

Aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie  
und Onkologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg



**Synergistische Effekte von Lonafarnib und Carboplatin auf  
humane Ovarialkarzinomzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität  
Marburg

vorgelegt von

Jennifer Stolze geb. Rinke aus Wolfsburg

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

16.12.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. M. Rothmund

**Referent:** Prof. Dr. U. Wagner

**1. Korreferent:** PD Dr. M. Ritter

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Das Ovarialkarzinom .....	5
1.2	Carboplatin .....	6
1.3	Multi Drug Resistance .....	6
1.4	Die Entstehung von Tumoren.....	7
1.4.1	Das Protoonkogen Ras .....	8
1.4.2	Der Zellzyklus .....	8
1.5	Der Farnesyltransferase-Inhibitor Lonafarnib .....	10
1.6	Nekrose und Apoptose: 2 Arten des Zelltodes .....	11
1.7	Kombinationstherapien und die Messung synergistischer, additiver und antagonistischer Effekte .....	12
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit.....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Material.....	14
2.1.1	Charakterisierung der Zellreihen .....	14
2.1.2	Material für die Kultivierung der Zellen .....	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.4	Chemikalien und Lösungen.....	15
2.1.5	Laborgeräte .....	15
2.1.6	Software.....	16
2.1.7	Ansätze .....	16
2.2	Methoden .....	17
2.2.1	Kultivierung der Zellen .....	17
2.2.2	Auftauen von Zellen .....	17
2.2.3	Passagieren von Zellen .....	18
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung .....	18
2.2.5	Cryokonservierung der Zellen.....	19
2.2.6	Proliferationsassays mittels Kristallviolett-färbung.....	19
2.2.6.1	Verdünnungsreihen.....	19

2.2.6.2	Zeitversuche.....	21
2.2.6.3	Konzentrationsversuche.....	22
2.2.6.4	Synergismusversuche .....	22
2.2.6.5	Statistische Methoden.....	23
2.2.7	Zellzyklusanalyse .....	23
2.2.8	Apoptoseinduktionsassay .....	25
2.2.9	Versuche zur Hemmbarkeit von Multi Drug Resistance Proteinen .....	27
2.2.9.1	Vorversuche zur Validierung der Methode .....	27
2.2.9.2	Akkumulationsversuche mit Daunorubicin, Lonafarnib und Carboplatin .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Proliferationsassays .....	30
3.1.1	Untersuchung der Zeitabhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Carboplatin und Lonafarnib auf SKOV-3 und BG1- Zellen .....	30
3.1.2	Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wachstumshemmender Effekte von Carboplatin und Lonafarnib auf BG1 und Skov3.....	32
3.1.3	Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib in der Wachstumshemmung von BG1- und Skov3- Zellen.....	35
3.1.4	Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib in der Wachstumshemmung von BG1- und Skov3-Zellen.....	36
3.1.4.1	Synergismusversuche mit BG1 .....	36
3.1.4.2	Synergismusversuche mit Skov3.....	39
3.1.4.3	Berechnung synergistischer Effekte mittels Interaktionsindex .....	41
3.2	Zellzyklusanalysen durch DNA Quantifizierung mittels Propidiumiodid .....	42
3.2.1	Zellzyklusanalyse BG1 .....	43
3.2.2	Zellzyklusanalyse Skov3 .....	44
3.3	Apoptose Messung mittels Annexin-5 .....	46
3.3.1	Apoptose Messung BG1 .....	47
3.3.2	Apoptose Messung Skov3 .....	49
3.4	Medikamentenakkumulation mit Daunorubicin.....	50
3.4.1	Akkumulationsversuche BG1.....	50
3.4.2	Akkumulationsversuche Skov3.....	52

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>74</b>
8.1	Ehrenwörtliche Erklärung.....	74
8.2	Danksagung .....	75
8.3	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer.....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist mit einem Anteil von 4,7% an allen Krebserkrankungen die 5. häufigste maligne Erkrankung der Frau. Kennzeichnend für das Ovarialkarzinom ist weiterhin die sehr schlechte Prognose. So gehen 5,6% aller jährlichen Krebssterbefälle zu Lasten des Ovarialkarzinoms.<sup>55</sup> Gründe für diese hohe Sterblichkeit sind zum einen das Fehlen von Frühsymptomen und zum anderen der Mangel an effektiven Screeningmethoden. Damit verbunden ist die Entdeckung in den späten, ungünstigen Stadien. 80% der Frauen befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im fortgeschrittenen Stadium FIGO 2b bis 4.<sup>53</sup>

Risikofaktoren für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms sind neben einer positiven Familienanamnese und hohem Alter Nulliparität sowie eine frühe Menarche und späte Menopause. Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, mit der Zahl der erfolgten Ovulationen steigt. Die durch Follikelrupturen entstehenden Wunden regen die Zellteilung des Epithels, und damit potentiell eine maligne Entartung, an. Der größte Teil der Ovarialkarzinome geht dementsprechend aus Epithelzellen hervor.<sup>7, 25</sup>

Die aktuelle Therapie des Ovarialkarzinoms sieht eine möglichst radikale operative Tumorentfernung mit anschließender platinhaltiger Chemotherapie vor. Derzeitige Standardtherapie ist, insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien, die Kombinationstherapie von Carboplatin und Paclitaxel. Das initial gute Ansprechen der meisten Patientinnen auf diese Kombinationstherapie ist häufig gefolgt von einem Tumorrezidiv.<sup>56, 58</sup> Die dadurch bestehende hohe Mortalität zeigt den Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten.

## 1.2 Carboplatin

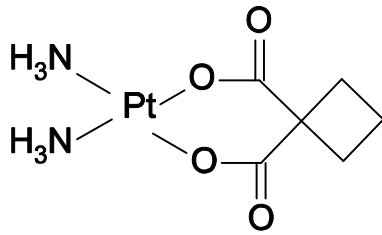


Abb. 1-1: Strukturformel von Carboplatin

Carboplatin ist ein schon seit langem bekanntes zu den Alkylanzien gehörendes Zytostatikum. Verwendet wird es vor allem zur Bekämpfung solider Tumore wie dem Hoden-, Bronchial-, Endometrium-, Blasen-, Prostata- und Ovarialkarzinom. Beim Ovarialkarzinom entspricht eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel der aktuellen Standardtherapie.<sup>56, 58</sup>

Der Wirkungsmechanismus beruht auf der Bildung von Aquokomplexen in wässriger Lösung und einer dadurch entstehenden Vernetzung von DNA-Strängen. Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet.

Gegenüber Cisplatin hat sich Carboplatin durch ein günstigeres Nebenwirkungsspektrum bewährt (weniger Übelkeit, Oto- und Nephrotoxizität). Stärker ausgeprägt und auch dosislimitierend ist jedoch die Knochenmarkdepression, der man mit Verlängerung der Therapieintervalle begegnet. Carboplatin ist heute das Alkylanz der 1. Wahl. Problematisch ist jedoch noch immer die hohe Rate an Resistenzbildung nach initial gutem Ansprechen auf die Therapie.<sup>28, 46, 54</sup>

## 1.3 Multi Drug Resistance

Eines der Hauptprobleme in chemotherapeutischen Behandlungen besteht in der Bildung von Resistenzen des Tumors gegen Chemotherapeutika verschiedenster chemischer Klassen. Dieser Umstand wird als „Multi Drug Resistance“ bezeichnet.<sup>50</sup> Ein hierzu führender Mechanismus ist die Überexpression von Multi Drug Resistance Proteinen durch maligne entartete Zellen.

Multi Drug Resistance Proteine gehören einer Subfamilie der ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette) an.

