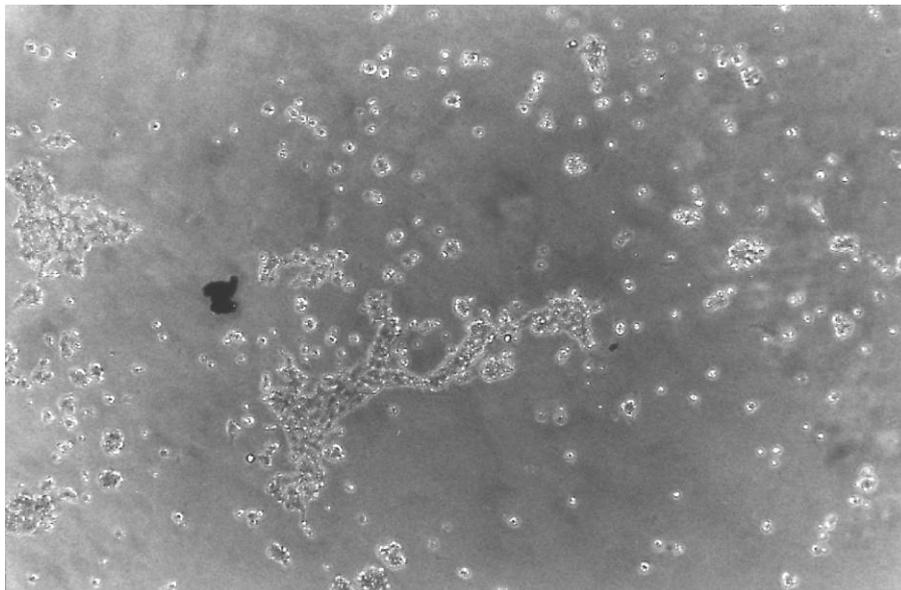


Abbildung 7: Veränderte Zellzahl und Morphologie der Zelllinie LCLC-97TM1 mit Einfluss von 20 μ M BZA-5B

4.1.4 Morphologie der Zelllinie NIH-3T3ras mit und ohne Einfluss von 20µM BZA-5B

Die Fibroblasten mit *ras*-Mutation wachsen unter FTI kontaktinhibiert ähnlich wie NIH-3T3 Kulturen ohne *ras*-Mutation. Die Zellzahl ist geringer, als bei unbehandelten, eine *ras*-Mutation aufweisenden Zellen. Es ergibt sich der Hinweis, dass durch *ras*-Mutationen induziertes Wachstum durch Einsatz von BZA-5B inhibiert wird. Die Zellen der Linie NIH-3T3ras revertiert morphologisch unter BZA-5B.

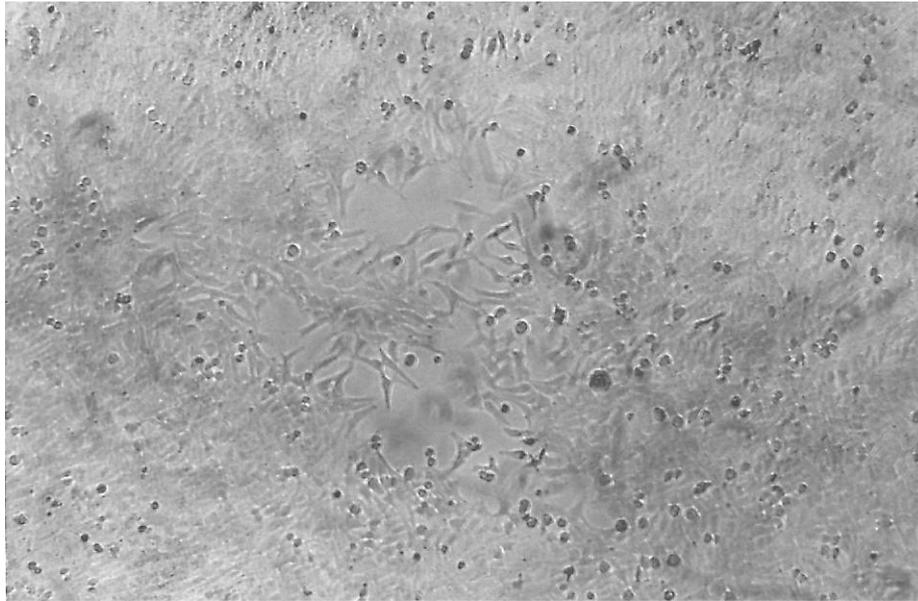


Abbildung 8: Morphologie der Zelllinie NIH-3T3ras ohne Einfluss von 20µM BZA-5B

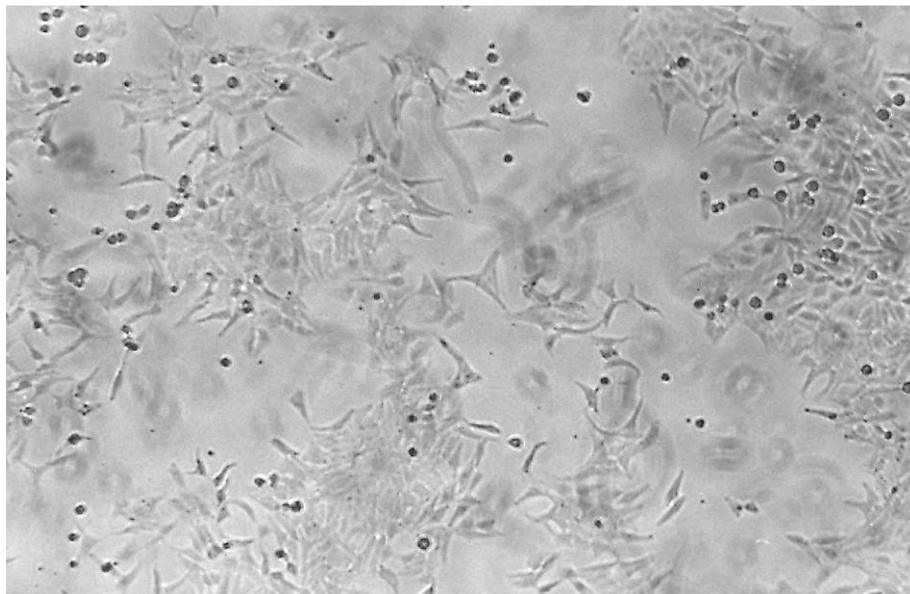


Abbildung 9: Morphologie der Zelllinie NIH-3T3ras mit Einfluss von 20µM BZA-5B

4.1.5 NIH-3T3 nach Einsatz von 50 μ M BZA-5B

Man sieht abgestorbene Zellen in Zellkultur. Die Zellen sind abgerundet, vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst und schwimmen frei in dem flüssigen Medium. Entgegen der Erwartung, dass BZA-5B das Wachstum von Zellen ohne *ras*-Mutation nicht beeinflusst, tritt hier Zelltod ein. Dies führt zu der Vermutung, dass es sich um einen dosisabhängigen, unspezifisch toxischen Effekt handelt.

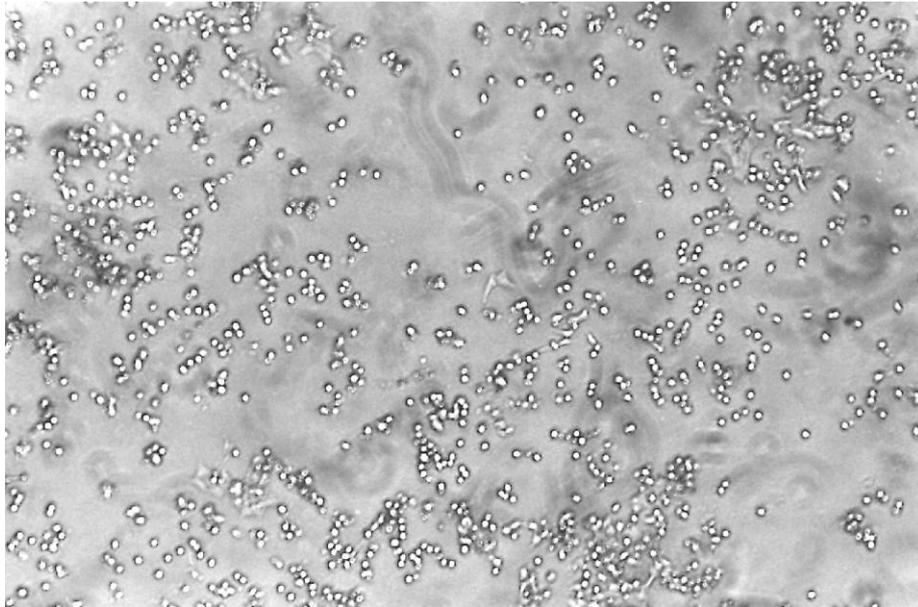


Abbildung 10: Abgestorbene NIH-3T3 Zellen nach Einsatz von 50 μ M BZA-5B; dosisabhängiger, unspezifisch toxischer Effekt

4.2 Wachstumskinetiken mit Hilfe von Zellzählung am Coulter Counter

4.2.1 Erste Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien

In einer BZA-Verdünnungsreihe mit den Vergleichszelllinien LCLC-97TM1 (mit *ras*-Mutation) und EPLC-32M1 (ohne *ras*-Mutation) wurde die Toxizität des Verdünnungsmittels DTT / DMSO gegenüber unbehandelten, also nur in R 10 Medium wachsenden Zellen, sowie die Auswirkungen von 25 μ M bzw. 50 μ M BZA-5B auf das Zellwachstum aufgezeigt. DTT / DMSO wurde bezüglich seiner Wirkung auf das Zellwachstum ausgetestet, da das von uns verwendete BZA-5B darin gelöst war. Mögliche toxische Effekte dieser Lösung und Toxizität der zu testenden Wirksubstanz konnten so differenziert betrachtet werden und mit dem Zellwachstum in reinem Nährmedium verglichen werden.

Die Inhibitorzugabe erfolgte an Tag 1 und 4 nach Aussaat der Zellen auf 24-well-Platten. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte an Tag 1, 3, 5 und 7 am Coulter-Counter- Zählgerät.

Hierbei ergaben sich die in den folgenden Tabellen aufgeführten Werte.

Die Zahlen dokumentieren die gezählten Zellzahlen, also auf das Wachstum innerhalb der betrachteten Zeiträume.

In der ersten Messreihe sind dies Tag 1-3, Tag 3-5 und Tag 5-7.

Zusätzlich wurde das Gesamtwachstum im Zeitraum Tag 1-7 in Prozent errechnet und gegenübergestellt.

In der zweiten Messreihe sind es Tag 1-4, Tag 4-7, Tag 7-10 und zusätzlich Tag 1-7. In der dritten Reihe sind Tag 1-4, Tag 4-7 und Tag 1-7 berechnet. Der Ablauf der vierten und fünften Messreihe entspricht dem Ablauf der ersten Messreihe.

Der spezifische Wirkungsbereich des eingesetzten Farnesyltransferaseinhibitors ergibt sich aus der wachstumsinhibierenden Wirkung auf *ras* mutierte Zelllinien gegenüber so genannten Wildtypen, die keine *ras*-Mutation aufweisen und für die keine Wachstumsinhibierung erwartet wurde. Im Bereich zwischen 15 und 25 μM ist ein deutlicher selektiver Einfluss auf die von uns verwendeten Zelllinien mit *ras*-Mutation auszumachen. Ab 50 μM Inhibitorzugabe zeigt sich eine antiproliferative Wirkung an allen eingesetzten Zelllinien, die am ehesten als unspezifisch toxischer Effekt zu werten ist.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie LCLC-97TM1:

Tag	Medium	+	+ 25 μM BZA	+ 50 μM BZA
		DTT/DMSO		
1	336,33	336,33	336,33	336,33
3	702,50	290,20	183,20	165,20
5	1584,20	742,20	272,20	200,00
7	4967,00	2121,50	269,60	264,00

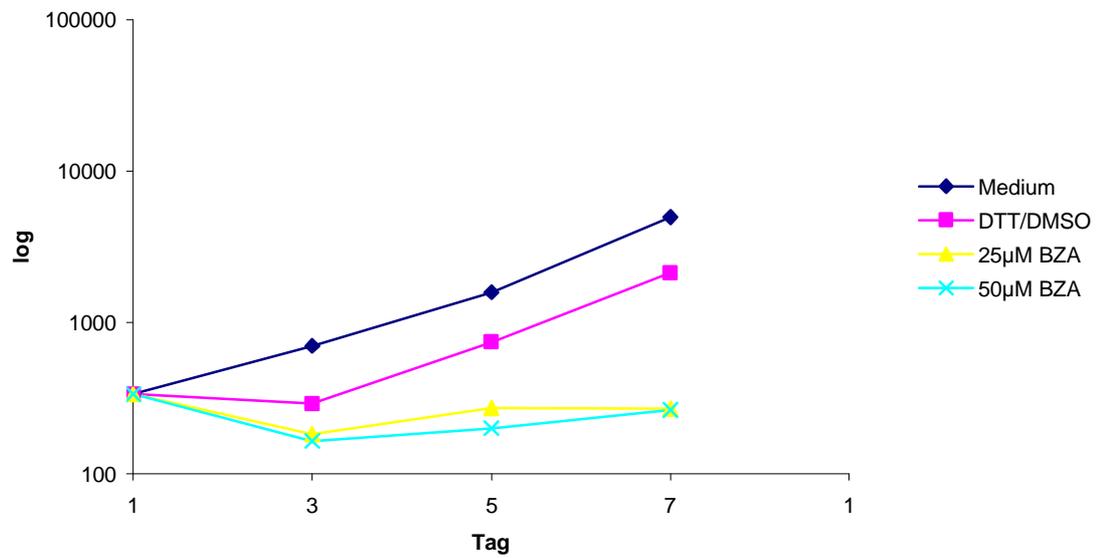


Abbildung 11: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie LCLC-97TM1

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie EPLC-32M1:

Tag	Medium	+ DTT/DMSO	+ 25 µM BZA	+ 50 µM BZA
1	583,40	583,40	583,40	583,40
3	2812,00	2773,80	523,50	558,60
5	14550,00	11938,60	2066,00	555,00
7	31382,00	15613,00	5181,30	731,30

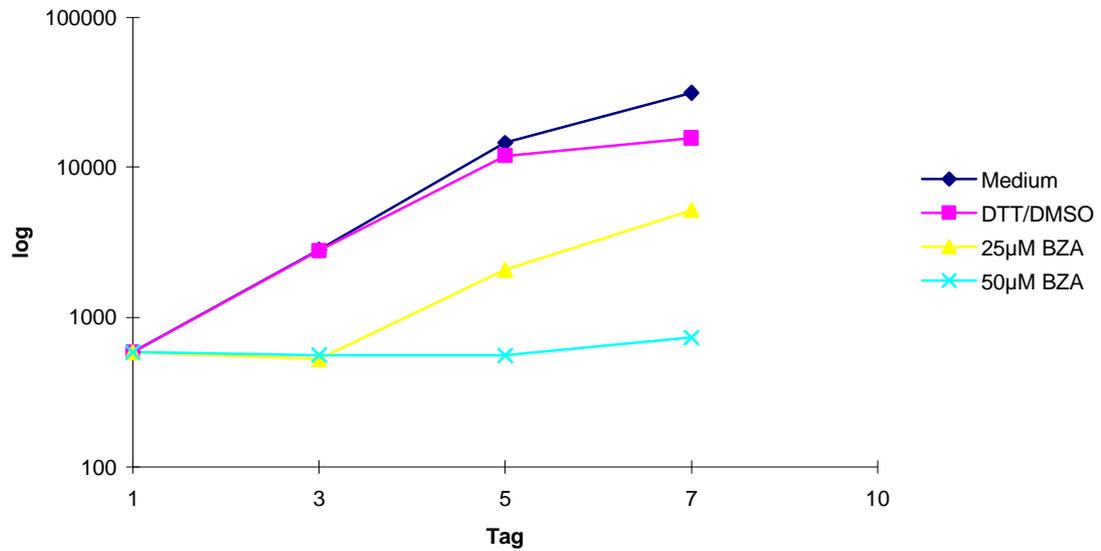


Abbildung 12: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie EPLC-32M1

Sowohl in der Zelllinie mit als auch in der ohne *ras*-Mutation, findet unter der Zugabe von 50 µM BZA-5B kaum Zellwachstum statt, so dass hier von einer unspezifischen, toxischen Wirkung ausgegangen wurde, die zur Eliminierung der Zellen führt. In den entsprechenden Kulturflaschen waren reichlich abgerundete, nicht mehr adhärent wachsende Zellen nachweisbar.