Eine Überexpression von P-Glykoprotein, ein zur Familie der ATP-abhängigen Multi-Drug-Resistance-Proteine gehörendes Protein, wird am häufigsten in Zellen mit Multi Drug Resistance gefunden. Physiologisch werden P-Glykoproteine in vielen Zellen epithelialen und endothelialen Ursprungs, insbesondere auch im Intestinaltrakt, Gehirn und der Plazenta, expremiert. Die Funktion ist der Schutz der Zelle vor toxischen Substanzen; diese werden durch das P-Glykoprotein aus der Zelle hinaus befördert.<sup>72</sup>

Lonafarnib (verwendeter Farnesyltransferaseinhibitor, siehe 1.5) hat sich als potenter Inhibitor des P-Glycoproteins erwiesen.<sup>73</sup> Kombinationen von Lonafarnib mit Zytostatika, die Substrate des P-Glycoproteins sind wie z.B. Vincristin und Taxane, zeigten in präklinischen Tumormodellen eine verstärkte Wirkung.<sup>71</sup>

Allerdings wurde beobachtet, dass Lonafarnib nicht nur mit Substanzen, die Substrate für das P-Glycoprotein darstellen, synergistisch wirkt. Eine verstärkte Wirkung konnte auch bei Kombination mit den nicht P-Glycoproteinsubstraten 5-Floururacil, Cisplatin und Cyclophosphamide nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Lonafarnib auch eine hemmende Wirkung auf andere Multi-Drug-Resistance-Proteine als P-Glycoprotein ausübt, so z.B. auf MRP1 und 2.<sup>73</sup>

Andere Resistenzmechanismen liegen in Mutationen des Genoms, die zur malignen Entartung einer Zelle führen können, verankert.<sup>27</sup>

## 1.4 Die Entstehung von Tumoren

Für die Tumorentstehung wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Durch Mutationen der DNA kommt es zu Störungen des die Homeostase und die Zellteilung regulierenden Stoffwechsels der Zelle. Zu Malignität führen dabei unter anderem der Sensitivitätsverlust gegenüber wachstumshemmenden Signalen, ein Verselbstständigen der zu Zellteilung führenden Signalwege, die Fähigkeit zur Angiogenese und Metastasierung sowie Störungen der Apoptose.<sup>18, 27</sup>

Entscheidende Mutationen, die zur malignen Entartung eines Gewebes führen können, sind solche, die zu Funktionsverlusten von Tumorsuppressorproteinen wie p53 oder zur Aktivierung von Onkogenen wie z.B. des Ras-Proteins führen.<sup>61</sup>



### 1.4.1 Das Protoonkogen Ras

Eine große Rolle in der Tumorgenese kommt der Mutation des Protoonkogens Ras zu. Es existieren 4 Isoformen des Ras-Proteins: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B, wobei K-Ras4A und B Splicevarianten desselben Proteins sind. Bestimmte Varianten dominieren in verschiedenen Tumoren, wobei die Mehrzahl der Mutationen in menschlichen Tumoren auf K-Ras Mutationen zurückzuführen ist.<sup>44, 45, 76</sup> Auch beim Ovarialkarzinom geht der größte Anteil auf Mutationen von K-Ras zurück.<sup>70</sup>

Entscheidend für die Funktion des Proteins ist eine Bindung an die Plasmamembran. Hierfür sind einige posttranslationelle Modifikationen nötig. Das Enzym Farnesyltransferase ist für einen ausschlaggebenden Schritt der Farnesylation des Ras-Proteins zuständig.<sup>2, 49</sup> Es katalysiert die Übertragung eines 15-Carbon-Isoprenyl-Lipids von Farnesyl-Diphosphat auf Ras (und andere Proteine). Das Einfügen dieses lipophilen Restes ist für eine Bindung in der ebenfalls lipophilen Plasmamembran nötig.<sup>10</sup> Eine Hemmung des Enzyms Farnesyltransferase kann somit zu Funktionseinschränkung von Ras führen.

Normalerweise geht das Ras-Protein von seinem aktiven, GTP-gebundenen Status wieder in einen inaktiven, GDP-gebundenen Status über. Bei Vorliegen einer Mutation, meist einer Punktmutation<sup>20</sup>, ist die Fähigkeit des Ras-Proteins zur Hydrolyse von GTP reduziert, es liegt somit vermehrt in aktiver Form vor. Aktives Ras-Protein ist bei der Übertragung von mehreren extrazellulären Signalen in die Zelle beteiligt. So übermittelt es beispielsweise Wachstumsfaktor induzierte Zellteilung oder trägt zur Differenzierung von Zellen bei. Eine wichtige Rolle spielt es außerdem bei der Kontrolle des Übergangs von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus.<sup>8, 43</sup>

### 1.4.2 Der Zellzyklus

Der Zyklus einer Zelle besteht aus vier aufeinanderfolgenden Phasen: Der G1-, S-, G2 und M-Phase. Die G1-S- und G2-Phase werden zusammengefasst als Interphase auch der Mitose-Phase gegenüber gestellt. Während der S-Phase (Synthesephase) findet die Verdoppelung des genetischen Materials statt, in der M-Phase (Mitosephase) kommt es zur Zellteilung. Die dazwischen liegenden Phasen G1 und G2 (Gap-Phasen) dienen jeweils der Vorbereitung für die erfolgreiche S- bzw. M-Phase. So werden in der G1-Phase Zellorganellen gebildet und Cytoplasma ersetzt.

Bei Fehlen von Mitosesignalen oder dem Vorhandensein von Antimitosesignalen geht die Zelle in einen Ruhezustand, die G<sub>0</sub>-Phase, über.

Die Steuerung des Zellzyklus, insbesondere der Übergang von einer Phase in die nächste, unterliegt einer sehr genauen Steuerung durch einen ganzen Regulationsapparat. Zu dessen wichtigsten Bestandteilen gehören eine Reihe von Enzymen, die CDKs (Cyclin-dependent kinases) und Cycline. Die Expression von Cyclinen ist zellzyklusspezifisch. Aktiviert werden CDKs durch Komplexbildung mit bestimmten Cyclinen. Des Weiteren ist die Komplexbildung von verschiedenen CDKs und Cyclinen möglich, so dass in den verschiedenen Phasen spezifisch aktivierte CDKs vorherrschen. Dies wiederum führt durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung zu Aktivierung oder Inaktivierung von weiteren Proteinen (wie z.B. dem Tumorsuppressorprotein Rb), die den weiteren Ablauf des Zellzyklus regulieren.<sup>51</sup>

Der interne Regulationsapparat der Zelle wird durch eine Reihe von extrazellulären Faktoren beeinflusst. Es existieren sowohl positive, d.h. den Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase fördernde Faktoren, als auch negative Regulatoren. Diese blockieren den G<sub>1</sub>-S-Phasenübergang.<sup>22</sup>

Störungen in diesem Kreislauf können zu einer Verkürzung der einzelnen Phasen und damit Beschleunigung des gesamten Zellzyklus führen. Dies kann z.B. durch Mutationen von ihm vorgeschalteten Proteinen wie Ras geschehen, das über ein Anheben des Cyclin D1-Spiegels zu einer Verkürzung der G<sub>1</sub>-Phase der Zelle führen kann.<sup>43</sup>

Die Überproduktion von einzelnen, direkt zum Regulationsapparat der Zelle gehörenden Enzymen, wie z.B. der Überproduktion von CDK4, resultiert ebenfalls in einer Störung des Zellzyklus.<sup>22</sup>

Einige bereits erwähnte und für den Zellzyklus wichtige Proteine (Ras, CENP) unterliegen einer Farnesylierung, das heißt vor Funktionsaufnahme ist das Einfügen eines Lipidrestes erforderlich. Damit werden sie zu potentiellen Zielen für Farnesyltransferase-Inhibitoren.

## 1.5 Der Farnesyltransferase-Inhibitor Lonafarnib

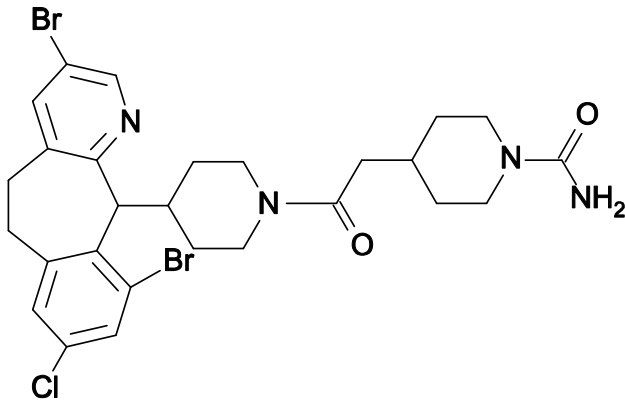


Abb. 1-2: Strukturformel von Lonafarnib

Lonafarnib gehört einer neuen Klasse von Antitumormedikamenten, den Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI), an. Die Farnesyltransferase ermöglicht durch das Einfügen von lipophilen Anteilen, dass Proteine wie z.B. Ras in die Zellmembran integriert und damit funktionsfähig werden können. Lonafarnib hemmt die Farnesylation von N-Ras, H-Ras und K-Ras4B.<sup>15</sup>

Für K-Ras4B und N-Ras, nicht jedoch für H-Ras, gibt es eine Alternative zur Farnesylation durch die Farnesyltransferase, da sie auch als Substrat für ein ähnliches Enzym, die Geranylgeranyl-Transferase, agieren können. Dies führt dazu, dass die Funktion von H-Ras durch FTI komplett unterbunden werden kann, von K-Ras und N-Ras jedoch nur reduziert wird, da die Affinität zur Geranylgeranyltransferase geringer ist als zur Farnesyltransferase.<sup>31, 76, 77</sup>

Durch die Beobachtung, dass Lonafarnib auch das Wachstum von Tumoren, die nicht Ras-mutiert sind, hemmt, ergab sich der Verdacht, dass es neben Ras noch andere in den Zellzyklus eingreifende „Zielproteine“ gibt, deren Farnesylation durch Lonafarnib gehemmt wird.<sup>34</sup> Mögliche andere Ziele sind die Proteine RhoB (Organisation des Cytoskelettes), Rheb (Ras homologous enriched in brain) sowie die für die Mitose wichtigen Zentromer Proteine CENP-E und CENP-F.<sup>9, 19</sup>

Ein weiterer Wirkungsmechanismus von Lonafarnib ist eine Hemmung von Multi-Drug-Resistance Proteinen wie P-Glykoprotein, MRP1 und MRP2. Es behindert dadurch den Efflux und die damit verbundene Resistenz von anderen Medikamenten, die Substrate für diese Proteine darstellen.<sup>73</sup>

Des Weiteren hemmt Lonafarnib die Angiogenese von Tumoren. Der Angiogenesefaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) wird durch Ras-

Mutation vermehrt exprimiert und die Expression von antiangiogenese Faktoren gehemmt, so dass eine indirekte Angiogenesehemmung durch Lonafarnib schon allein durch die Funktionsminderung von Ras gegeben wäre. Jedoch hemmt Lonafarnib auch direkt die Sekretion von Angiogenesfaktoren und übt auch einen direkten Effekt auf das Endothel aus.<sup>26, 59</sup> Seinen zellwachstumshemmenden Einfluss vermittelt Lonafarnib über die Induktion von Apoptose.

## 1.6 Nekrose und Apoptose: 2 Arten des Zelltodes

Apoptose und Nekrose stellen unterschiedliche Formen des Zelltodes dar. Die Apoptose wird auch als „programmierter Zelltod“ der Zelle bezeichnet und stellt einen streng regulierten Vorgang dar, der als Reaktion auf interne oder externe Stimuli in Gang gesetzt wird. Charakteristisch sind hierfür eine Reihe von morphologischen Änderungen der Zelle wie z.B. das Schrumpfen (Pyknose) der Zelle und die Fragmentation in membranumhüllte, schnell phagozytierbare Apoptosekörper sowie Chromatinkondensation und DNA Fragmentation. Der Sinn dieses Vorgangs ist die Aufrechterhaltung der Homeostase des Körpers: Der Neuentstehung von Zellen durch Mitose wird so ein Mechanismus entgegengesetzt, der ohne Entzündungsreaktion zur Elimination von Zellen führt. Eine insuffiziente Apoptose kann u.a. zur Krebsentstehung beitragen, während ein Überschießen z.B. zu neurodegenerativen Erkrankungen führen kann.<sup>12, 29, 57</sup>

Im Gegensatz dazu gehören zu den morphologischen Änderungen während der Nekrose eine Größenzunahme der Zelle und der einzelnen Organellen durch Akkumulation von Wasser und Elektrolyten, eine frühe Membranruptur und eine dadurch induzierte inflammatorische Reaktion. Lange Zeit wurde die Nekrose als „zufälliger, unkontrollierter“ Zelltod der Apoptose gegenübergestellt. Inzwischen ist man jedoch der Meinung, dass auch die Nekrose einem kontrollierten Mechanismus unterliegt. So wurden Rezeptoren (z.B. TNFR1, Toll-like Rezeptoren) identifiziert, die einen nekrotischen Zelltod induzieren können.<sup>38, 57</sup>

Carboplatin ist in der Lage, sowohl Apoptose als auch Nekrose zu erzeugen, während Lonafarnib als Farnesyltransferase Inhibitor dafür bekannt ist, Apoptose zu induzieren.<sup>14, 35, 65</sup>

## 1.7 Kombinationstherapien und die Messung synergistischer, additiver und antagonistischer Effekte

Die Kombination mehrerer Zytostatika ist aus vielerlei Hinsicht sinnvoll und ein viel untersuchter therapeutischer Ansatz.<sup>17, 24, 39</sup> Sollte die Wirkung der beiden Medikamente additiv oder synergistisch sein, so ist eine Verringerung der Gesamtdosis und damit eine Verringerung der Nebenwirkungen möglich. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Ausbildung von Resistenzen verhindert bzw. verzögert wird.

Generell ist bei der Kombination zweier Medikamente eine additive, super-additive (synergistische) oder antagonistische Wirkung möglich.

Andere FTIs (Tipifarnib und L-744832) zeigten in Kombination mit Simvastatin bzw. Cisplatin verstärkte zellwachstumhemmende Wirkungen.<sup>69, 75</sup> Auch Lonafarnib hat bereits in Kombination mit Cisplatin in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie additive und synergistische Effekte gezeigt.<sup>1, 15</sup> Auch die Kombination von Lonafarnib mit Taxanen erbrachte verstärkte Effekte<sup>33</sup>, so dass die Untersuchung synergistischer Effekte bei Kombination mit Carboplatin sinnvoll erscheint.

Zur Messung der beschriebenen Effekte (additiv, synergistisch und antagonistisch) wurde bei den Proliferationsassays der Interaktionsindex berechnet.<sup>66</sup>

Zunächst wird hierfür ein Effektniveau (z.B. 50%ige Wachstumshemmung von der Kontrolle) gewählt. Dann wird berechnet (lineare Interpolation), welche Dosis des Medikamentes A bzw. B alleine für diesen Effekt benötigt wird, sowie welche Konzentration die Medikamente bei gemeinsamer Anwendung haben müssen, damit der gewählte Effekt nachweisbar ist. Als Formel ausgedrückt berechnet sich der Interaktionsindex<sup>66</sup> folgendermaßen:

$$y = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

y = Interaktionsindex

a und b = Medikamentenkonzentrationen in Kombinationsanwendung für definierten Effekt

A und B = Medikamentenkonzentrationen in Einzelanwendung

Ein Interaktionsindex von 1 entspricht einer additiven Wirkung, während bei einem Interaktionsindex von größer als 1 von einem antagonistischem Effekt ausgegangen

werden kann. Ist der Interaktionsindex kleiner als 1, handelt es sich um einen synergistischen Effekt.

## **1.8 Zielsetzung dieser Arbeit**

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich in vitro synergistische Effekte zwischen dem klassischen Zytostatikum Carboplatin und dem Farnesyltransferase-Inhibitor Lonafarnib auf die Ovarialkarzinomzellreihen SKOV 3 und BG1 nachweisen lassen. Kombinationstherapien sind, wie unter 1.7 beschrieben, sinnvoll, da durch Einsparung von Medikamenten evt. Nebenwirkungen vermindert werden können und sich einige Medikamente in ihrer Wirkung sogar gegenseitig verstärken oder die Resistenzbildung verzögert werden kann. Lonafarnib zeigte bereits synergistische Effekte bei Kombination mit Cisplatin und Taxanen, wenn diese Effekte auch auf einzelne Zellreihen beschränkt waren. Die Untersuchung auf synergistische Effekte mit Carboplatin erscheint somit sinnvoll.

Es wurden zunächst Proliferationsassays durchgeführt. Zur weiteren Spezifizierung der Beobachtungen folgte die Durchführung von Zellzyklusanalysen, Apoptoseinduktionsassays und Versuchen zur Medikamentenakkumulation. Bei den Zellzyklusanalysen wurde die Wirkung der Medikamente auf die Aufteilung der Zellpopulationen in die einzelnen Zellzyklusphasen untersucht. So z.B., ob Lonafarnib, wie bereits beschrieben worden ist, einen G<sub>2</sub>-/M-Arrest auslöst.<sup>67</sup> Der Apoptoseinduktionsassay mittels Annexin 5 wurde zur Differenzierung zwischen Apoptose- und Nekroseinduktion der Medikamente eingesetzt. Die Medikamentenakkumulation wurde schließlich untersucht, weil Berichte über die Hemmung von Multi-Drug-Resistance Proteinen durch Lonafarnib vorliegen und so zumindest teilweise die synergistischen Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib erklärt werden könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Charakterisierung der Zellreihen

Beide Ovarialkarzinomzelllinien stammen vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

**SKOV-3:** Adhärent wachsende humane Adenokarzinomzelllinie epithelialen Ursprungs. Die Etablierung erfolgte durch Fogh et al. 1977.