Dagegen war nach Zugabe von 25µM BZA-5B ein deutlicher Unterschied zwischen Zelllinien mit und jenen ohne *ras*-Mutation nachweisbar. Das Wachstum der Linie LCLC- 97TM1 blieb im Gegensatz zu dem von EPLC-32M1 unter Anwesenheit des Inhibitors gehemmt.

4.2.2 Zweite Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien
In einer weiteren BZA-Verdünnungsreihe wurde der Wirkungsbereich des Farnesyltransferaseinhibitors für die verwendeten Zelllinien weiter eingeschränkt, indem die Linien LCLC-97TM1 und EPLC-32M1 mit 5, 10, 20 und 25 µM BZA-5B behandelt wurden. Die als toxisch wirkend angesehene Dosierung von 50 µM BZA-5B wurde fortan nicht mehr in den Versuchen eingesetzt.

Die Inhibitorzugabe erfolgte an Tag 1 und 4. Die Messungen wurden an den Tagen 1, 4, 7 und 10 am Zählgerät vorgenommen. Die Messung an Tag 4 sollte zusätzlich die Frage klären, zu welchem Zeitpunkt, ob an Tag 3 oder 4, die Zellen beginnen, das Wachstum wieder verstärkt aufzunehmen. Dies war mit den vorhergehenden Messreihen, die Zellzählungen an den Tagen 3 und 5 beinhalteten nicht eindeutig darzustellen.

Aus dieser Messreihe ergibt sich, dass der selektive Wirkungsbereich zwischen 10 und 20 μM angenommen wird.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie LCLC-97TM1:

Tag	+ 5 μM BZA	+ 10 μM BZA	+ 20 μM BZA	+ 25 μM BZA
1	307,60	307,060	307,060	307,60
4	1322,67	868,33	412,33	404,67
7	6797,00	4444,67	567,33	364,00
10	14339,67	9396,00	1070,67	431,33

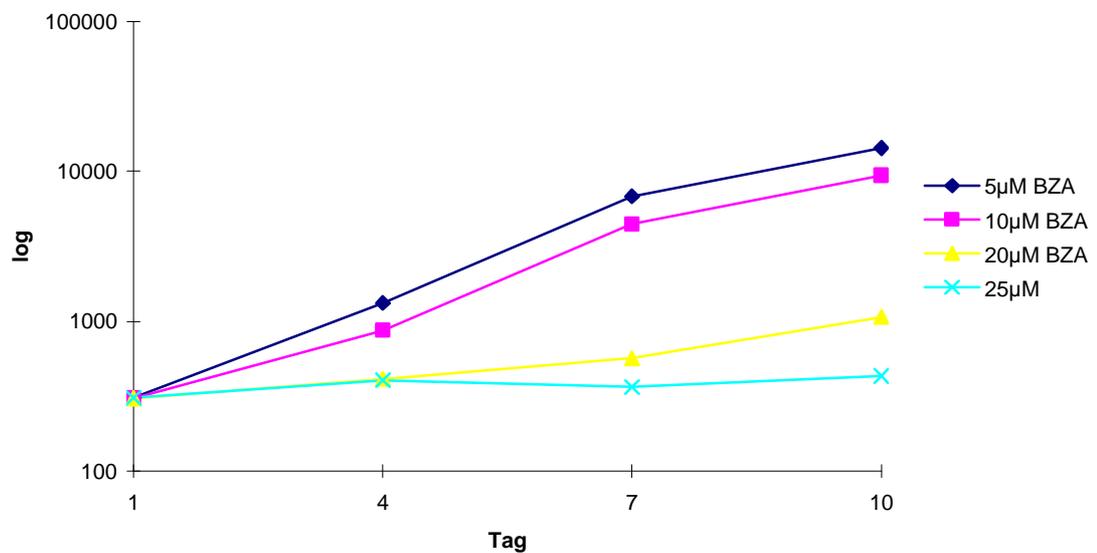


Abbildung 13: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie LCLC-97TM1

Eine Inhibitorkonzentration zwischen 10 und 20 μM BZA-5B wird als noch wirksam angenommen, da sich in diesem Bereich das Wachstumsverhalten stark ändert.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie EPLC-32M1:

Tag	+ 5 μM BZA	+ 10 μM BZA	+ 20 μM BZA	+ 25 μM BZA
1	358,00	358,00	358,00	358,00
4	3162,00	5036,67	5277,00	3105,00
7	22181,00	20758,67	19076,33	13049,00
10	30090,00	26096,67	25606,67	17496,67

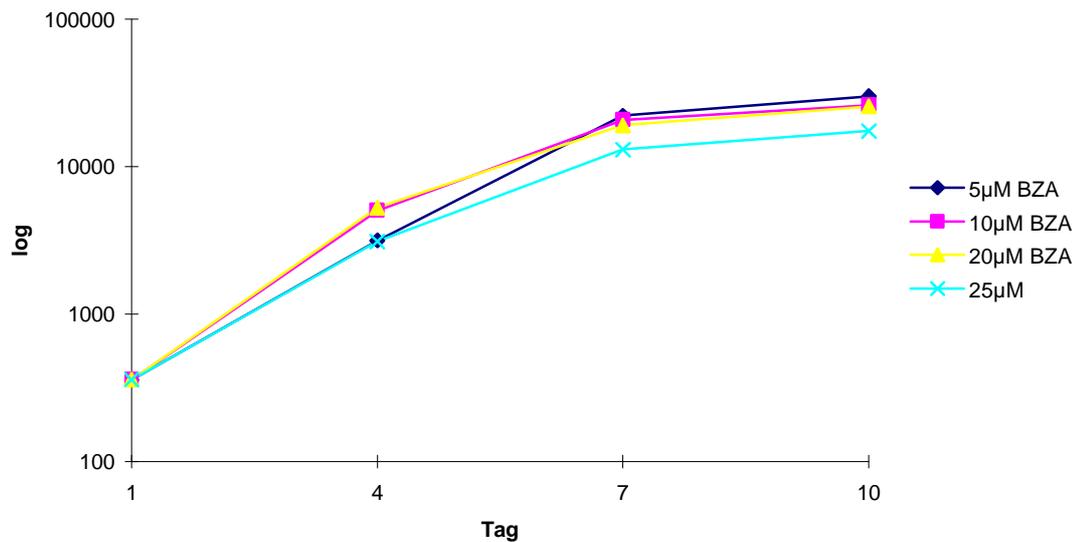


Abbildung 14: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie EPLC-32M1

Die Konzentrationen 5, 10 und 20 μM BZA-5B befinden sich außerhalb des als toxisch angenommenen Bereiches. Es ist keine relevante Proliferationshemmung zu verzeichnen.

4.2.3 Dritte Verdünnungsreihe an humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien
 15 μM BZA-5B wurden als wirksame Inhibitorkonzentration angenommen und eingesetzt. Die Demonstration erfolgte anhand der Zelllinien LCLC-97TM1 und EPLC-32M1, die an Tag 1 und 4 mit dem Inhibitor behandelt wurden.

Die Messungen an dem Coulter-Counter erfolgte an den Tagen 1, 4 und 7 nach Aussaat der Zellen.

Auffällig ist der Wiederanstieg des Wachstums nach Tag 4 trotz nochmaliger Inhibitorzugabe.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie LCLC-97TM1:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 μM BZA
1	572,33	572,33
4	2561,00	775,50
7	10433,00	6094,00

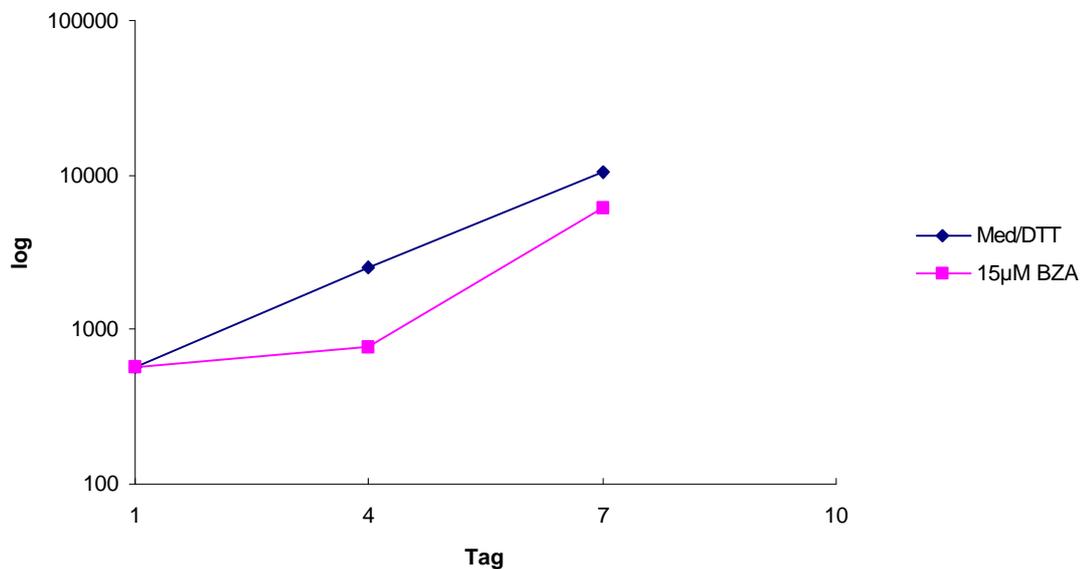


Abbildung 15: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinien LCLC-97TM1

Nach sieben Tagen waren unter Inhibitorbehandlung weniger Zellen vorhanden, als ohne BZA-5B. Allerdings fällt auf, dass die Wachstumsinhibierung in den Zeitraum von

Tag 1-4 fällt. Nach vorübergehender Hemmung nehmen die Zellen das Wachstum in dem folgenden Zeitraum wieder verstärkt auf.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie EPLC-32M1:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 μM BZA
1	262,67	262,67
4	2142,00	1403,00
7	16764,50	14442,50

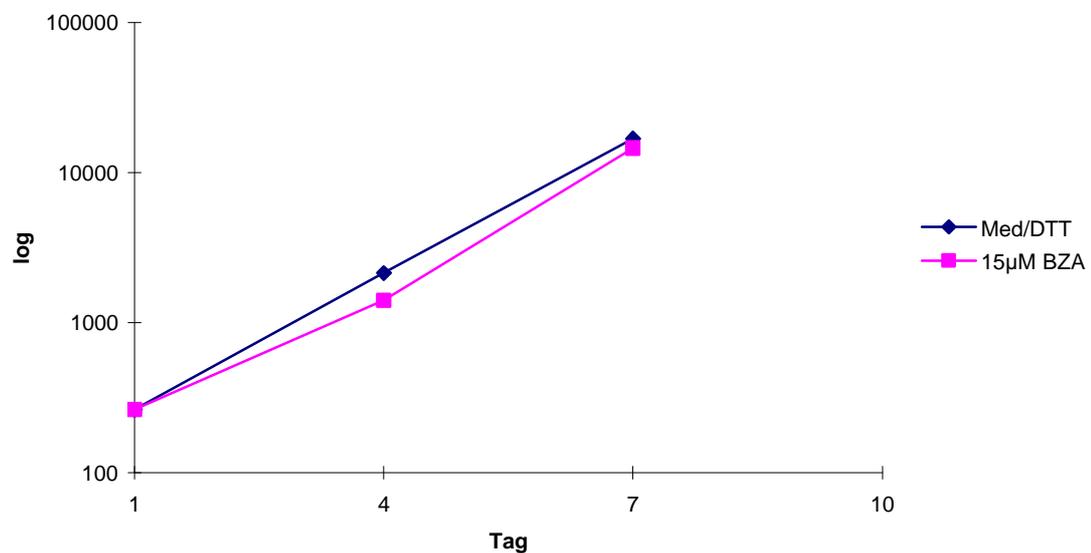


Abbildung 16: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinien EPLC-32M1

An dieser Zelllinie, die keine ras-Mutation hat, zeigt sich ein geringer, aber nicht relevanter Unterschied im Wachstumsverhalten mit und ohne Inhibitor.

4.2.4 Wachstumskinetik + / - BZA mit weiteren humanen Bronchialkarzinom-Zelllinien

Anhand der Vergleichszelllinien NCI-H23 (mit *ras*-Mutation) und LCLC-103H (ohne *ras*-Mutation) wurde die Wirksamkeit des verwendeten Farnesyltransferaseinhibitors BZA-5B auf weitere humane Bronchialkarzinomzelllinien untersucht.

Dies geschah ebenfalls unter Einsatz der als wirksam ermittelten Konzentration von 15µM BZA an Tag 1 und 4 nach Aussaat der Zellen und durch Messung der Zellzahlen an Tag 1, 3, 5 und 7.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie NCI-H23:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 µM BZA
1	653,33	653,33
3	976,60	651,00
5	1578,60	1048,00
7	2764,30	1758,30

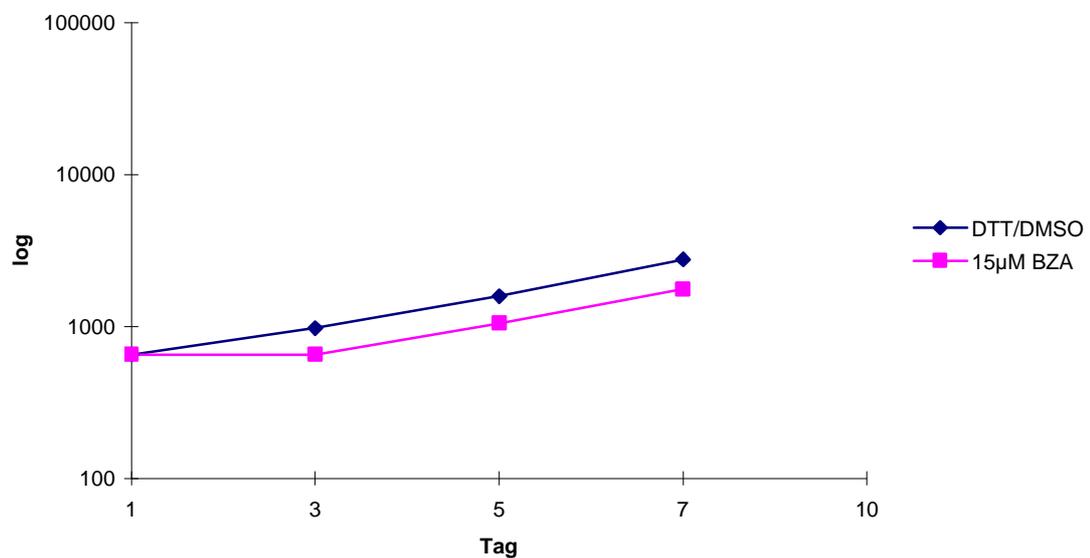


Abbildung 17: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie NCI-H23

Auch hier war zu beobachten, dass die Zellen mit *ras*-Mutation unter Anwesenheit des Inhibitors das Wachstum an Tag 3 oder 4 wieder verstärkt aufnehmen, nachdem es zu

einer vorübergehenden Wachstumsinhibierung gekommen war. Der Rückgang der Gesamtzellzahl unter Inhibitoreinsatz nach sieben Tagen ist dem verminderten Wachstum im Zeitraum Tag 1-3 zuzuschreiben. Im folgenden Zeitraum entspricht das Wachstum unter Inhibitor praktisch dem ohne Inhibitorzugabe.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie LCLC-103H:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 μM BZA
1	533,00	533,00
3	1018,30	1021,60
5	2715,60	2787,00
7	7462,00	6752,00