**BG-1:** gering differenzierte, adhärent wachsende Adenokarzinomzelllinie. Die Etablierung erfolgte durch Geisinger et al. 1988.

#### 2.1.2 Material für die Kultivierung der Zellen

-Gewebekulturflaschen	550 ml Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen, GER
-serologische Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen, GER
-Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen , GER
-Zellsrabber	39 cm, Sarstedt, Nümbrecht, GER
-Cryoröhrchen	2ml Nunc <sup>TM</sup> , Roskilde Dänemark
-Eppendorf Tube	Eppendorf, Hamburg, GER

#### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

-Mikrotiterplatten (96 Wells, 6 Wells)	Greiner Bio One, Frickenhausen, GER
-Multipipettenspitzen	Ritter, Schwabmünchen, GER
-FACS-Röhrchen 5ml	BD Falcon (Polystyren round Bottom Tube) Bedford, USA
- Pipettenspitzen (10,100, 300, 1000µl)	Thermo, Gilson, Villiers-le-Bel, FR
-Pasteurpipette (3ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen, GER
-Petrischalen	Cellstar, Greiner Bio One, Frickenhausen, GER

### 2.1.4 Chemikalien und Lösungen

-RPMI (1640 Flüssigmedium w2g/l NaHCO <sub>3</sub> , w 0,532g/l L-Glutamin)	PAA, Pasching, AU
-Foetal Bovine Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
-Penicillin/ Streptomycin	10mg/ml, Gibco, PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
-Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
-Trypsin/ EDTA Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
-Ethanol	Roth GmbH, Mannheim, GER
-Tryphanblau	Sigma, Steinheim, GER
-PBS	PAA, Pasching, AU
-DMSO	HybriMax, Sigma
-Glutaraldehydlösung (25 %)	Merck, Darmstadt, GER
- Ampuva	Delta Select, Pfullingen, GER
- Kristalviolett	Sigma, Steinheim, GER
- Methanol	Fisher scientific, Leicestershire, UK
-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, GER
-NaN <sub>3</sub> (0,01%)	Serva, Heidelberg, GER
-FACS-Flow	BD Biosciences, Erembodgen, Belgien
-FACS-Rinse	BD Biosciences, Erembodgen, Belgien
-FACS-Clean	BD Biosciences, Erembodgen, Belgien
-Propidiumiodid	Cahbiochem, Darmstadt, GER
-RNase	1mg/ml Stockösung, Serva, Heidelberg, GER
-Annexin 5 FLUOS Staining Kitt	Roche, Mannheim, GER
-Carboplatin	Sigma, Steinheim, GER
-Lonafarnib	Schering Plough, Kenilworth, NJ, USA
-Daunorubicinhydrochloride	Sigma D8809-1MG, GER
-Benzylisothiocyanate 13505	Sigma D13505, GER

### 2.1.5 Laborgeräte

-Steribank	Telstar Bio 2a
-Pipetten	Finnpipette, Thermo, GER
-Pipettboy	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, GER
-Fireboy	Integra Biosciences, Ferwald, GER
-Stickstofftank Locator junior plus	Barnstead, Dubuque, USA
-Wasserbad	GFL 1038, GER
-Brutschrank	Hera Cell, Heraeus, GER
-Multipipette	Multipette plus, Eppendorf, GER
-Zentrifuge	Heraeus, 3 S-R Thermo, GER



-Schüttler	NeoLab, GER
-Mikroskop	Zeiss, GER
-Photometer	Sunrise Tecan
-FACS	BD-Biosciences FACS Calibur, San Jose, USA
-Vortexer	Ika MS 2 Minishaker, USA
-Neubauerzählkammer	Neubauer improved, Planoptik
-ELISA-Software Magellan	Tecan, Gröding, Austria
-Auswertungssoftware Cell Quest Pro	BD Biosciences, 347526, EU

### 2.1.6 Software

-ELISA-Software Magellan	Tecan, Gröding, Austria
-Auswertungssoftware Cell Quest Pro	BD Biosciences, 347526, EU
- Word 2003	Microsoft, USA
- Excel 2003	Microsoft, USA
-OpenOffice Draw	OpenOffice.org, Sun Microsystems Inc
-BK Chem	Beda Kosata

### 2.1.7 Ansätze

Einfrüermedium		90 % FCS	10% DMSO
Färbelösung zur Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung		54% PBS	36% Tryphanblau
Kristallviolett 0,05 %	0,5% Kristallviolett	25% Methanol	75% Ampuva
Entfärbelösung	29,41g Natriumcitrat (0,1 M)	50% Ethanol	50% Ampuva
Fixierer		44% Glutaraldehydlösung	56% Ampuva
Stocklösung (0,5%ig)	5g Kristallviolett	75% Ampuva	25% Methanol
Färbelösung für Proliferationsassays	10% Stocklösung	67,5% Ampuva	22,5% Methanol
Waschpuffer	PBS	0,01% NaN <sub>3</sub>	2% FCS
RNAse Stammlösung		1mg/ml H <sub>2</sub> O	5min 100°C
Propidiumiodidstammlösung			1mg/ml H <sub>2</sub> O

Carboplatin	Lösungsmittel: Ampuva	Stocklösung: 10mM	
Lonafarnib	Lösungsmittel: DMSO	Stocklösung: 10mM	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen in einem Medium bestehend aus 88% RPMI, 10% FCS, 1% Penstreptomycin und 1% Natriumpyruvat. Das optimale Wachstum der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit statt. Durch die Begasung mit CO<sub>2</sub> konnte der pH- Wert im Hydrogencarbonat gepufferten Kulturmedium der Zellen konstant gehalten werden.

Die maximale Kulturdauer betrug 12 Wochen, da sonst die Gefahr einer Veränderung der Zellen durch zu lange Kultivierung bestanden hätte.

Um zu gewährleisten, dass die Zellen steril bleiben, wurden alle Arbeiten mit den Zellkulturen an Sterilbänken mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Des Weiteren wurden Sterilbänke, Handschuhe und alle verwendeten Materialien vor Gebrauch mit Ethanol desinfiziert. Zur Vermeidung von Kontamination wurden nie beide Zelllinien gleichzeitig unter einer Bank bearbeitet und für jede Zelllinie wurde eine separate Mediumflasche bereitgestellt. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4°C für maximal eine Woche.

### 2.2.2 Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung der beiden verwendeten Zelllinien erfolgte in Cryoröhrchen bei -180°C in flüssigem Stickstoff. Kurzzeitig war auch eine Lagerung bei -80°C möglich. Nach dem Auftauen der Zellen im 37°C warmen Wasserbad wurden diese zügig in ein bereitgestelltes steriles Zentrifugenröhrchen überführt und tropfenweise mit 5 ml eiskaltem Zellkulturmedium versetzt.

Danach erfolgte eine Zentrifugation (8 Minuten, 261g). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpallet in 1 ml warmen Kulturmedium resuspendiert.

Die entstandene Zellsuspension wurde nun in eine mit warmem Kulturmedium (24ml Medium) vorbereitete Gewebekulturflasche überführt und im Brutschrank kultiviert.

### **2.2.3 Passagieren von Zellen**

Da es sich bei den beiden verwendeten Zelllinien um adhärent wachsende Zellen handelte, wurde die weitere Vermehrung der Zellen ab einer bestimmten Zellzahl durch Platzmangel behindert. Dies war bei einer Konfluenz von etwa 90% der Fall. Um neuen „Platz“ zu schaffen mussten so viele Zellen entfernt werden, dass noch  $10\text{-}50 \cdot 10^6$  Zellen pro Kulturflasche vorhanden waren. Die entfernten Zellen wurden entweder verworfen oder, wenn benötigt, in eine weitere Kulturflasche überführt.

Zunächst wurde hierfür das Medium aus der voll gewachsenen Kulturflasche entfernt und verworfen. Um nun die adhärent wachsenden Zellen vom Flaschenboden zu lösen, erfolgte eine Behandlung mit etwa 5ml Trypsin; die Inkubationszeit betrug 1 Minute.

Um anschließend die Trypsinierung zu beenden, wurden mindestens 5ml Medium zugegeben. Das darin enthaltende FCS stoppte die Wirkung von Trypsin.

Endgültig gelöst wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellsrabbers. Es folgte, nach Überführung in ein steriles Zentrifugenröhrchen, die Zentrifugation (261g, 8 Minuten). Der Überstand wurde verworfen. Je nach Größe des entstandenen Zellpallets wurden die Zellen in 1- 4 ml Medium resuspendiert und nach dem Zählen (s.u.) auf die benötigte Anzahl an Kulturflaschen verteilt.

### **2.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung**

Aus der nach Resuspendierung vorliegenden Zellsuspension wurde eine kleine Menge (~300 $\mu$ l) in ein Eppendorftube überführt. Da diese Zellen nach dem Zählen verworfen wurden, mussten die folgenden Schritte nicht mehr unter sterilen Bedingungen stattfinden.

Vor dem Zählen wurden 10 $\mu$ l der entnommenen Zellen mit PBS (54 $\mu$ l) und Tryphanblau (36 $\mu$ l) (0,5% Tryphanblau in physiologischer Kochsalz-Lösung) im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Das Zählen erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer im 40er Objektiv eines Mikroskops. Nach Anfeuchten des Deckgläschens haftet dieses am Objektträger. Bei Abgabe einer kleinen Menge der in 1:10 Verdünnung vorliegenden Zellsuspension am Übergang von Deckgläschen zu Objektträger wurde automatisch eine Menge von 0,1µl durch Kapillarkräfte in die Neubauerzählkammer eingesogen.

Im 40er Objektiv des Mikroskops wurden nun mindestens 2 der 4 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert aus beiden Feldern bestimmt. Dabei wurden nur ungefärbte Zellen berücksichtigt; die mit Tryphanblau gefärbten Zellen entsprachen den Toten. Um die Zellzahl pro 0,1 µl (Volumen der Neubauerzählkammer) zu erhalten wurde der Mittelwert mit 10 multipliziert (entsprechend der 1:10 Verdünnung).

Zur Bestimmung der Zellzahl pro 1ml wurde mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert. Der Anteil der lebenden Zellen wurde prozentual ermittelt:

$$\text{lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}} \times 100$$

### 2.2.5 Cryokonservierung der Zellen

Bei ausreichender Zellzahl (min.  $1 \cdot 10^6$  Zellen) konnten die Zellen eingefroren werden. Dazu sollten sich die Zellen möglichst vorher in der logarhythmischen Wachstumsphase befinden, d.h. die letzte Passage sollte nach Möglichkeit 2 Tage zurückliegen.

Das Ernten der Zellen entspricht dem Vorgehen bei der Passage (siehe 2.2.3). Nach der Zentrifugation und dem Verwerfen des Überstandes erfolgt die Resuspendierung in diesem Fall jedoch mit noch eiskaltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO). Das Einfriermedium sollte hierbei zunächst tropfenweise dazugegeben werden, da dies das Überleben der Zellen verbessert. Für  $1 \cdot 10^6$  bis  $1 \cdot 10^7$  Zellen (Zellzahlbestimmung siehe 2.2.4) wurde 1ml Einfriermedium und 1 Cryoröhrchen verwendet.

Über Nacht (min. 4 Stunden) wurden die Cryoröhrchen bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, danach erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-180^\circ\text{C}$ .

### 2.2.6 Proliferationsassays mittels Kristallviolettffärbung

#### 2.2.6.1 Verdünnungsreihen

Ziel dieses Experimentes war es, die Validität der Methode zu zeigen. Dazu wurden Zellsuspensionen definierter Zellzahl hergestellt und diese aufsteigend in 96-well-

Mikrotiterplatte ausplattiert. Sichtbar gemacht werden sollte die ansteigende Zellzahl durch Anfärbung der in den Zellen enthaltenen Proteine. Diese stellten sich nach Färbung mit einer Kristallviolett-färbelösung violett dar. Die Absorption wurde photometrisch gemessen.

Pro Well wurden 100µl ausplattiert und jeweils 6 untereinander liegende Wells mit einer Zellsuspension gleicher Zellzahl bestückt. In alle ganz außen liegenden Wells wurden 100µl reines Medium als Leerwert pipettiert.

Das Ernten und Zählen der Zellen entsprach dem unter „Zellkulturen“ beschriebenen Vorgehen. Für die Zellsuspensionen wurden die Zellen so verdünnt, dass in 3 Ansätzen 20.000 Zellen/100µl, 16.000/100µl und 12.000/100µl hergestellt wurden. Von diesen 3 Ansätzen wurden 1:1 Verdünnungen gemacht, so dass die folgenden Endzellsuspensionen (Angabe je 100µl Zellsuspension) zur Bestückung der Mikrotiterplatte vorlagen:

1000 – 2000 – 4000 – 5000 – 6000 – 8000 – 10.000 – 12.000 – 16.000 – 20.000

Die am Ende vorliegende Mikrotiterplatte sah dementsprechend folgendermaßen aus (Zahlen  $\cdot 10^3 =$  Zellzahl in einem Well):

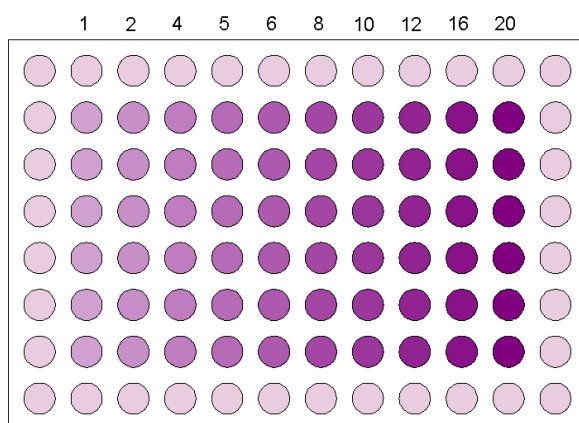


Abb. 2-1: Pipettierschema für die Verdünnungsreihen, das Grundschemata (außenherum zur Bestimmung des Mediumleerwertes reines Medium, je 6 untereinander liegende Wells mit einer Suspension bestückt) wurde bei allen Proliferationsassays angewandt.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Auswertung vorgenommen, welche unter unsterilen Bedingungen stattfinden konnte. Das im Folgenden beschriebene Vorgehen entspricht der Auswertung bei allen Proliferationsassayversuchen.

Zunächst wurde in jedes Well 10 $\mu$ l Fixierer (44% Glutaraldehydlösung (25%ig), 56% Aqua dest.) und anschließend -nach 15min auf dem Schüttler- 100 $\mu$ l Färbelösung gegeben. Weitere 15 Minuten auf dem Schüttler später wurden die Mikrotiterplatten unter fließendem Wasser gewaschen und auf Zellstoff getrocknet.

Nach Zugabe von 100 $\mu$ l Entfärber und weiteren 15 Minuten auf dem Schüttler konnte die photometrische Messung der Absorption vorgenommen werden.

Bei der Messung betrug die Messwellenlänge 560nm und die Referenzwellenlänge 690nm. Die Messung erfolgte mit der Software Cell Quest Pro.

Es zeigte sich, dass die Zellzahl positiv mit der gemessenen Absorption korrelierte (s. Abb. 2-2). Der Versuch wurde insgesamt 4 mal pro Zellreihe unabhängig voneinander durchgeführt.

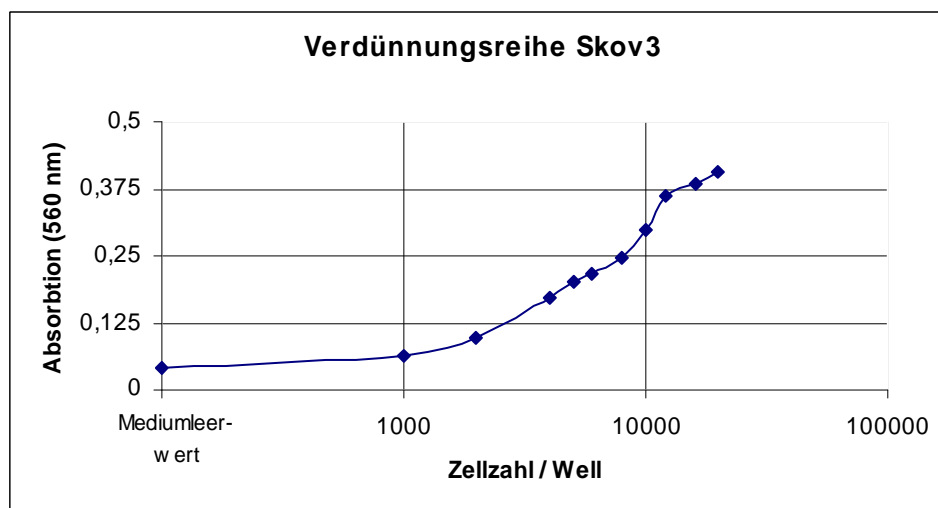


Abb. 2-2: Exemplarisches Beispiel einer Verdünnungsreihe. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Zellzahl und gemessener Absorption.