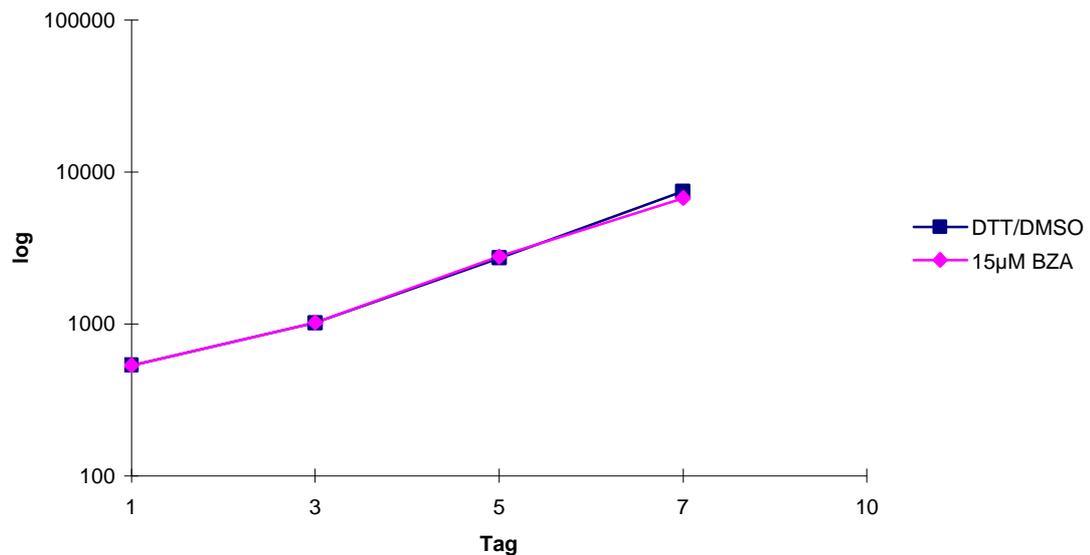


Abbildung 18: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie LCLC-103H

Das Wachstum der Zelllinie ohne *ras*-Mutation wird nicht wesentlich durch den Inhibitor beeinflusst. Dies erhärtet die Behauptung, dass der Inhibitor spezifisch auf Ras abhängige Funktionen wirkt.

4.2.5 Wachstumskinetik mit Mausfibroblasten

Das Wachstumsverhalten der Mausfibroblasten Zelllinien NIH-3T3 ohne *ras*-Mutation im Vergleich zu NIH-3T3 Zellen (mit menschlichem aktivem H-*ras* transformiert), die sich lediglich durch die *ras*-Transformation unterscheiden, sollte untersucht werden.

Diese Linien dienten gleichsam der Kontrolle der Wirksamkeit des Farnesyltransferaseinhibitors.

Die Inhibitorzugabe erfolgte an den Tagen 1 und 4.

Die Messungen an dem Zählgerät wurden an den Tagen 1, 3, 5 und 7 vorgenommen.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie NIH-3T3ras:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 μM BZA
1	482,00	482,00
3	1545,70	628,70
5	3762,20	743,80
7	10213,00	3677,00

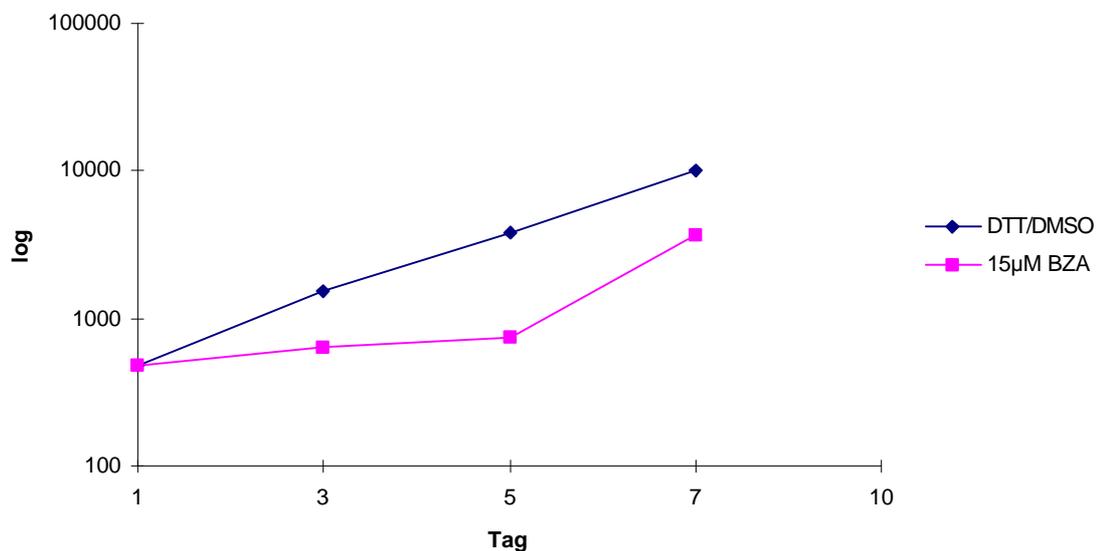


Abbildung 19: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie NIH-3T3ras

Die Inhibitorkonzentration von 15 μM BZA-5B ist nach diesen Zahlen für die Mausfibroblastenzelllinie mit *ras*-Mutation ebenfalls als wirksam anzusehen.

Auch hier nehmen die Zellen das Wachstum trotz nochmaliger Inhibitorzugabe an Tag 4 nach vier Tagen wieder verstärkt auf. Die verminderte Gesamtzellzahl der mit Inhibitor behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen ist auf den vorübergehenden wachstumsinhibierenden Effekt im Zeitraum Tag 1-5 zurückzuführen.

Gemessene Zellzahlen der Zelllinie NIH-3T3:

Tag	Medium + DTT/DMSO	+ 15 μM BZA
1	581,60	581,60
3	1842,50	1844,70
5	2808,20	2816,20
7	7990,20	7912,00

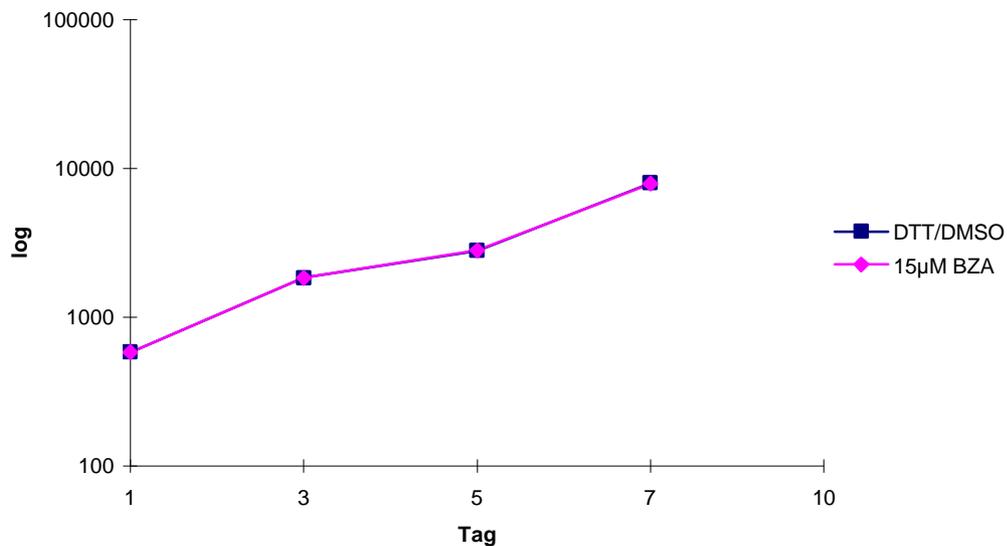


Abbildung 20: Wachstumskinetik anhand gemessener Zellzahlen der Zelllinie NIH-3T3

Die Mausfibroblastenzelllinie ohne *ras*-Mutation bleibt in ihrem Wachstum von dem Inhibitor praktisch unbeeinflusst. Die Konzentration von 15 μM BZA-5B ist auch für die Mausfibroblastenzelllinien außerhalb des toxischen Bereiches.

Anhand dieser Wachstumskinetiken mit Mausfibroblasten, die sich nur durch Vorhandensein oder Abwesenheit der *ras*-Mutation unterscheiden, wird die an humanen Bronchialkarzinomzelllinien erarbeitete Tendenz nochmals bestätigt und die *ras*-spezifische Wirkung nahe gelegt.

4.2.6 Zusammenfassung der Wachstumskinetiken Tag 1-7

	+5 μ M	+10 μ M	+15 μ M	+20 μ M	+25 μ M
LCLC-97TM1	2210%	1445%	1065%	184%	140%
EPLC-32M1	6196%	5799%	5498%	5329%	3645%

4.3 Proliferationstests mit Hilfe von radioaktivem Thymidineinbau

4.3.1 EPLC-32M1 im Vergleich zu LCLC-97TM1

Die Rate des Einbaus von radioaktivem Thymidin in die DNA wurde als Proliferationsstest eingesetzt. Radioaktiv markiertes Thymidin wird den in Proliferation befindlichen Zellen angeboten. Diese bauen es während der Zellteilung in die neu entstehende DNA ein. Gemessen wird die Radioaktivität der gewachsenen Zellen. Es wurde die Einbaurrate der beschriebenen Zelllinie EPLC-32M1 (ohne *ras*-Mutation) gegen die der Zelllinie LCLC-97TM1 (mit *ras*-Mutation) verglichen und als indirekter Messwert für die Proliferationsrate gewertet.

Die Inkubationszeit mit BZA-5B betrug 24 Stunden.

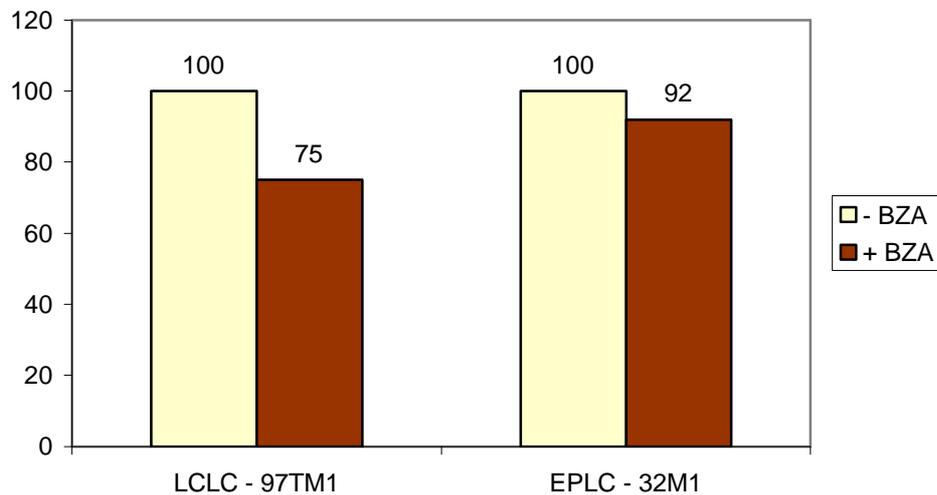


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Proliferationsraten in Prozent zweier humaner Bronchialkarzinomzelllinien unter dem Einfluss von BZA-5B

Der Einbau radioaktiv markierten Thymidins in die DNA während der Zellteilung zweier verschiedener Zelllinien, der Linie LCLC-97TM1 mit *ras*-Mutation gegenüber der Zelllinie EPLC-32M1 ohne *ras*-Mutation, sind als Säulendiagramme dargestellt. Die Messung der Radioaktivität in den Bronchialkarzinom Zelllinien wird als Nachweis der verschiedenen Proliferationsraten verwendet. Sie erfolgt an mit BZA-5B behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Zelllinie mit *ras*-Mutation zeigt reproduzierbar nach Behandlung mit Farnesyltransferaseinhibitor eine geringere Wachstumsquote (durchschnittlich 75%), als die Vergleichs Zelllinie (durchschnittlich 92%).

Es lässt sich eine *ras*-spezifische Proliferationshemmung annehmen, die sich in den Vorversuchen schon gezeigt hat.

4.3.2 LCLC-103H im Vergleich zu NCI-H23

Die Thymidin-Einbauraten der Vergleichszelllinien LCLC-103H (keine *ras*-Mutation vorhanden) und NCI-H23 (*ras*-Mutation vorhanden) wurden anhand des radioaktiven Proliferationstests gegenübergestellt.

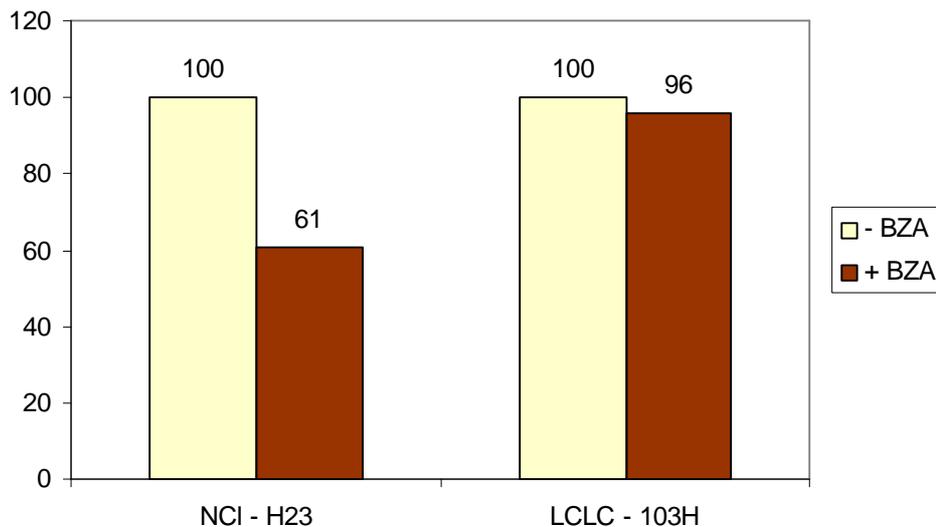


Abbildung 22: Gegenüberstellung der Proliferationsraten weiterer zwei humaner Bronchialkarzinom-Zelllinien unter BZA-5B

Wie im oben dargestellten Versuch sind anhand dieses Säulendiagramms die verschiedenen Proliferationsraten einer Zelllinie mit *ras*-Mutation (NCI-H23) gegenüber einer Linie ohne *ras*-Mutation (LCLC-103H) aufgetragen. Auch wurde die Einbaurate radioaktiven Thymidins bei mit BZA-5B behandelten Zellen mit der von unbehandelten Zellen verglichen.

Die Linie NCI-H23 hat unter Inhibitoreinfluss im Mittel eine Proliferationsrate von 62% aufgewiesen, die Linie LCLC-103H eine mittlere Rate von 96%.

Es lässt sich ebenfalls eine *ras*-spezifische Proliferationshemmung durch den Farnesyltransferaseinhibitor zeigen.

4.4 Semiquantitative RT-PCR, quantitative Auswertung des Expressionsgrades mittels Densitometrie

4.4.1 RT-Polymerase-Kettenreaktion mit Darstellung auf Acryl-Amid-Gelen
Zur näheren Untersuchung der molekularen Vorgänge beim Einsatz des von uns verwendeten Farnesyltransferaseinhibitors BZA-5B wurden mit Hilfe der semiquantitativen reversen Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die Genexpression verschiedener Enzyme untersucht. Die ausgewählten Enzyme sind in Ihrer Expression *ras*-abhängig. Zu erwarten war eine Abnahme der *ras*-abhängigen Genexpression unter Anwesenheit von Farnesyltransferaseinhibitor.

Die auf Acryl-Amid-Gelen getrennten DNA-Fragmente werden aufgrund radioaktiver Markierung nach einer Expositionszeit auf Röntgenfilmen sichtbar und können densitometrisch quantifiziert werden.