### 2.2.6.2 Zeitversuche

Um festzustellen, welchen Einfluss die Inkubationszeit auf die das Zellwachstum hemmende Wirkung der Medikamente hat, wurden mit gleichen Medikamentenkonzentrationen versehene Mikrotiterplatten zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet.

Dazu wurden 2000 Zellen in 100 $\mu$ l Medium pro Well ausplattiert, alle ganz außen liegenden Wells hingegen mit reinem Medium versehen. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden, nach Abpipettieren des Mediums, die Medikamente bzw. die Lösungsmittel der Medikamente (Kontrolle, angesetzt entsprechend der am höchsten konzentrierten Medikamentenlösung) auf die Zellen gegeben. Pro Zellreihe wurden 8

Mikrotiterplatten auf diese Weise bearbeitet. Je 2 Platten pro Zellreihe (1 für jedes Medikament) wurden nach 2, 4, 6 und 8 Tagen nach Zugabe der Medikamente ausgewertet. Nach 4 Tagen erfolgte bei den noch verbleibenden 8 Mikrotiterplatten ein Wechsel des Mediums (und damit auch der Medikamente). Die Auswertung (Färbung und photometrische Messung) erfolgte auf die unter 2.2.6.1 beschriebene Weise. Es wurden pro Zellreihe 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

### **2.2.6.3 Konzentrationsversuche**

Wie bei den Zeitversuchen wurden auch hier 2000 Zellen in 100µl Medium pro Well in 96 Well Mikrotiterplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der Medikamente in aufsteigenden Konzentrationen bzw. bei den der Kontrolle dienenden Zellen die Zugabe von 100µl Medium mit den Medikamentenlösungsmitteln. Vorher war das Medium mit der 8er Gilson-Pipette entnommen worden. Es wurden 2 Platten pro Zellreihe bearbeitet (1 pro Zellreihe und Medikament). Die Auswertung erfolgte bei allen 4 Mikrotiterplatten nach 4 Tagen, gerechnet vom Tag der Zugabe der Medikamente. Es wurden pro Zellreihe 2 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

### **2.2.6.4 Synergismusversuche**

Entsprechend den schon beschriebenen Versuchen wurden 2000 Zellen pro Well ausplattiert und nach 24 Stunden Inkubationszeit die Medikamente auf die Zellen gegeben.

Im Unterschied zu den bisherigen Versuchen wurden hier einige Wells mit den beiden Substanzen Carboplatin und Lonafarnib behandelt. Dabei wurde jeweils die eine Substanz in fester Konzentration auf die Zellen gegeben, also eine bestimmte Medikamentenkonzentration auf alle Zellen einer Mikrotiterplatte und die andere in ansteigender Konzentration, wobei je 6 untereinander liegende Wells mit einem Medikament gleicher Konzentration versehen wurden.

Auf diese Weise wurden 8 Platten pro Zellreihe bearbeitet. Je 4 Platten wurden mit dem Medikament mit ansteigenden Konzentrationen behandelt, davon erhielten jedoch nur 3 Platten auch die andere Substanz als feste Konzentration (statt des Medikamentes in fester Konzentration wurde bei dieser Platte das Lösungsmittel dieses Medikaments

ausplattiert). Bei den weiteren 4 Platten wurden die Medikamente vertauscht, und das andere entsprechend in ansteigender Konzentration bzw. als Festsubstanz auf die Zellen plattiert. Die ersten 6 Wells jeder Platte wurden zur Kontrolle nur mit den Medikamentenlösungsmitteln beider Medikamente ( $H_2O$  und DMSO) behandelt. Die nächsten 6 Wells wurden mit dem Lösungsmittel des in ansteigender Konzentration verwendeten Medikamentes versehen und wie alle folgenden Wells mit der Festsubstanz. Zur Verdeutlichung des Versuchsaufbaus im folgenden 4 Beispielplatten:

Platte 1: Carboplatin in ansteigender Konzentration + DMSO (Lösungsmittel  
Lonafarnib)

Platte 2: Carboplatin in ansteigender Konzentration (nicht in den 6 Wells der zweiten  
Reihe) + Lonafarnib  $0,1\mu M$  überall (außer die 6 Wells der ersten Reihe)

Platte 3: Carboplatin in ansteigender Konzentration (nicht in den 6 Wells der zweiten  
Reihe) + Lonafarnib  $0,5\mu M$  überall (außer die 6 Wells der ersten Reihe)

Platte 4: Carboplatin in ansteigender Konzentration (nicht in den 6 Wells der zweiten  
Reihe) + Lonafarnib  $1\mu M$  überall (außer die 6 Wells der ersten Reihe)

Platte 1-4: in den 6 Wells der 1. Reihe jeweils nur die Lösungsmittel beider  
Medikamente

Die Auswertung erfolgte entsprechend den oben beschriebenen Methoden 4 Tage nach Zugabe der Medikamente. Es wurden pro Zellreihe 2 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt

### **2.2.6.5 Statistische Methoden**

Zur Auswertung der Proliferationsassays und Bestimmung der Signifikanz gefundener Effekte wurde der nicht paarweise, einseitige Student'sche T-Test durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### **2.2.7 Zellzyklusanalyse**

Die Zellzyklusanalyse wurde nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid am FACS-Gerät (Fluorescence activated cell sorting, Durchfluscytometrie) durchgeführt. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA (und RNA) interkaliert. Da der DNA-Gehalt einer Zelle spezifisch mit den Zellzyklusphasen



variiert, ermöglicht die so durchgeführte quantitative DNA Bestimmung eine Zuordnung zu den einzelnen Zellzyklusphasen.

Da die Zellwand undurchlässig für Propidiumiodid ist, mussten die Zellen vorher in Ethanol fixiert werden. Zur Vermeidung von Verfälschungen durch RNA wurde diese vorher mit RNase vernichtet.

Es wurden  $2 \cdot 10^5$  (BG1) bzw.  $1 \cdot 10^5$  (Skov3) Zellen in 1ml Medium pro Well in einer 6 Well-Platte ausgesät. Pro Versuchsansatz wurden 7 Wells für eine Zellreihe verwendet. Ein Well diente der Kontrolle, hier wurden die Lösungsmittel der Medikamente einen Tag nach dem Ausplattieren in 2ml hinzugefügt (der Überstand wurde vorher abgenommen). In die übrigen 6 Wells wurden die Medikamente in verschiedenen Konzentrationen zum Teil als Einzelsubstanz (4 Wells) und als Kombinationen (2 Wells) in einem weiteren Milliliter ausplattiert. Nur bei den Medikamentenkombinationen wurde der Überstand vorher abpipetiert; in die Wells, die Einzelsubstanzen erhalten sollten, wurde das Medikament in doppelter Konzentration zu dem schon vorhandenem Milliliter Medium beigelegt.

Nach 2 (BG1) bzw. 3 (Skov3) Tagen Inkubation unter Standardbedingungen im Brutschrank wurden die Zellen geerntet und mit Ethanol fixiert.

Die Fixierung konnte unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Da auch die toten Zellen im Überstand mit ausgewertet werden sollten, wurde der Überstand als erstes abgenommen und in ein Facsröhrchen gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand bei 4°C aufbewahrt. Zum Ablösen der Zellen wurden nun 500µl Trypsin in jedes Well gegeben und etwa 2 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 1 ml Medium pro Well gestoppt. Mit Hilfe eines Zellscrabbers konnten nun die Zellen vom Boden des Wells gelöst werden und zu dem vorher schon abpipetierten Überstand dazugegeben werden.

Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 400g wurden die Zellen in Waschpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und die Zellen nun mit 3 ml eiskaltem Ethanol (70%ig) fixiert. Die Zugabe des Ethanol erfolgte tropfenweise mit einer Pasteurpipette. Um die Verklumpung der Zellen zu minimieren, wurde während der gesamten Zugabe von Ethanol gevortext.

Bei 4°C können die so fixierten Zellen einen Monat gelagert werden, mindestens 12 Stunden sollten vor der Messung jedoch vergehen.

Vor der Messung am FACS mussten die ethanolfixierten Zellen zunächst noch einmal zentrifugiert (400g, 5 Minuten), in Waschpuffer unter vortexen resuspendiert und nochmals zentrifugiert werden. Nach Abnahme dieses Überstandes erfolgte die Zugabe von 100µl RNase Stammlösung pro FACS-Röhrchen. Daraufhin wurde 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die vorhandene RNA sollte dadurch zerstört werden, so dass sich das später beigefügte Propidiumiodid nur an die DNA der Zellen anlagert.