Es wurde eine Inhibitionskinetik über 48 Stunden durchgeführt. Wir verglichen die Zelllinien LCLC-97TM1 und EPLC-32M1 miteinander, um Zelllinien mit und ohne *ras*-Mutation zu vergleichen. Die Zellen wurden kultiviert, nach Aussaat blieben alle Kulturen über Nacht in Ruhe, damit sie adhärent wurden.

Am nächsten Tag wurde der Beginn des Versuches mit Stunde null definiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei die Hälfte aller Kulturen mit 15 μ M BZA-5B versetzt wurde, die andere Hälfte nur mit Medium versorgt wurde. Dann wurde die erste Gruppe von Kulturen aufgearbeitet. Nach RNA-Isolierung und c-DNA Synthese wurde die DNA für die späteren PCR-Versuche gefroren aufbewahrt.

Dargestellt sind die Acryl-Amid-Gele der PCR-Versuche der Inhibitionskinetik mit den dazugehörigen Densitometrien.

Von links nach rechts aufgetragen sind nach einem Größenmarker die Banden der Stunde null, Stunde 2, 4, 8, 12, 24 und 48; jeweils mit [+] und ohne [-] Inhibitor. Entsprechend sind die Säulen der Densitometrie aufgetragen.

4.4.1.1 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH)

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase wird durch eine vollständig bekannte DNA Sequenz kodiert (P. Arcari et al. 1984). Die Genexpression wird als unabhängig von der *ras*-Funktion gesehen. Die entsprechenden Oligodesoxynukleotide (Primer) wurden für eine Kontroll-PCR verwendet, um eine gleichmäßige Qualität des Ausgangs c-DNA Materials zu zeigen.

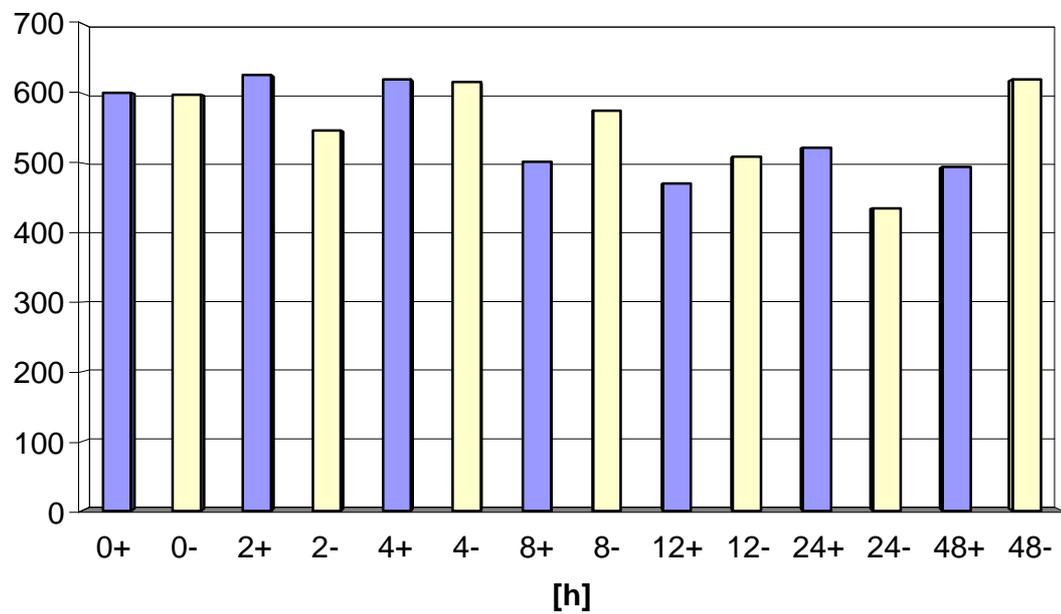
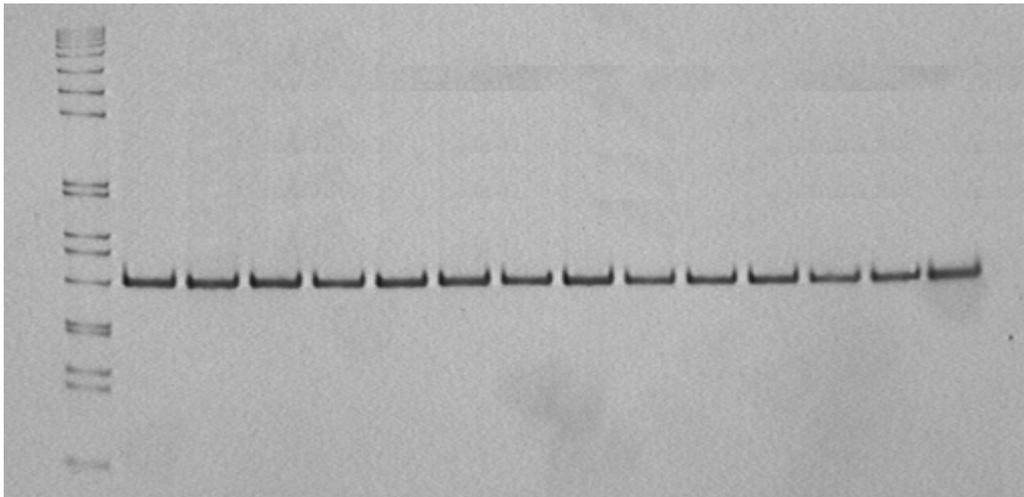


Abbildung 23: Genexpression von GAP-DH unter Einfluss von Farnesyltransferaseinhibitor BZA-5B auf die Zelllinie LCLC-97TM1

Alle Säulenpaare sind vergleichbar hoch. Es sind damit keine Unterschiede in der Expression der GAPDH mit und ohne Inhibitoreinsatz zu verzeichnen.

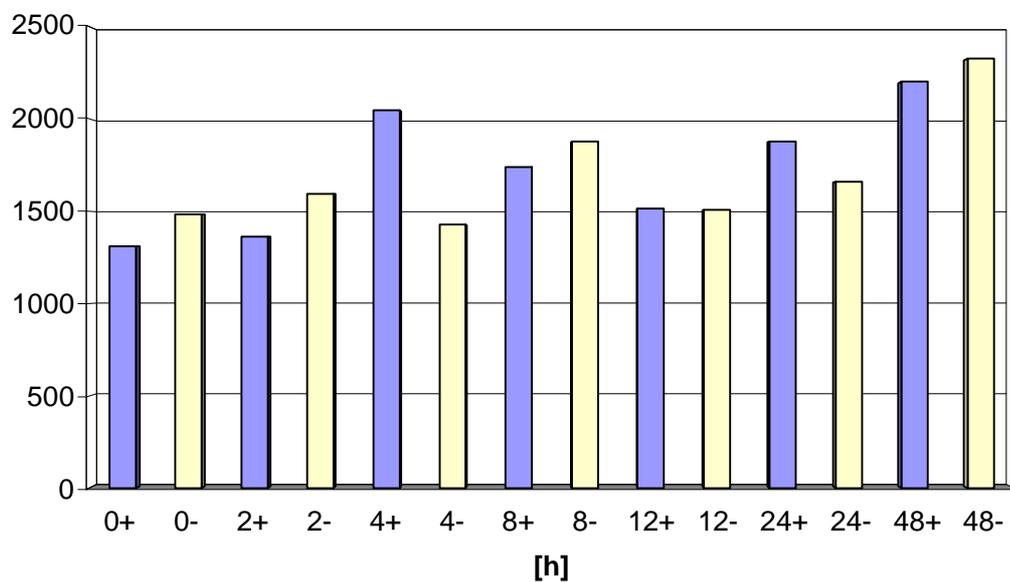
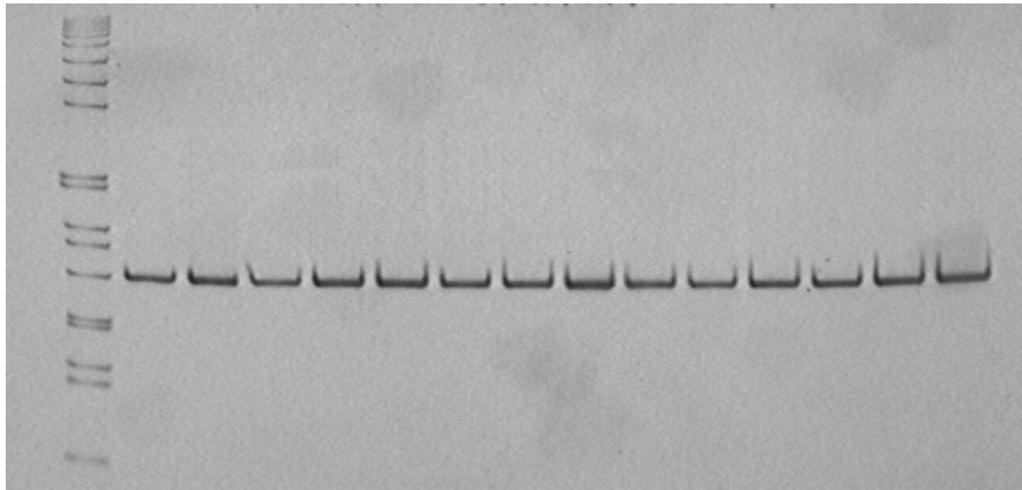


Abbildung 24: Genexpression von GAP-DH unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie EPLC-32M1

Wie im vorherigen Diagramm sind die Säulenpaare vergleichbar hoch. Es zeigt sich kein Einfluss des Inhibitors auf die Expression von GAPDH in der Linie EPLC-32M1. Ein einziger Ausreißer stellt sich bei Stunde 4 dar.

4.4.1.2 Cathepsin L (Cat-L)

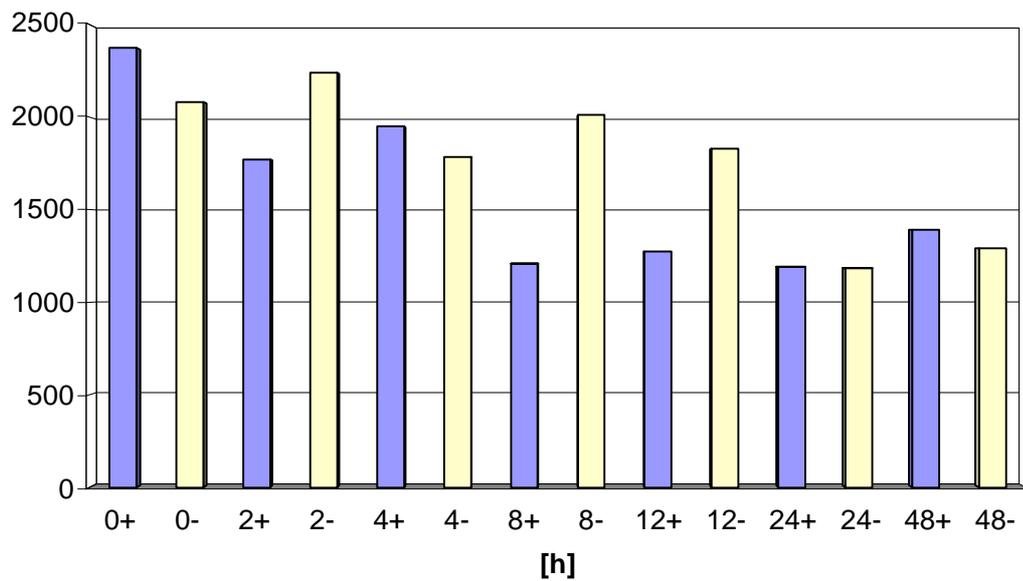
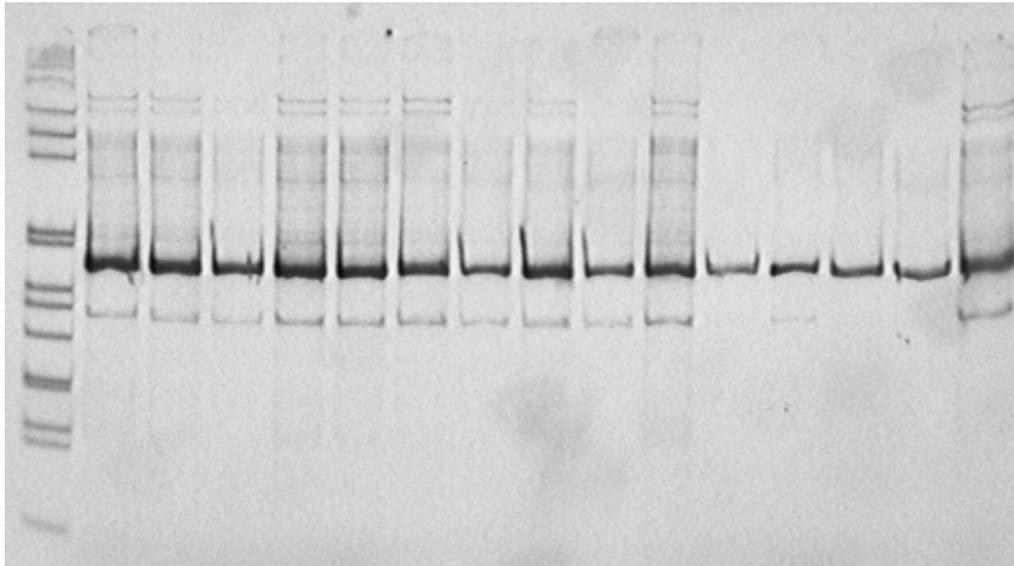


Abbildung 25: Genexpression von Cat-L unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie LCLC-97TM1

Ein Unterschied im Expressionsniveau ist bei den Säulenpaaren der Stunde 8 und Stunde 12 zu verzeichnen. Die Säulenhöhe zeigt die Expression des Cathepsin L an, die unter Inhibitoreinfluss vorübergehend zwischen Stunde 8 und Stunde 12 vermindert ist.

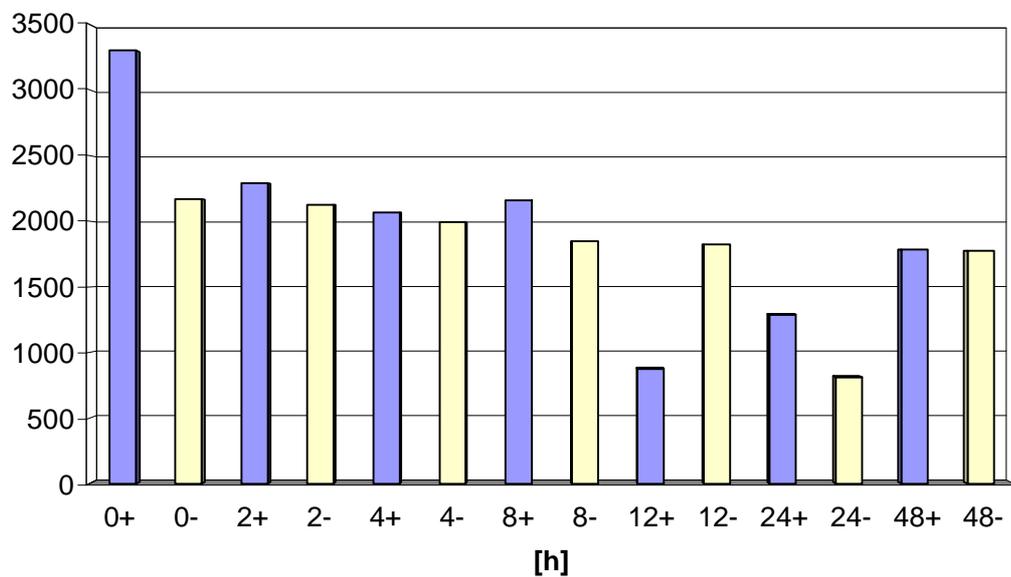
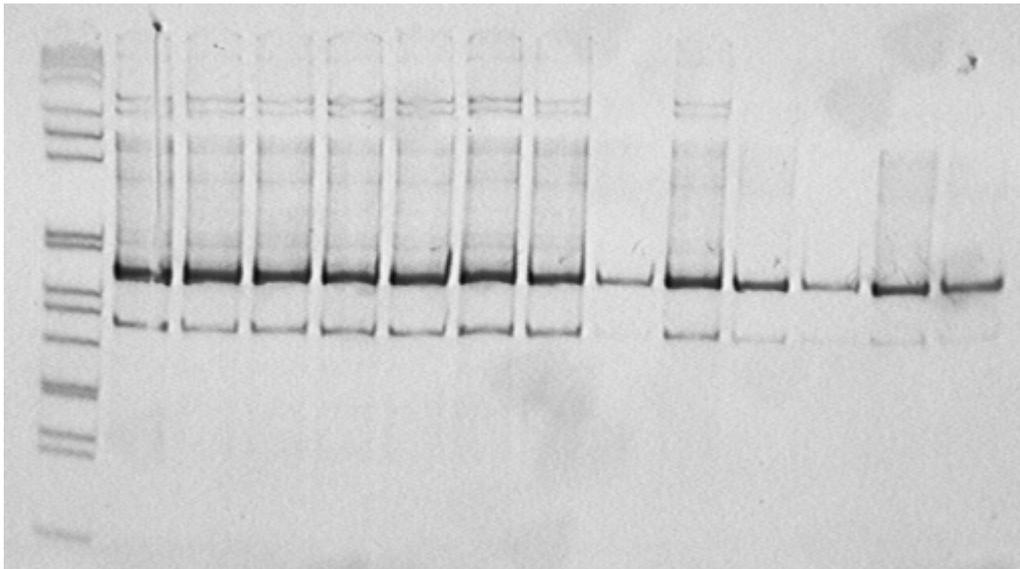


Abbildung 26: Genexpression von Cat-L unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie EPLC-32M1

Das Säulendiagramm gibt keinen verwertbaren Hinweis auf einen Einfluss des BZA-5B auf die Expression von Cat-L in den *ras*-negativen Zellen. Die Höhe der Säule bei Stunde null plus Inhibitor ist eher als Artefakt zu werten. Auch Unterschiede bei Stunde 12 und 24 sind nicht anders einzuordnen.

4.4.1.3 Humane Urokinase (HUK)

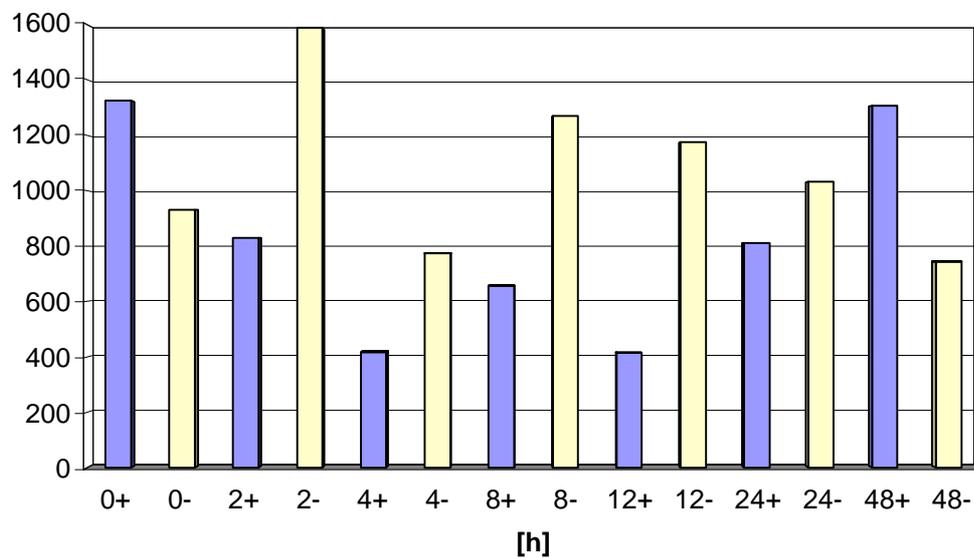
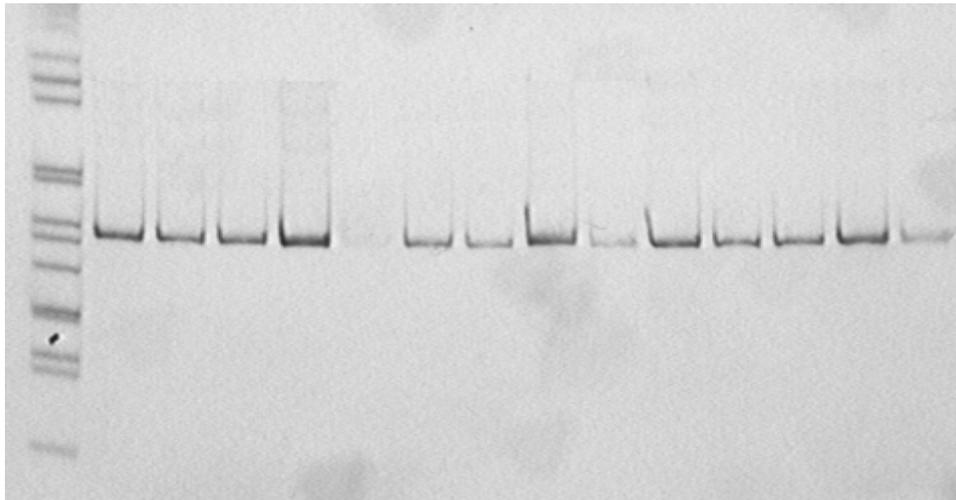


Abbildung 27: Genexpression von HUK unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie LCLC-97TM1

Eine deutlich niedrigere Expression des Gens für Urokinase unter Einfluss des BZA-5B ab Stunde 2 bis Stunde 24, vor allem bei Stunde 4, 8 und 12 zeigen die Säulen dieses Diagramms.

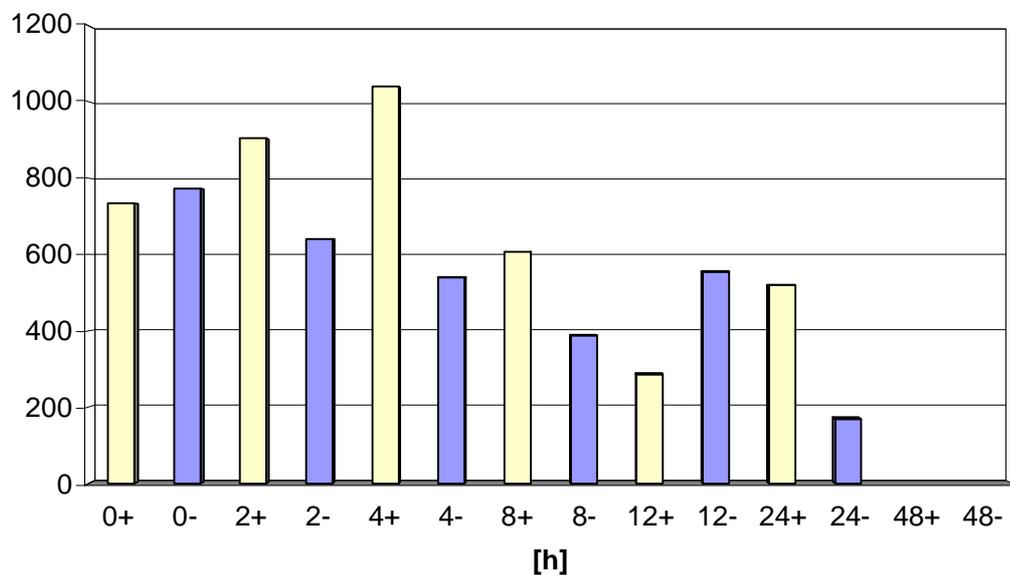
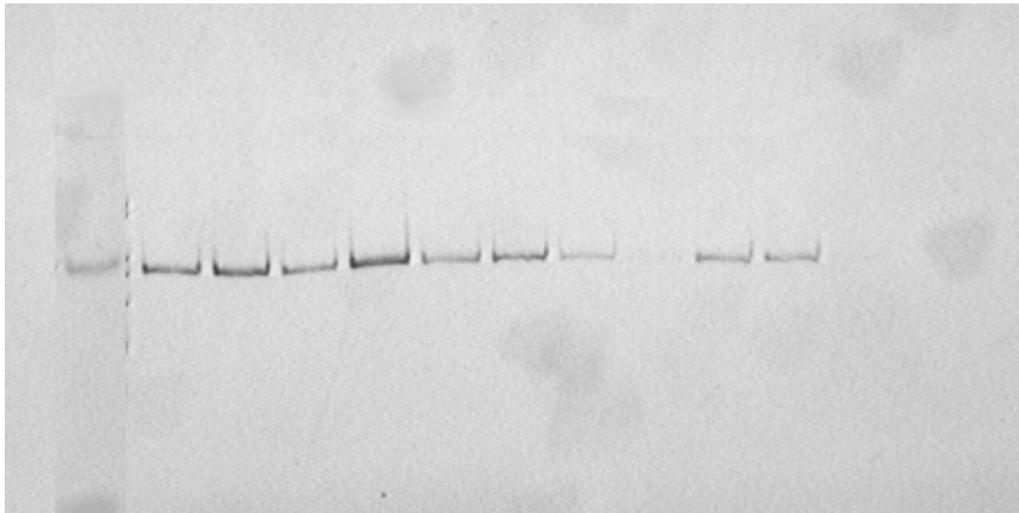


Abbildung 28: Genexpression von HUK unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie EPLC-32M1

Die Stunde 48 war hier nicht verwertbar. Es lässt sich keine eindeutige Aussage über den Einfluss des eingesetzten Inhibitors machen. Tendenziell zeigt sich kein Rückgang der Expression des Gens für HUK.

4.4.1.4 Keratin 8 (K8)

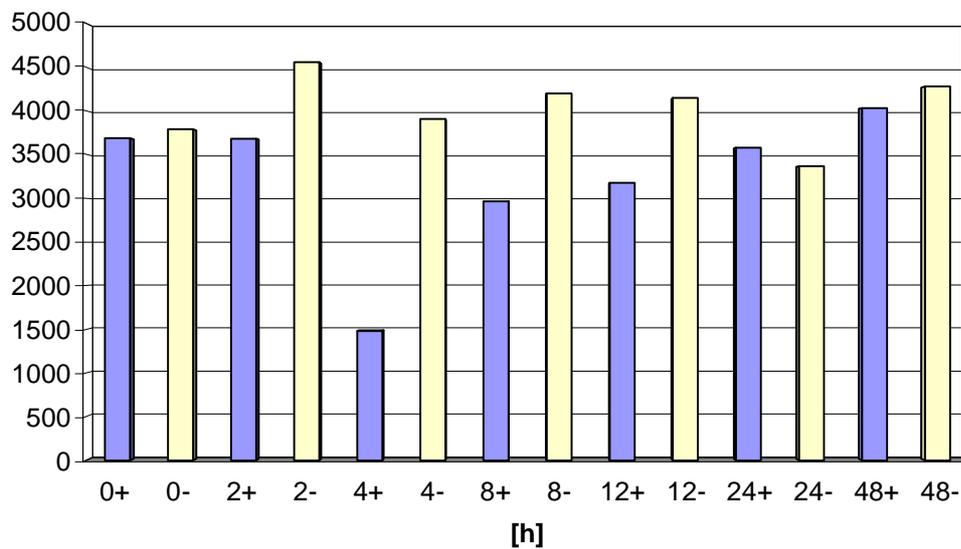
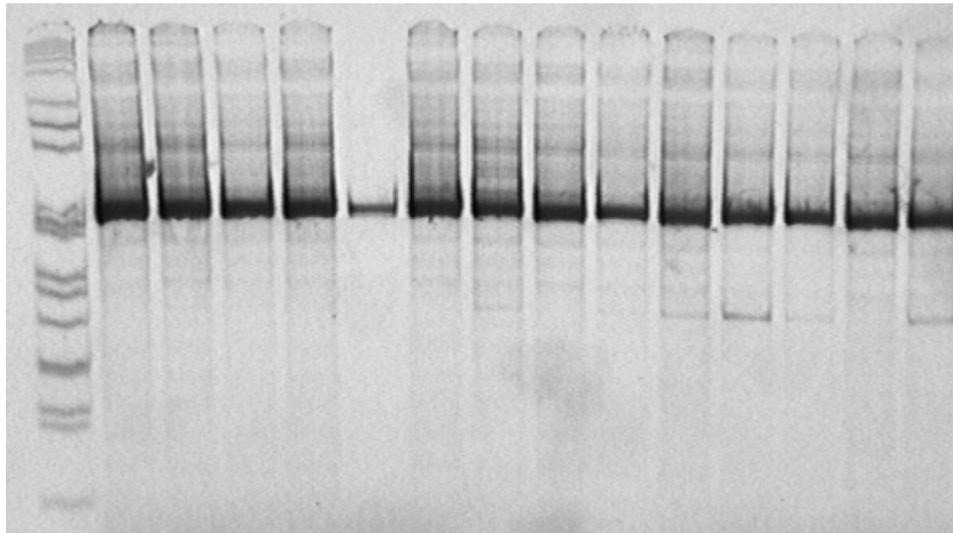


Abbildung 29: Genexpression von Keratin 8 unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie LCLC-97TM1

Deutlich zeigt sich bei Stunde 4 und dann weiter bei Stunde 8 und 12 ein vorübergehend hemmender Einfluss der Substanz BZA-5B auf die Expression des Gens für Zytokeratin 8.

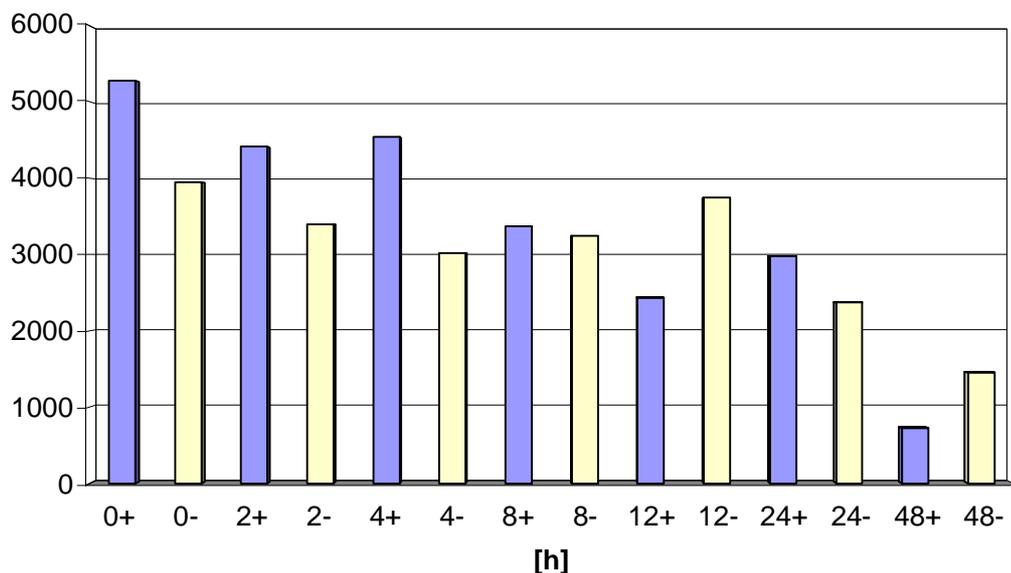
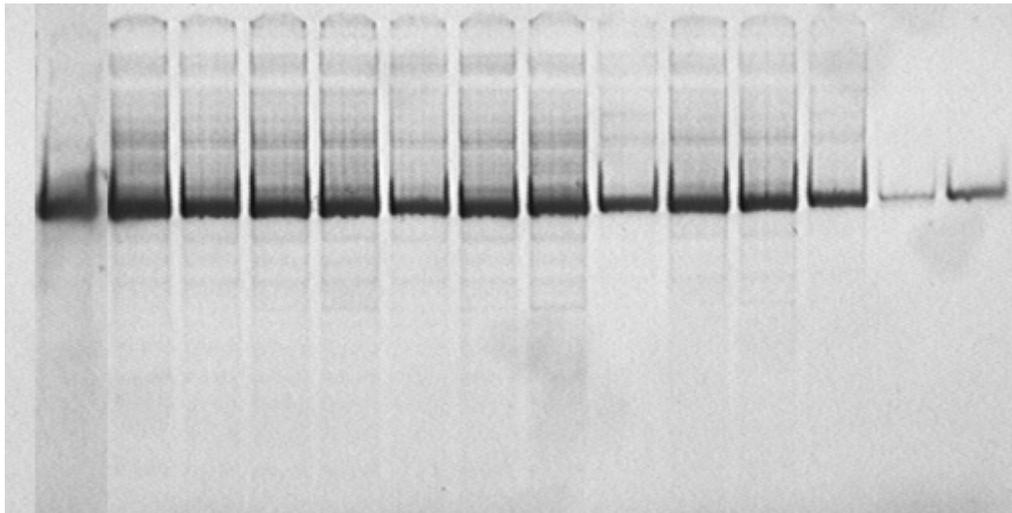


Abbildung 30: Genexpression von Keratin 8 unter Einfluss von BZA-5B auf die Zelllinie EPLC - 32M1

Fraglich zu bewerten sind hier die Säulen der Stunden 12 und 48. Die Tatsache, dass die dazwischenliegende Messung bei Stunde 24 eine entgegengesetzte Tendenz aufweist, zeigt, dass offenbar größere spontane Schwankungen der Expressionshöhe auftreten können.