Zur Färbung mit Propidiumiodid wurden 10µl der Substanz sowie 1ml Waschpuffer pro FACS-Röhrchen verwendet. Die Inkubationszeit betrug auch hier 30 Minuten. Da Propidiumiodid jedoch lichtempfindlich ist, fand sie im Dunkeln statt.

Danach konnte die Analyse der Proben am FACS durchgeführt werden. Der Versuch wurde pro Zellreihe 6-mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### 2.2.8 Apoptoseinduktionsassay

Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde der Annexin-Test durchgeführt.

Apoptotische Zellen verlagern zu Anfang der Apoptose das Plasmaprotein Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran. Annexin 5 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiges Phospholipid bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin besitzt. Annexin kann somit als Marker für apoptotische Zellen fungieren.

Da jedoch auch nekrotische Zellen durch den Verlust von Membranintegrität von Annexin als Phosphatidylserin positiv erkannt werden, müssen diese durch eine zusätzliche „Markierung“ differenziert werden. Hierfür wird Propidiumiodid verwendet. Propidiumiodid markiert nur die DNA von Zellen mit durchlässiger Zellmembran. Da es sich hier um lebende (d.h. nicht fixierte) Zellen handelt, entsprechen Propidiumiodid positive Zellen den nekrotischen Zellen.

Folgende Situationen sind also möglich:

	Propidiumiodid +	Propidiumiodid -
Annexin +	nekrotische Zellen	apoptotische Zellen
Annexin -	Zelltrümmer*	vitale Zellen

Tabelle 2-1: Mögliche Ergebnisse beim Apoptoseinduktionsassay mit Annexin V und Propidiumiodid.

\* sehr kleine Population von mechanisch zerstörten Zellen (z.B. durch Zentrifugation), die große Teile ihrer Plasmamembran verloren haben oder isolierte Zellkerne

Zur Durchführung des Versuchs wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen/1ml in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 12 Stunden erfolgte die Zugabe der Medikamente in einem weiteren Milliliter Medium in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen. Pro Zellreihe wurden 7 Wells ausplattiert. Eines davon diente der Kontrolle, statt Medikamenten wurde hier je 1 ml Medium mit Medikamentenlösungsmittel (DMSO und H<sub>2</sub>O) dazugegeben. Von den verbleibenden 6 Wells wurden pro Medikament 2 verschiedene Konzentrationen ausplattiert. In die letzten 2 Wells wurde von beiden Medikamenten je 1ml gegeben. Dabei wurden die vorher verwendeten Konzentrationen unterschiedlich kombiniert.

2 Tage später wurden die Zellen geerntet. Dabei war es von besonderer Wichtigkeit, dass das Ablösen der adhären wachsenden Zellen möglichst behutsam geschah und die Zellen keinen Scheerkräften ausgesetzt wurden. Dadurch würden sehr viele falsch positive (nekrotische / apoptotische) Zellen entstehen.

Zur Vermeidung von Scheerkräften wurde ausschließlich mit Pasteurpipetten gearbeitet. Des Weiteren wurde auf ein Lösen der Zellen durch Scrabben zugunsten einer langen Trypsinierungsphase komplett verzichtet. Die Trypsinierung (500µl/Well) erfolgte außerdem bei 37°C, da hier das Temperaturoptimum des Trypsins liegt.

Nach 25 Minuten Trypsinierung wurde mikroskopisch geprüft, ob sich die Zellen vom Boden gelöst hatten. Gegebenenfalls wurde die Trypsinierungszeit etwas verlängert.

Danach wurde die Wirkung des Trypsins wie gewohnt mit Medium gestoppt. Mit der Pasteurpipette wurde nun die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. In dieses war zu Beginn schon der Überstand aus dem entsprechenden Well pipettiert worden; die Lagerung erfolgte zwischenzeitlich aufgrund der langen Trypsinierung bei 4°C.

Nach nochmaliger mikroskopischer Überprüfung, ob alle Zellen abgelöst wurden (ggf. wurde mit Medium nachgespült), wurden die Zellen 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nun wurden pro Probe 48µl Inkubationspuffer, 1µl Annexin und 1µl Propidiumiodid hinzugefügt und bei Raumtemperatur in Dunkelheit 15 Minuten inkubiert. Danach wurden zur Vergrößerung des Volumens nochmals 500µl Inkubationspuffer

dazugegeben und die Analyse am FACS durchgeführt. Der Versuch wurde pro Zellreihe 6 mal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **2.2.9 Versuche zur Hemmbarkeit von Multi Drug Resistance Proteinen**

Zur Untersuchung der Effekte von Lonafarnib und Carboplatin auf Multi-Drug-Resistance-Proteine der Ovarialkarzinomzellen wurde der Farbstoff Daunorubicin verwendet, da diese Substanz ein Substrat für Multi-Drug-Resistance Proteine wie P-Glycoproteine und MRP 1&2 darstellt. Sollten auch Lonafarnib und Carboplatin Substrate dieser Pumpen sein, so würde die gleichzeitige Exposition der Zellen mit Daunorubicin und Lonafarnib und / oder Carboplatin zu einer stärkeren Akkumulation sowohl von Medikamenten als auch von Farbstoffen führen, da ein kompetitiver Antagonismus stattfände. Die Menge des Farbstoffes galt somit als Maß für eine Akkumulation der Medikamente und wurde am FACS bestimmt.

#### **2.2.9.1 Vorversuche zur Validierung der Methode**

##### **Influx**

Zunächst wurde die reine Akkumulation des Daunorubicins bestimmt. Hierzu wurden  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen in 1ml Medium pro Well in 6 Wellplatten ausgesät und 24 Stunden adhären gelassen. Danach wurde Daunorubicin ( $1\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und zu den Zeitpunkten 0 – 15 – 30 – 45 – 60 ausgewertet. Für die Auswertung wurde zunächst der Überstand entfernt und das Well mit 1ml PBS gespült. Zum Lösen der Zellen wurde mit  $500\mu\text{l}$  Trypsin 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert ( $200g$ , 4 min) und das Pellet in  $500\mu\text{l}$  eiskaltem PBS wieder aufgenommen. Bis zur Messung erfolgte die Lagerung auf Eis und in Dunkelheit. Die Messung erfolgte am FACS (488 nm Excitation, 530nm Emission, 570 Bandfilter).

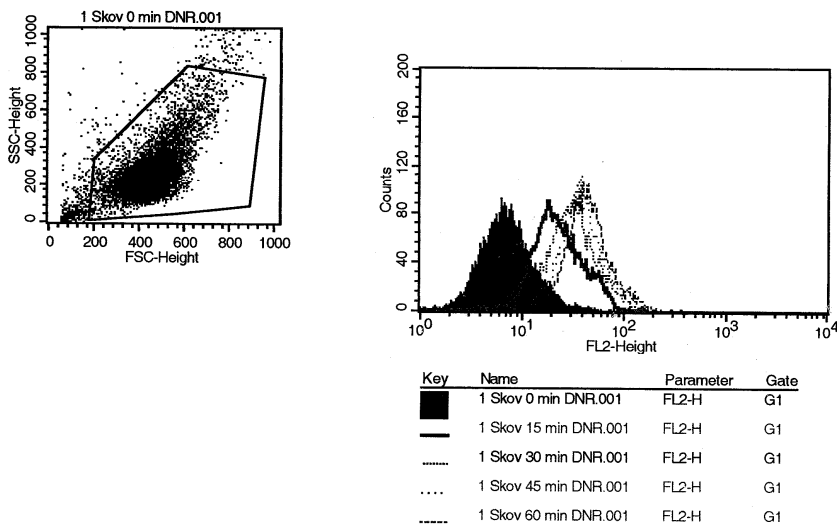


Abb. 2-3: Exemplarisches Beispiel für einen Influx mit Skov-3 und Daunorubicin. Längere Inkubationszeit führt zu einer stärkeren Akkumulation.

Da die Akkumulation bei 60 min am stärksten und für einen gut sichtbaren Effekt ausreichend war, wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 60 Minuten festgelegt.