Zusammenfassend lässt sich ein nur vorübergehender, zeitlich begrenzter Effekt auf Ras-abhängige Genexpressionen zeigen. Insbesondere zeigt sich dieser Effekt ab der Stunde 2 bis zur Stunde 24 nach Zugabe von BZA-5B.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit des Farnesyltransferaseinhibitors (FTI) BZA-5B auf das Wachstum humaner Bronchialkarzinomzellen untersucht. Es handelt sich um einen Benzodiazepinabkömmling, der von der Arbeitsgruppe um James, Goldstein und Brown entwickelt wurde.

Die Firma Genentech Inc. South San Francisco stellte uns den Wirkstoff zur Verfügung. Ergebnisse der oben genannten und anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass Farnesyltransferaseinhibitoren wirksame Agentien bei *ras*-induziertem malignem Wachstum sind (z. B.: G. James *et al.* 1993; N.E. Kohl *et al.* 1993; M.S. Kang *et al.* 1995; E.C. Lerner *et al.* 1995; K. Leftheris *et al.* 1996; Y. Qian *et al.* 1996; C. Hall *et al.* 1996;).

Im Tierversuch zeigte die Arbeitsgruppe um N. E. Kohl Tumorregression unter FTI bei Tumoren mit nachgewiesener *H-ras*-Mutation. Nach Auslassen der Therapie nahm die Tumorgroße wieder zu. Wiederaufnahme der Therapie führte in den meisten Fällen erneut zu Regression der Tumorgroße. Die Therapie mit FTI führte bei den Mäusen in diesem Experiment nicht zu Heilung, sondern zu Tumorverkleinerung in Anwesenheit des Wirkstoffes.

Systemische Nebenwirkungen waren nicht nachweisbar.

J. Sun *et al.* stellten 1995 die Ergebnisse von Versuchen mit einem FTI an Nacktmaus-Xenotransplantaten vor. Es wurden Bronchialkarzinomzelllinien mit und ohne *K-ras*-Mutation gegenübergestellt. Das Wachstum der Tumoren mit *ras*-Mutation *in vivo* war unter FTI Behandlung deutlich langsamer, als bei den nicht behandelten Tumoren der Mäuse. Nebenwirkungen wurden in diesem Experiment ebenfalls nicht beobachtet.

Wir führten unsere Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien von NSCLC und an Mausfibroblasten (NIH-3T3) mit und ohne *ras*-Mutation durch. Die Mausfibroblasten wurden angewendet, da sie sich morphologisch im Falle einer *ras*-Transformation deutlich von der Linie ohne *ras*-Mutation unterscheiden und zudem die oben genannten Farnesyltransferaseinhibitoren an solcherart transformierten Zellen ihre *in vitro* Wirksamkeit unter Beweis gestellt hatten.

So berichten James *et al.* 1993 über die Entwicklung eines Benzodiazepinabkömmlings BZA und seiner verschiedenen Analoga als FTI-Inhibitoren. Speziell BZA-5B beschreiben sie als wirksam an *H-ras*-transformierten Rat1 Fibroblasten. Die Wirkung der Analoga BZA-2A und BZA-2B wurde zunächst anhand der Morphologie nachgewiesen und

dokumentiert (G. L. James, *et al.* 1993). Morphologische Malignitätszeichen sind u.a. Polymorphie der Zellen einer Zelllinie, Verlust der Kontaktinhibierung und mehrschichtiges Wachstum mit Bildung von „Säulen“.

Wir führten aufgrund dieser Vorergebnisse erste Versuche in Zellkultur durch. Unsere Beobachtungen deckten sich mit den aus der Literatur anzunehmenden Erwartungen.

Die NSCLC-Zelllinie EPLC-32M1 ohne *ras*-Mutation blieb nach Inkubation mit BZA-5B im Vergleich zu den unbehandelten Zellen morphologisch unverändert. Gegenübergestellt wurde die NSCLC-Zelllinie LCLC-97TM1 mit nachgewiesener *K-ras*-Mutation. Unter Inkubation mit BZA-5B veränderte sich die Morphologie der transformierten Zellen in Richtung der Morphologie nicht transformierter Zellen im Sinne einer morphologischen Reversion.

Die Wachstumsgeschwindigkeit nahm im Vergleich zu unbehandelten Zellen ab. Die für die Zelllinie LCLC-97TM1 typischen Kolonien waren deutlich kleiner, die Gesamtzellzahl sichtbar geringer.

Zusätzlich dokumentierten wir das Verhalten *ras*-transformierter Mausfibroblasten unter Einsatz von FTI. Auch diese Zellen zeigten in Vergleich zu Kulturen, die in reinem Nährmedium wuchsen ein verändertes Wachstumsverhalten. Nach Einsatz von BZA-5B waren hier ebenfalls morphologische Zeichen der Reversion nachweisbar.

Im Vergleich zu LCLC-97TM1 mit *K-ras*-Mutation zeigen EPLC-32M1 ohne nachweisbare *ras*-Mutation sowohl seitens des Wachstumsverhaltens wie seitens morphologischer Veränderungen kein Ansprechen auf FTI.

Dies deckt sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um G.L. James (G. L. James *et al.* 1993), die Veränderungen in Morphologie und Wachstumsverhalten von *H-ras*-transformierten Rat 1-Fibroblasten unter Einsatz von BZA zeigten. Das Wachstum normaler Zellen blieb unbeeinflusst.

Es stellt sich die Frage, warum nicht transformierte Zellen durch die Inhibierung der Farnesyltransferase unbeeinträchtigt bleiben, trotzdem dieses Enzym neben der posttranslationalen Modifikation des Ras-Proteins noch weitere physiologische Funktionen in der Zelle hat, die ebenfalls gehemmt werden können. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Erstens ist in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration die FT nicht unbedingt vollständig gehemmt (F.L. Zhang *et al.* 1997), so dass von einer Restaktivität ausgegangen werden kann, die für die physiologische Funktion ausreichend ist.

Zweitens kann im Fall der vollständigen Enzyminhibition der FT eine Geranylgeranylierung erfolgen (D.W. Whyte *et al.* 1997). Hierauf wird noch eingegangen.

Um andere Einflüsse, als den der *ras*-Transformation auszuschließen, untersuchten wir neben den Bronchialkarzinomzelllinien auch Mausfibroblasten (NIH-3T3) mit und ohne *ras*-Mutation die sich einzig durch die *ras*-Transformation unterscheiden (Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

Die Hemmung malignen Wachstums, die in Zellkultur beobachtet und fotografiert wurde, wurde in Wachstumskinetiken objektiviert. Wie erwartet konnte eine Inhibierung des Wachstums maligne transformierter NIH-3T3-Fibroblasten und der *ras*-transformierten NSCLC-Zelllinien durch BZA-5B anhand des Rückgangs der Zellzahlen nachgewiesen werden.

Auffällig war, dass bei der Dosierung von 50µM, die uns von Genentec Inc. als wirksame InhibitorKonzentration empfohlen wurde, die Zellen sowohl der *ras*-transformierten, als auch der nicht transformierten Linien abstarben. Aufgrund der oben beschriebenen Vorergebnisse war aber eine Ras-spezifische Wachstumsinhibierung zu erwarten. In der Annahme, es handle sich hier um einen unspezifisch toxischen Effekt, führten wir weitere Wachstumskinetiken mit absteigenden InhibitorKonzentrationen durch.

Bei einer Konzentration von nur 15µM BZA-5B war eine deutliche Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien mit *ras*-Mutation im Vergleich zu den Zelllinien ohne *ras*-Mutation nachweisbar. Die Zellen ohne *ras*-Mutation starben nicht mehr ab.

In dieser deutlich niedrigeren InhibitorKonzentration zeigte sich also ein offensichtlich *ras*-spezifischer Effekt. G.L. James *et al.* beschrieben 1993 die Hemmung von Protein-Farnesylierung mit 10µM und fast vollständige Hemmung der Farnesylierung mit 25µM BZA-5B.

Es fiel weiter auf, dass die transformierten Zellen, die zunächst inhibiert werden konnten, nach vier Tagen trotz erneuter Inhibitorzugabe das maligne Wachstum wieder verstärkt aufnahmen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Art „Resistenzentwicklung“ der Zellen gegen BZA sein. Eine solche beschreiben auch G.L. James *et al.* 1996.

Die Farnesyltransferase (FT) und die Geranylgeranyltransferase (GGT) sind heterodimere Enzyme. Sie weisen eine gemeinsame, wahrscheinlich sogar identische α -

Untereinheit auf und unterscheiden sich durch die β -Untereinheit (Seabra M.C. *et al.* 1991). Aktiv ist die FT nur, wenn beide Untereinheiten vorhanden sind (Y. Reiss *et al.* 1991; M.C. Seabra *et al.* 1991). FT bindet bevorzugt Methionin oder Serin am COOH-Ende, die GGT bindet bevorzugt das Leuzin.

Zwar sind die beiden Enzyme für unterschiedliche Substrate spezifisch, doch bestehen Hinweise dafür, dass es hier auch Ausnahmen gibt. D. B. Whyte *et al.* zeigten 1997, dass Zellen, die mit FTI behandelt wurden, ungehindert proliferieren konnten. Als Grund dafür nahmen sie an, dass in Anwesenheit eines FTIs das K-Ras4B Protein (nicht aber das H-Ras Protein) als Substrat für die Geranylgeranyl-Transferase-1 fungieren kann.

Somit wird von den Zellen also eine Art „Umweg“ eingeschlagen, wenn der bevorzugte Weg der Farnesylierung inhibiert ist.

Wie Reiss, Y. *et al.* 1990 beschrieben haben, ist die Prozessierung des K-Ras schwieriger zu inhibieren, als es bei dem weniger häufigen H-Ras der Fall ist. Ein Grund hierfür kann im oben beschriebenen liegen.

James *et al.* zeigten 1996, dass sowohl Benzodiazepin- als auch Nicht-Benzodiazepin-Inhibitoren ihre Wirkung an Proteinen, die dem endogenen K-Ras als entsprechend postuliert wurden (H/K-RasB^{V12} und K-RasB^{V12}), verfehlten. Hingegen war die vorbeschriebene Wirksamkeit am H-Ras weiterhin nachweisbar. In der gleichen Arbeit bestätigten sich Hinweise, dass nicht transformierte Zellen durch den wachstumsinhibierenden Effekt des BZA-5B unbeeinträchtigt bleiben, weil sie einen alternativen Weg der Prenylierung des K-RasB einschlagen.

1997 publizierten F.L. Zhang *et al.*, dass sie für die vier Ras-Isoforme verschiedene Affinitäten zu der Farnesyltransferase und zu der Geranylgeranyltransferase-1 nachweisen konnten. Sie beschreiben eine 10- bis 20-fach stärkere Affinität der Farnesyltransferase zu dem K-Ras4B, als zu den anderen Ras-Formen. Dementsprechend benötigten sie auch die 10- bis 20-fache Menge Inhibitor, um die Farnesylierung zu hemmen.

Nachdem 1995 von James, Goldstein und Brown das K-Ras4B als *in vitro*-Substrat für die GGT-1 identifiziert worden war, zeigte die Arbeitsgruppe um F.L. Zhang dies auch für K-Ras4A und N-Ras. Letzteres hat die höchste Affinität zu der GGT-1, nämlich annähernd so hoch, wie ein übliches GGT-Substrat. Dennoch ist die Affinität zu der FT - der primäre Weg der Prenylierung des Ras-Proteins - um ein vielfaches höher.

Das H-Ras ist dagegen kein Substrat für die GGT-1.

E.C. Lerner, Y. Qian, *et al.* verglichen 1995 die Wirkung von einem GGT-Inhibitor und einem FTI. Der GGT-Inhibitor zeigte sich selektiv für die Geranylgeranylierung, in hoher Dosierung hemmte er auch die Farnesylierung des H-Ras. Während H-Ras durch den FTI deutlich gehemmt wurde, erwies sich das K-Ras4B als vergleichsweise resistent. Die Prozessierung des K-Ras4B wiederum wurde selektiv durch den GGT-Inhibitor beeinträchtigt.

Auch das ist ein Hinweis dafür, dass die FTI das H-Ras, weniger aber das häufigere K-Ras inhibieren.

Die Affinität der Farnesyltransferase zu K-Ras4B ist etwa 20 mal so hoch, wie zu den anderen drei Ras-Proteinen. K-Ras4B kann aber wegen der ebenfalls hohen Affinität zu der GGT den Umweg der Geranylgeranylierung gehen, wenn die Farnesylierung gehemmt ist und somit eine Art Resistenz gegen FTI-Inhibitoren entwickeln. Dies ist dem H-Ras aufgrund mangelnder Affinität zu der GGT nicht möglich (F.L. Zhang *et al.* 1997).

Die von uns verwendeten NSCLC-Zelllinien sowie die *ras*-transformierten Mausfibroblasten weisen eine *K-ras*-Mutation auf (Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Dies erklärt die vorübergehende Hemmung und Wiederaufnahme des malignen Wachstums nach etwa vier Tagen unter Anwesenheit des Farnesyltransferaseinhibitors.

Um einen genaueren Nachweis zu erhalten, dass die von uns kultivierten *ras*-transformierten Zellen unter BZA Einfluss langsamer proliferieren, als ohne BZA, führten wir Thymidin-Proliferationstests durch. Nachgewiesen wird so die Einbaurate radioaktiv markierten Thymidins in die DNA der in Proliferation befindlichen Zellen, also indirekt die Proliferationsrate. Auch hier konnten wir zeigen, dass BZA-5B die Proliferationsrate der Zelllinien mit *ras*-Mutation deutlich herabsetzte. Die Proliferationsrate der Zellen ohne *ras*-Mutation war auch in dieser Versuchsreihe nicht bedeutsam verlangsamt.

Der nächste Schritt unserer Versuchsreihe behandelte die Frage, wie Substrate, die von der *ras*-Aktivierung abhängig sind, durch FTI beeinflusst werden. Stromabwärts des $p21^{ras}$ werden zahlreiche Gene in Abhängigkeit der Aktivität des *ras*-Gens aktiviert. Die als Folge im Zellkern veranlasste Aktivierung bestimmter Zielgene, nachgewiesen mit der semiquantitativen RT-PCR-Methode, lässt Rückschlüsse auf die *ras*-Aktivität zu. Vier solcher unter *ras*-Einfluss stehender Zielgene namentlich Cathepsin L (Cat-L), humane Urokinase (HUK) und Zytokeratin 8 und 18 (K8, K18) wurden gewählt.

So ist eine signifikant erhöhte Cat-L-Aktivität auf mRNA-Ebene in Malignomen einschließlich Lungentumoren nachgewiesen (P. Ledakis *et al.*, 1196).

Auch die Urokinase-Promotor-Aktivität ist als abhängig von der ras-Aktivität erwiesen (E. Lengyel *et al.*, 1995), wie auch die Transkription von Keratin 8 und 18 über ras-abhängige Signaltransduktion aktiviert wird (R. Pankov *et al.*, 1994).

Die Hemmung der transformierenden ras-Aktivität sollte über Messung des negativen Einflusses auf nachgeschaltete Genexpressionen nachgewiesen werden. Zur Anwendung kam die semiquantitative RT-PCR-Methode unter Anwendung jeweils genspezifischer Primer.

Um eine größtmögliche Objektivierung zu erreichen wurde eine Densitometrie der erhaltenen Banden angeschlossen.

Bei zwei von drei untersuchten ras-abhängigen Enzymen (Cat-L und HUK) zeigte sich ein vorübergehender negativer Effekt in Bezug auf die Rate der Transkription.

Bei Keratin 8 konnte keine deutliche Inhibierung im Beobachtungszeitraum gezeigt werden.

Weitere in der Densitometrie sichtbare Schwankungen sind auf technische Ungenauigkeiten und eventuelle Verunreinigungen zurückzuführen.

Die Beobachtung, dass der Farnesyltransferaseinhibitor einen eindeutigen, aber vorübergehenden Einfluss auf ras-abhängige Zellfunktionen auf der Ebene der Genexpression hat, bestätigt die Erkenntnisse, die sich aus den vorausgegangenen Versuchen ergeben haben. Die Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit zeigte sich bei der Zellzählung in den ersten Tagen, nach vier Tagen nahmen auch die mit FTI inkubierten ras-transformierten Zellen das maligne Wachstumsverhalten wieder auf.

In unserem Experiment ist die Wirkung des eingesetzten Farnesyltransferaseinhibitors nach maximal 24 Stunden weitgehend aufgehoben. Die Inhibierung der Farnesyltransferase bedingt eine vorübergehende Hemmung ras-abhängiger Zellfunktionen. Auf der Ebene der Genexpression konnten wir dies für maximal 24 Stunden nach Ersteintritt des BZA-5B nachweisen. Das maligne Zellwachstum war als Folge dieser Vorgänge für vier Tage inhibiert. Das Wiederauftreten maligner Eigenschaften nach vier Tagen trotz unverändertem Einsatz des Farnesyltransferaseinhibitors legt nahe, dass es nach einer Zeitspanne von 24 Stunden zu einer Resistenzentwicklung kommt. Wie oben beschrieben könnte es sich bei diesem Umweg in der posttranslationalen Modifikation des Ras-

Proteins um eine Geranylgeranylierung bei ausreichend starker Hemmung der Farnesylierung handeln.

Vor diesem Hintergrund liegt es nahe Substanzen zu entwickeln, die sowohl die Farnesyltransferase als auch die Geranylgeranyltransferase hemmen, wie die Arbeitsgruppe um S.J. deSolms *et al.* 2003 veröffentlichte.

Diskussionswürdig ist in diesem Zusammenhang auch die Möglichkeit eines intermittierenden Einsatzes des Wirkstoffes.

Im Tierversuch zeigte die Arbeitsgruppe um N.E. Kohl eine Tumorregression von Tumoren mit H-*ras*-Mutation unter FTI. Nach Auslassen der Therapie nahm die Tumorgroße wieder zu. Eine Wiederaufnahme der Therapie führte in den meisten Fällen erneut zu Regression der Tumorgroße. Der Einsatz von FTI führte bei den Mäusen nicht zu Heilung, sondern zu Tumorverkleinerung in Anwesenheit der Substanz. Systemische Nebenwirkungen blieben aus.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Farnesyltransferaseinhibitor BZA-5B zu einer vorübergehenden aber konzentrationsabhängigen Hemmung malignen Wachstums in Zelllinien humaner nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome mit *ras*-Mutation führt.

1995 wurden die Ergebnisse von Versuchen mit einem FTI an Nacktmaus-Xenotransplantaten vorgestellt (J. Sun *et al.*, 1995).

Es wurden Bronchialkarzinomzelllinien mit und ohne K-*ras*-Mutation gegenübergestellt. Das Wachstum der Tumore mit *ras*-Mutation *in vivo* war unter FTI deutlich langsamer als bei den unbehandelten Mäusen. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Die Autoren folgerten, dass Farnesyltransferaseinhibitoren für Tumore, die eine *ras*-Transformation aufweisen, einen Behandlungsansatz darstellen können.

Klinische Studien bestätigen diese Annahme (F. Caponigro *et al.* 2003; A.A. Adjei 2003). Es ist aber auch klar geworden, dass die Wirkung der FTI nicht allein auf die Hemmung der *ras*-abhängigen Zellfunktionen zurückzuführen ist, wie lange angenommen. Offensichtlich spielt auch die Hemmung der Farnesylierung anderer Proteine eine entscheidende Rolle.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass aufgrund einer Resistenzentwicklung der Zellen eine vorübergehende, aber keine langfristige Hemmung des Zellwachstums erreicht werden kann.

Ein Einsatz von BZA-5B bei Bronchialkarzinomen mit nachgewiesener *ras*-Mutation scheint viel versprechend. Aufgrund der Tatsache, dass die Tumorentstehung ein multifaktorielles Geschehen darstellt, das mehrere genetische Alterationen in einem Tumor bedingt, wird auch die Hemmung mehrerer Aberrationen notwendig sein, um das maligne Wachstum einzudämmen.

Der Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren in Kombination mit konventionellen Zytostatika stellt die Basis neuer Chemotherapie Konzepte dar. Erste Studien zeigen, dass solche Kombinationen zum Teil einen synergistischen Effekt in der Tumorbehandlung aufweisen (M. Loprevite *et al.* 2004).

Ein weiterer Behandlungsansatz ergibt sich aus der Tatsache, dass Ras Aktivierung in Tumoren mit Strahlenresistenz einhergeht. Die Hemmung der Ras Funktion führt umgekehrt zu Strahlensensibilisierung, was bereits in klinischen Studien bestätigt werden konnte (W.G. McKenna *et al.* 2002; T.B. Brunner *et al.* 2003).

Die Behandlung von Patienten mit NSCLC mit einer Kombination aus FTI zur Strahlensensibilisierung und folgender Strahlentherapie führte zu einem guten Therapieerfolg. Die Nebenwirkungen waren gering und eine Zunahme der Strahlentoxizität wurde nicht beobachtet (M.S. Hahn *et al.* 2002).

Verschiedene neue Therapiekonzepte zur Behandlung nicht kleinzelliger Bronchialkarzinome in fortgeschrittenem Stadium befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Testung (R.S. Herbst, 2002). Hierzu gehören auch Farnesyltransferaseinhibitoren.

6 Zusammenfassung

Ras-Mutationen werden in zirka 30% aller malignen Tumoren nachgewiesen. Es sind drei verschiedene *ras*-Gene bekannt, nämlich H-, K- und N-*ras*. Am häufigsten wird eine Mutation des K-*ras*-Gens nachgewiesen, dieses macht beim Bronchialkarzinom mehr als 95% aller bekannten *ras*-Mutationen aus.

Für die Funktion sowohl des onkogenen, als auch des normalen Ras-Proteins muss es nach mehreren Schritten posttranslationaler Modifikation zu einer Membranverankerung auf der Innenseite der Plasmamembran kommen. Einen zentralen Schritt hierzu stellt die Farnesylierung des Proteins durch das Enzym Farnesyltransferase dar. Farnesyltransferaseinhibitoren wie der Benzodiazepinabkömmling BZA-5B können diese Reaktion verhindern und somit die Membranverankerung unterbinden.

Ras-Proteine sind an der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern beteiligt, sie übermitteln in aktivem Zustand ein mitogenes Signal in das Zellinnere und werden dann wieder inaktiviert. Onkogen transformierte Ras-Proteine können nicht mehr inaktiviert werden, sie bleiben ständig in der aktiven Form und vermitteln ungebremstes malignes Wachstum. Verhindert man die Membranverankerung, kann es nicht zu einem Ras vermittelten, mitogenen Signal kommen.

Wir untersuchten die Wirksamkeit des Farnesyltransferaseinhibitors BZA-5B auf die Unterbindung onkogener Ras-Wirkung in Mausfibroblasten und Zelllinien nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome.

Bei den Zelllinien mit nachgewiesener *ras*-Mutation zeigte sich in der Zellkultur ein Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit und eine Veränderung der Morphologie in Richtung nicht transformierter Zellen. Die Effekte waren nach vier Tagen trotz weiterer Anwesenheit des Inhibitors jedoch nicht mehr deutlich nachweisbar.

Mit Hilfe des Einbaus radioaktiven Thymidins in die DNA (MTT-Test) konnte der inhibitorische Einfluss auf die Zellteilungsrate in *ras*-transformierten Zellen unter Einsatz von BZA-5B bestätigt werden, der jedoch ebenfalls nur 48 Stunden anhielt.

Um den Zeitraum des Effektes des eingesetzten BZA-5B genauer einzugrenzen wurde die Inhibition *ras*-abhängiger Transkription über semiquantitative RT-PCR der Zielgene Cathepsin L, HUK und Keratin 8, 18 zu den Zeitpunkten Stunde null, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 untersucht. Hier war nur ein zeitlich begrenzter Einfluss der eingesetzten Substanz von höchstens 24 Stunden nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte insgesamt die *ras*-spezifische, aber lediglich vorübergehend inhibierende Wirkung des Farnesyltransferaseinhibitors BZA-5B auf das maligne Wachstum nicht kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden.

Die mit der Substanz BZA-5B erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise rasch einsetzende Resistenzmechanismen, etwa durch Aktivierung paralleler Signaltransduktionswege die *ras*-spezifische Wirkung einschränken.

Aktuelle klinische Studien mit Farnesyltransferaseinhibitoren untersuchen deshalb die Wirkung von Kombinationstherapien mit konventionellen Zytostatika und mit Strahlentherapie.

Die Therapie des fortgeschrittenen nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms durch neue Behandlungskonzepte zu verbessern ist Ziel verschiedener klinischer Studien. Der Einsatz von Farnesyltransferaseinhibitoren kann sicherlich in Zukunft zu einem derartigen Konzept gehören.

7 LITERATURVERZEICHNIS

A.A. Adjei; An overview of farnesyltransferase inhibitors and their role in lung cancer therapy;

Lung Cancer Vol. 41(1); 55-62; August 2003;

P. Arcari, R. Martinelli, F. Salvatore; The complete Sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species;

Nucleic Acids Res. 12(23):9179-89; 1984 Dec 11;

M. Barbacid; ras Genes;

Ann. Rev. Biochem. 56; 779-827; 1987;

G. Bepler, A. Köhler, P. Kiefer, K. Havemann, K. Beisenherz, G. Jaques, C. Gropp, M. Haeder; Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines;

Differentiation 37; 158-171; 1988;

J.L. Bos; ras Oncogenes in Human Cancer: A Review;

Cancer Research 49; 4682-4689; September 1, 1989;

T.B. Brunner, A.K. Gupta, Y. Shi, S.M. Hahn, R.J. Muschel; W.G. McKenna, E.J. Bernhard; Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers;

Int J Radiat Biol 79 (7); 569-576; Jul 2003;

F. Caponigro, M. Casale, J. Bryce; Farnesyl transferase inhibitors in clinical development;

Expert Opin Investig Drugs 12 (6); 943-954; Jun 2003;

D.N. Carney, A. Gazdar, G. Bepler, J. Guccion, P. Marangos, T. Moody, M. Zweig, J. Minna; Establishment and Identification of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Having Classic and Variant Features;

Cancer Research Vol 45; June 1985;

Wen-Ji Chen, D.A. Andres, J.L. Goldstein, D.W. Russell, M.S. Brown; cDNA Cloning and Expression of the Peptide-Binding β Subunit of Rat p21^{ras} Farnesyltransferase, the Counterpart of Yeast DPR1 / RAM1;

Cell Vol 66; 327-334; July 26, 1991;

A. F. Chambers, R. Colella, D.T. Denhardt, S.M. Wilson; Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells;

Mol-Carcinog. 5(3); 238-45; 1992;

A. Chien et al.; Desoxyribonucleic Acid Polymerase From Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*;

J. Bacteriol. 127; 1550-57; 1976

M.B. Dalton, K.S. Fantle, H.A. Bechtold, L. DeMaio, R.E. Evans, A. Krstosek, M. Sinensky; The Farnesyl Protein Transferase Inhibitor BZA-5B Blocks Farnesylation of Nuclear Lamins and p21^{ras} but Does Not Affect Their Function or Localisation;

Cancer Research 55; 3295-3304; August 1, 1995;

A.M. Garcia, Ch. Rowell, K. Ackermann, J. Kowalczyk, M. Lewis; Peptidomimetic Inhibitors of Ras Farnesylation and Function in Whole Cells;

The Journal Of Biological Chemistry Vol. 268; No. 25; 18415-18; September 5, 1993;

J.B. Gibbs; Ras C-Terminal Processing Enzymes - New Drug Targets?

Cell Vol 65; 1-4; April 5, 1991;

J.B. Gibbs, D. Pompliano, S. Mosser, E. Rands, R. Lingham, S.B. Singh, E. Scolnick, N. Kohl, A. Oliff; Selective Inhibition of Farnesyl-Protein Transferase Blocks Ras Processing in vivo;

The Journal of Biological Chemistry Vol. 268; No. 11; 7617-20; April 15, 1993;

J.B. Gibbs, A. Oliff, N.E. Kohl; Farnesyltransferase Inhibitors: Ras Research Yields a Potential Cancer Therapeutic;

Cell Vol 77; 175-178; April 22, 1994;

J.B. Gibbs, A. Oliff; Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in *ras* transgenic mice;
Nature Medicine Vol.1; No. 8; August 1995;

J.L. Goldstein, M.S. Brown; Regulation of the mevalonate pathway;
Nature Vol 343; 1 February, 1990;

B. Gulbis, P. Galand; Relative Steady-State Expression of the Different Posttranslational Products of p21-H-ras from Normal Rat Tissues. A 2D-Western Immunoblot Study;
Life Science Vol 54, No 23; 1747-1756; 1994;

S.M. Hahn, E.J. Bernhard, W. Regine, M. Mohiuddin, D.G. Haller, J.P. Stevenson, D. Smith, B. Pramanik, J. Tepper, T.F. DeLaney, K.D. Kiel, B. Morrison, P. Deutsch, R.J. Muschel, W.G. McKenna; A phase I trial of farnesyltransferase inhibitor L-788,123 and radiotherapy for locally advanced lung and head and neck cancer;
Clin Cancer Res 8(5); 1065-1072; May 2002;

C.C. Hall, J.D. Watkins, S.B. Ferguson, L.H. Foley, N.H. Georgopapadakou; Inhibitors of Farnesyltransferase and Ras Processing Peptidase;
Biochem-Biophys-Res-Commun.; 217 (3); 728-32; December 26, 1996

J.F. Hancock, A. Magee, J. Childs, Ch. Marshall; All ras Proteins are Polyisoprenylated but Only Some Are Palmitoylated;
Cell Vol 57; 1167-1177; June 30, 1989;

K.C. Hart, D.J. Donoghue; Derivates of activated H-*ras* lacking C-terminal lipid modifications retain transforming ability if targeted to the correct subcellular location;
Oncogene 14; 945-953; 1997;

R.S. Herbst; Targeted therapy using novel agents in the treatment of non-small-cell lung cancer;
Clin Lung Cancer 3(1); 30-38; Mar 2002;

H. Hoffmann, H. Bülzebruck, H. Dienemann; Chirurgische Therapie des nichtkleinzeligen Bronchialkarzinoms (NSCLC);

Onkologe 8; 425-433; 2002;

J. T. Hunt, V.G. Lee, K. Leftheris, B. Seizinger, J. Carboni, J. Mabus, C. Ricca, N. Yan, V. Manne; Potent, Cell Active Non-Thiol Tetrapeptide Inhibitors of Farnesyltransferase; J-Med-Chem 39 (2); 353-8; January 19, 1996;

J. Inglese, W.J. Koch, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz; Isoprenylation in regulation of signal transduktion by G-protein-coupled receptor kinase;

Nature Vol. 359; 10 September 1992;

P. Jacobs, A. Cravador, R. Loriau, F. Brockley, B. Colau, P. Chuchana, A. van Elsen, A. Herzog, A. Bollen; Molecular Cloning, Sequencing, and Expression in Escherichia coli of human Preprourokinase cDNA;

DNA 4, 139-146 (1985);

G.L. James, J.L. Goldstein, M.S. Brown, T.E. Rawson, T.C. Somers, R.S. McDowell, C.W. Crowley, B.K. Lucas, A.D. Levinson, J.C. Masters jr.; Benzodiazepine Peptidomimetics: Potent Inhibitors of ras farnesylation in Animal cells;

Science Vol. 260; 1937-1941; 25 June 1993;

G.L. James, M. Brown, M. Cobb, J. Goldstein; Benzodiazepine Peptidomimetic BZA-5B Interrupts the MAP Kinase Activation Pathway in H-Ras-transformed Rat-1 Cells, but Not in Untransformed Cells;

The Journal Of Biological Chemistry Vol. 269, No. 44; 27705-14; November 4, 1994;

G.L. James, J.L. Goldstein, M. Brown; Resistance of K-Ras^{B^{V12}} proteins to farnesyltransferase inhibitors in Rat1 cells;

Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, 4454-4458, April 1996;

G.P. Kalemkerian; Biology of lung cancer;

Curr Op Oncol 6;147-155, 1994;

M.S. Kang, D.M. Stemerick, J.H. Zwolshen, B.S. Harry, P.S. Sunkara, B.L. Harrison; Farnesyl-Derived Inhibitors of Ras Farnesyltransferase; Biochem-Biophys-Res-Commun. 217 (1); 245-9; December 5, 1995;

K. Kato, A.D. Cox, M.M. Hisaka, S.M. Graham, J.E. Buss, C.J. Der; Isoprenoid addition to ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 89(14): 6403-6407; July 15, 1992;

W.G. McKenna, R.J. Muschel, A.K. Gupta, S.M. Hahn, E.J. Bernhard; Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers; Semin Radiat Oncol 12 (3 Suppl. 2); 27-32; Jul 2002;

A. Kikuchi, L.T. Williams; The Post-translational modification of ras p21 Is Important for Raf-1 Activation; The Journal of Biological Chemistry Vol.269; No. 31; 20054-59; August 5, 1994;

N.E. Kohl, S.D. Mosser, S.J. deSolms, E.A. Giuliani, D.L. Pompliano, S.L. Graham, R.L. Smith, E.M. Scolnick, A. Oliff, J.B. Gibbs; Selective Inhibition of ras-Dependent Transformation by a Farnesyltransferase Inhibitor; Science Vol 260; 25 June 1993;

N.E. Kohl, C.A. Omer, M.W. Conner, N.J. Anthony, P.J. Davide, S.J. deSolms, E.A. Giuliani, R.P. Gomez, S.L. Graham, K. Hamilton, L.K. Handt, G.D. Hartman, K.S. Koblan, A.M. Kral, P.J. Miller, S.D. Mosser, T.J. O'Neill, E. Rands, M.D. Schaber, J.B.

P. Ledakis, W. Tester, N. Rosenberg, D. Romero-Fischmann, I. Daskal, T. Lah; Cathepsin D, B, and L in Malignant Human Lung Tissue; Clinical Cancer Research Vol 2; 561-568; March 1996;

K. Leftheris, T. Kline, G.D. Vite, Y.H. Cho, R.S. Bhide, D.V. Patel, M.M. Patel, R.J. Schmidt, H.N. Weller, M.L. Andahazy, J.M. Carboni, J.L. Gullo-Brown, F.Y. Lee, C. Ricca, W.C. Rose, N. Yan, M. Barbacid, J.T. Hunt, C.A. Meyers, B.R. Seizinger, R.

Zahler, V. Manne; Development of Highly Potent inhibitors of Ras Farnesyltransferase Possesing Cellular and in vivo Activity;
J-Med-Chem. 39(1); 224-36; January 5, 1996;

E. Lengyel, J. Klostergaard, D. Boyd; Stimulation of urokinase expression by TNF-alpha requires the activation of binding sites for the AP-1 and PEA-3 transcription factors;
Biochem-Biophys-Acta 1268(1): 65-72 ; Jul 20, 1995;

E. Lengyel, E. Stepp, R. Gum, D. Boyd; Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promotor activity by c-Ha-ras;
J-Biol-Chem. 270(39); 23007-12; Sept 29, 1995;

E.C. Lerner, Y. Qian, M.A. Blaskowich, R.D. Fossum, A. Vogt, J. Sun, A.D. Cox, C.J. Der, A.D. Hamilton, S.M. Sebti; Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes;
J-Biol-Chem. 270(45); 26802-6; Nov 10, 1995;

E.C. Lerner , Y. Qian, A.D. Hamilton, S.M. Sebti; Disruption of oncogenic K-Ras4B processing and signaling by a potent geranylgeranyltransferase I inhibitor;
L-Biol-Chem. 270(45); 26770-3; Nov 10, 1995;

S. Li, R. Rosell, A. Urban, A. Font, A. Ariza, P. Armengol, A. Abad, J. J. Navas, M. Monzo; K-ras gene point mutation: a stable tumor marker in non-small-cell lung carcinoma;
Lung Cancer 11; 19-27; 1994;

R.M.J. Liskamp; Modifizierte Peptide und Peptidmimetika als potentielle Tumorerhemmer;
Angew. Chem.; 106, No. 3, 313-315; 1994;

M. Loprevite, R.E. Favoni, A. De Cupis, T. Scolaro, C. Semino, A. Mazzant Ardrizzoni; In vitro study of farnesyltransferase inhibitor SCH 66336, in combination with chemotherapy and radiation in non-small cancer cell lines;

Oncol Rep Vol 11(2); 407-414; Feb 2004;

D.R. Lowy, B.M. Willumsen; New Clue to Ras Lipid Glue;
Nature Vol 341; 384-384; 5 October 1989;

D.R. Lowy, B.M. Willumsen; Function and Regulation of ras;
Ann. Rev. Biochem. 62; 851-891; 1993;

K. Mullis, F. Faloona; Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase Catalysed
Chain Reaktion;
Meth. Enzymol. 55; 335-350; 1987;

T. Mitsudomi, J. Viallet, J.L. Mulshine, R.I. Linnoila, J.D. Minna and A.F. Gazdar; Mu-
tations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from
small-cell lung cancer cell lines;
Oncogene 6; 1353-1362; 1991;

M. Nigam, C.M. Seong, Y. Qian, A.D. Hamilton, S.M. Sebt; Potent inhibition of human
tumor p21ras farnesyltransferase by A1A2-lacking p21ras CA1A2X peptidomimetics;
J-Biol-Chem. 268(28); 20695-8; Oct 5, 1993;

M. Nilsen-Hamilton, Y.J. Jang, M. Delgado, J.K. Shim, K. Bruns, C.P. Chiang, Y. Fang,
C.L. Parfett, D.T. Denhardt, R.T. Hamilton; Regulation of the expression of mitogen
regulated protein (MRP; proliferin) and cathepsin L in cultured cells and in the murine
placenta;
Mol.-Cell-Endocrinol; 77(1-3); 115-22; May 1991;

R. Pankov, A. Umezawa, R. Maki, Ch. Der, C. Hauser, R. Oshima; Oncogene activation
of human keratin 18 transkription via the Ras signal transductions pathway
Proc. Natl. Acad.Sci. USA Vol 91; 873-877; February 1994;

G.J. Ponk, J.L. Bos; The role of p21^{ras} in receptor tyrosin kinase signalling;
Biochimica et Biophysica Acta 1198; 131-147; 1994;

PORT Meta-analysis Trialists Group; Postoperative radiotherapie for non-small cell lung cancer. Systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials.

Lancet 352; 257-263; 1998;

Y. Qian, M.A. Blaskovich, M. Saleem, C.M. Seong, S.P. Wathen, A.D. Hamilton, S.M. Sebti; Design and Structural Requirement of potent Peptidomimetic Inhibitors of p21^{ras} Farnesyltransferase;

The Journal Of Biological Chemistry Vol 269; No. 17; 12410-13; April 29, 1994;

Y. Qian, A. Vogt, S.M. Sebti, A.D. Hamilton; Design and Synthesis of Non-Peptide Ras CAAX Mimetics as Potent Farnesyltransferase Inhibitors;

J-Med-Chem. 39(1); 217-23; January 5, 1996;

Y. Reiss, J. Goldstein, M. Seabra, P. Casey, M. Brown; Inhibition of Purified p21^{ras} Farnesyl:Protein Transferase by Cys-AAX Tetrapeptides;

Cell Vol 62; 81-88; July 13, 1990;

Y. Reiss, M.C. Seabra, S. A. Armstrong, C.A. Slaughter, J.L. Goldstein, M.S. Brown; Nonidentical subunits of p21^{H-ras} farnesyltransferase : peptide binding and farnesylpyrophosphate carrier functions;

J. Biol. Chem. 266;10672-10677; 1991;

Y. Reiss, M. Seabra, M. Brown, J. Goldstein; p21^{ras}Farnesyltransferase: purification and properties of the enzyme;

Biochemical Society Transactions Vol.20; 487-488; 1992;

S. Rodenhuis and R.J. Slebos; Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer;

Cancer Res. 52; 2665s-2669s; 1992;

J.A. Roth, J.D. Cox, W.K. Hong; Lung cancer;

Blackwell Scientific Publication, Cambridge Massachusetts 57-104, 1993;

W.A. Schafer, R. Kim, R. Sterne, J. Thorner, S.-H. Kim, J. Rine; Genetic and Pharmacological Suppression of Oncogenic Mutations in RAS Genes of Yeast and Humans; Science Vol 245; 28 July 1989;

W.R. Schafer, C.E. Trueblood et al.; Enzymatic Coupling of Cholesterol Intermediates to a Mating Pheromone Precursor and to the Ras Protein; Science Vol 249; 7 September 1990;

M. Schuermann;
Nucleic Acids Res. Vol. 18; 4945-4946; 1990;

M.C. Seabra, Y. Reiss, P. Casey, M. Brown, J. Goldstein; Protein Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase Share a Common α Subunit; Cell Vol 65; 429-434; May 3, 1991;

M. Serke, V. Rudat; Adjuvante Therapie der frühen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC); Onkologe 8; 434-447; 2002;

S.J. DeSolms, T.M. Ciccarone, S.C. MacTough, A.W. Shaw, C.A. Buser, M. Ellis-Hutchings, C. Fernandes, K.A. Hamilton, H.E. Huber, N.E. Kohl, R.B. Lobell, R.G. Robinson, N.N. Tsou, E.S. Walsh, S.L. Graham, L.S. Beese, J.S. Taylor; Dual protein farnesyltransferase-geranylgeranyltransferase-I inhibitors as potential cancer chemotherapeutic agents.

J. Sun, Y. Qian, A. Hamilton, S. Sebti; Ras CAAX Peptidomimetic FTI 276 Selectively Blocks tumor Growth in Nude Mice of a Human Lung Carcinoma with K-Ras Mutation and p53 Deletion; Cancer Research 55;4243-4247; October 1, 1995;

J. Travis; Novel Anticancer Agents Move Closer to Reality; Science Vol 260; 25 June 1993;

A. Vogt, Y. Qian, M. Blaskovich, R. Fossum, A. Hamilton, S. Sebt; A Non-peptide Mimetic of Ras-CAAX: Selective Inhibition of Farnesyltransferase and Ras Processing; The Journal Of Biological Chemistry Vol.270; no. 2; 660-4; January 13, 1995;

Ch. Wagener; Einführung in die molekulare Onkologie: Veränderung und Wirkung von Tumorgenen und Tumorproteinen;
Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York 1996;

T. Wang, P.D. Danielson, B. Li, P.C. Shah, S.D. Kim, P.K. Donahoe; The p21^{RAS} Farnesyltransferase α Subunit in TGF- β and Activin Signaling;
Science; Vol 271; 1120-1123; 23 February 1996;

D.B. Whyte, P. Kirschmeier, T.N. Hockenberry, I. Nunez-Oliva, L. James, J.J. Catino, W.R. Bishop, J.-K. Pai; K- and N-Ras are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors;
The Journal of Biological Chemistry Vol.272, No. 22; pp.14459-14461; 1997;

B.M. Willumsen et al.; Harvey murine sarcoma virus p21^{ras} protein: biological and biochemical significance of the cystein nearest the carboxy terminus;
EMBO J. 3; 2581-2585; 1984;

B.M. Willumsen, A. Cox, P. Solski, Ch. Der, J. Buss; Novel determinants of H-Ras plasma membranes localisation and transformation;
Oncogene Vol. 13; 1901-1909; 1996;

T. Wang, P.D. Danielson, B. Li, P.C. Shah, S.D. Kim, P.K. Donahoe; The p21 (RAS) Farnesyltransferase alpha Subunit in TGF- β and Activin Signaling;
Science 271 (5252); 1120-2; Febuary 23, 1996;

N. Yan, C. Ricca, J. Fletcher, Th. Glover, B. Seizinger, V. Manne; Farnesyltransferase Inhibitors Block the Neurofibromatosis Type I (NF 1) Malignant Phenotype;
Cancer Research 55; 3569-3575; August 15, 1995;

F.L. Zhang, P. Kirschmeier, D. Carr, L. James, R.W. Bond, L. Wang, R. Patton, W.T. Windsor, R. Syto, R. Zhang, W.R. Bishop; Characterization of Ha-Ras, N-Ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as *in vitro* substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type 1;

J.-Biol.-Chem. Vol.272, No.15; 10232-10239; April 11, 1997;

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Bochum Andres, K. H.; Braunsfurt, J.; Düring v. M.; Eysel, U.; Hanstein, W. G.; Heilmeyer, M. G.; Heuser, L.; Holldorf, A. W.; Huffmann, G.; Kalisch, W.-E.; Krämer, J.; Krieg, M.; Krüskemper, G.; Opferkuch, W.; Peskar, B.; Ricken, D. Röskenbleck, H.; Schulz, K.-D.; Veh, R.; Voigtmann, R.; Welzel, P.; Zumtobel, V.;

in Marburg Arnold, R.; Baum, E.; Engel, P.; Eschenbach, C.; Gotzen, L.; Griss, P.; Happle, R.; Havemann, K.; Kleinsasser, O.; Krieg, J.-C.; Kroll, P.; Lange, H.; Lennartz, H.; Maisch, B.; Mennel, H.-D.; Pohlen, M.; Riedmüller, H.; Rothmund, M.; Seybert, H.; Thomas, C.; Wichert v., P.; Zelder, O.;

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Professor Dr. med. Marcus Schuermann für die Bereitstellung des Themas sowie für die jederzeit mögliche fachliche Diskussion, besonders auch Dr. rer. nat. Moira Behn für die unermüdliche fachliche und persönliche Unterstützung,
Dr. med. Bettina Hanekamp für ausdauernde konstruktive Kritik,
Dr. med. Bettina Schüller und Dr. med. Kerstin Hellwig für ständige persönliche Unterstützung und Motivation,
Dr.-Ing. Michael Schlothane als persönlichem Computer-Fachmann
und allen Freunden in Marburg und Bochum.