### Efflux

Im Weiteren wurde untersucht, ob die Zellen die aufgenommene Substanz (Daunorubicin) unter Umgebung von reinem Medium auch wieder hinauspumpen. Hierzu wurden im Unterschied zum reinen Influx nach 60 Minuten Inkubation die Überstände, die den Farbstoff enthielten, entfernt, 2 mal mit je 1ml mit PBS (eiskalt) gespült und 1ml reines Medium hinzugefügt. Von diesem Zeitpunkt aus gesehen (Start des Effluxes) erfolgte die Auswertung zu den Zeitpunkten 0 – 15 – 30 – 45 – 60 – 80 – 90 Minuten

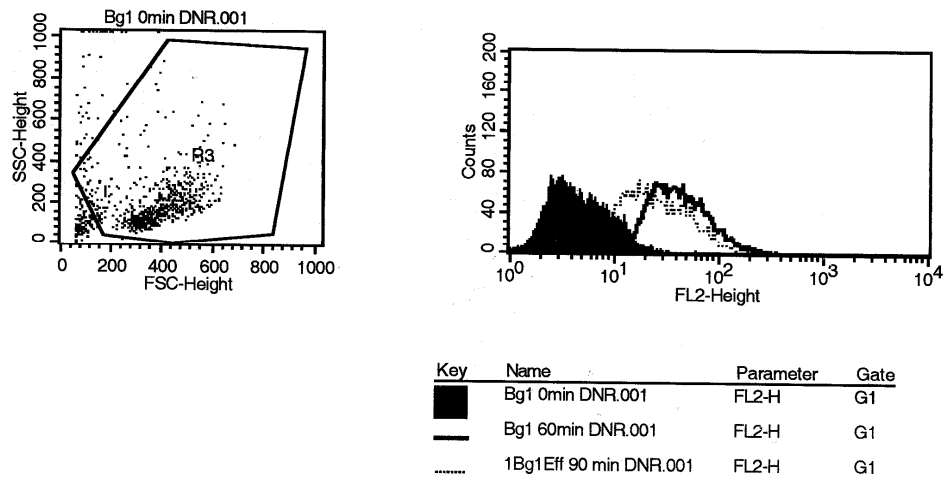


Abb. 2-4: Beispiel für einen Effluxversuch mit BG1 und Daunorubicin. Zur besseren Übersicht ist nur der 60 und 90 Minutenwert dargestellt, sowie ein Kontrollwert nach „0-Minuten-Influx“. Eine längere Effluxzeit korreliert negativ mit der Anreicherung von Daunorubicin. Der 0-Minutenwert entspricht dem Wert einer 60 minütigen Inkubation

### 2.2.9.2 Akkumulationsversuche mit Daunorubicin, Lonafarnib und Carboplatin

Im Weiteren wurde nun das In- und Effluxverhalten von Daunorubicin unter Anwesenheit von Lonafarnib (0,1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M) sowie Carboplatin (10 $\mu$ M) untersucht. Als Positivkontrolle (=erfolgte Akkumulation, Hemmung der MDR) wurde Benzylisothiocyanat (100nM, gelöst in Ethanol) verwendet. Da Benzylisothiocyanat auf die Zellen eine toxische Wirkung hatte, wurde eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (1 $\mu$ l / FACS-Röhrchen, Inkubation: 10-30min auf Eis und in Dunkelheit) durchgeführt, so dass die toten Zellen, die den Farbstoff aufgrund mangelnder Membranintegrität nicht speichern können, bei der Messung am FACS herausgeatet werden konnten. Das Ernten und Auswerten entspricht dem bei Influx und Efflux beschriebenen Methoden. Letztendlich wurde die Akkumulation nach 60 min Inkubation mit allen Substanzen bestimmt. Der Versuch wurde pro Zellreihe 3-mal durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Proliferationsassays

##### 3.1.1 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Carboplatin und Lonafarnib auf SKOV-3 und BG1-Zellen

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Carboplatin und Lonafarnib auf die Vermehrung der Zellen wurden gleich bestückte Platten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgewertet.

Der Versuch wurde 3-mal pro Zellreihe durchgeführt. In den Abbildungen sind die Mittelwerte aus den drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten gezeigt. Die Wachstumshemmung wurde prozentual von der als 100% angenommenen Kontrolle ermittelt.

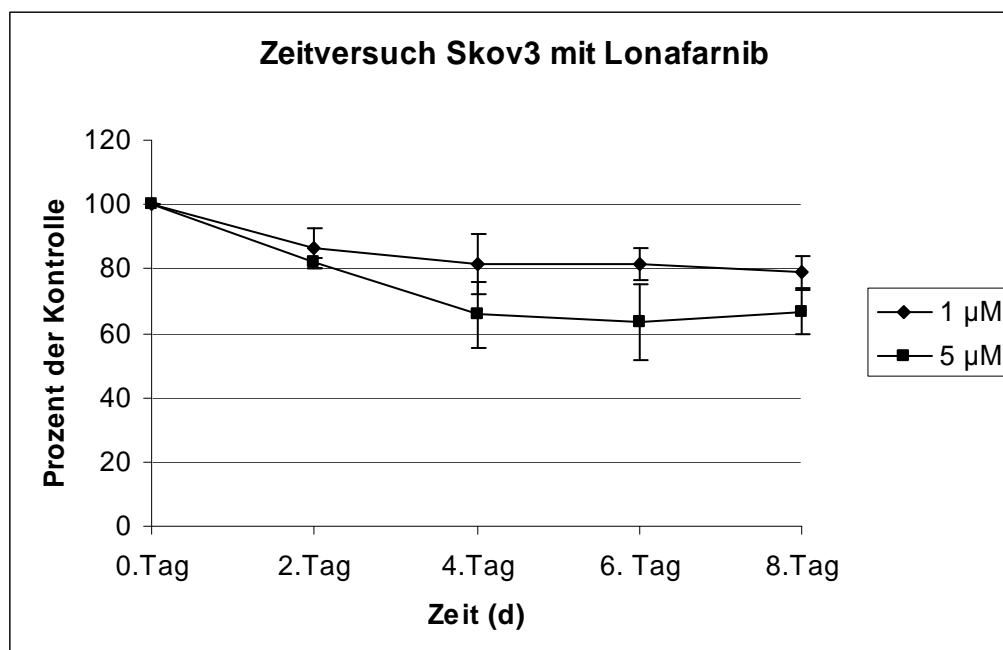


Abb. 3-1: Unterschiedliche Wachstumshemmung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung bei der Zellreihe Skov3. Repräsentativ gezeigt sind eine höhere und eine niedrigere Konzentration. Die Balken stellen, wie bei allen weiteren Abbildungen auch, die Standardabweichung dar.

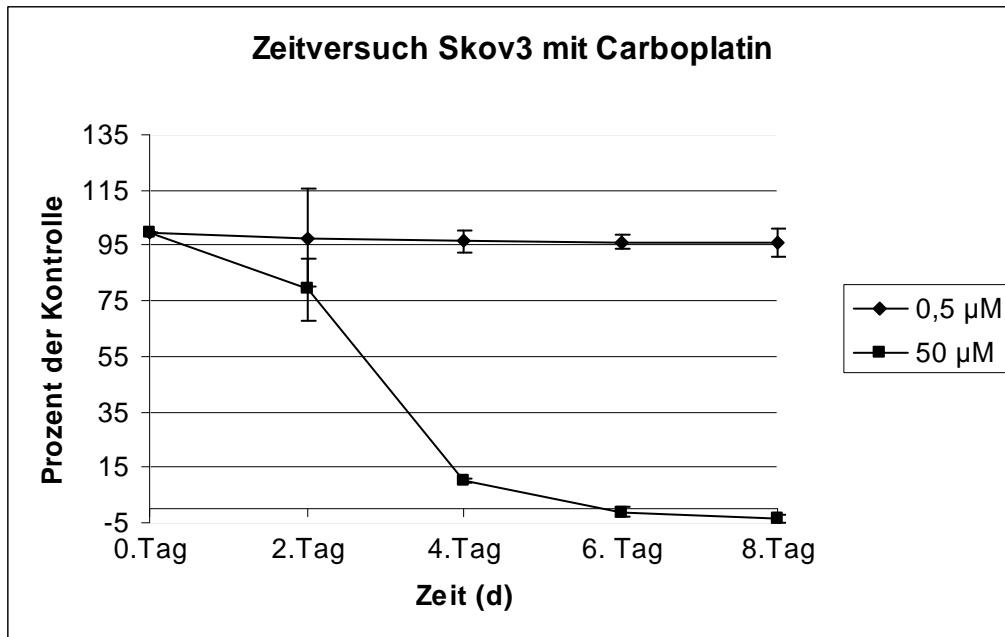


Abb. 3-2: Zeitabhängigkeit der Wachstumshemmung bei mit Carboplatin behandelten Skov3-Zellen. Repräsentativ gezeigt ist die höchste und niedrigste Konzentration.

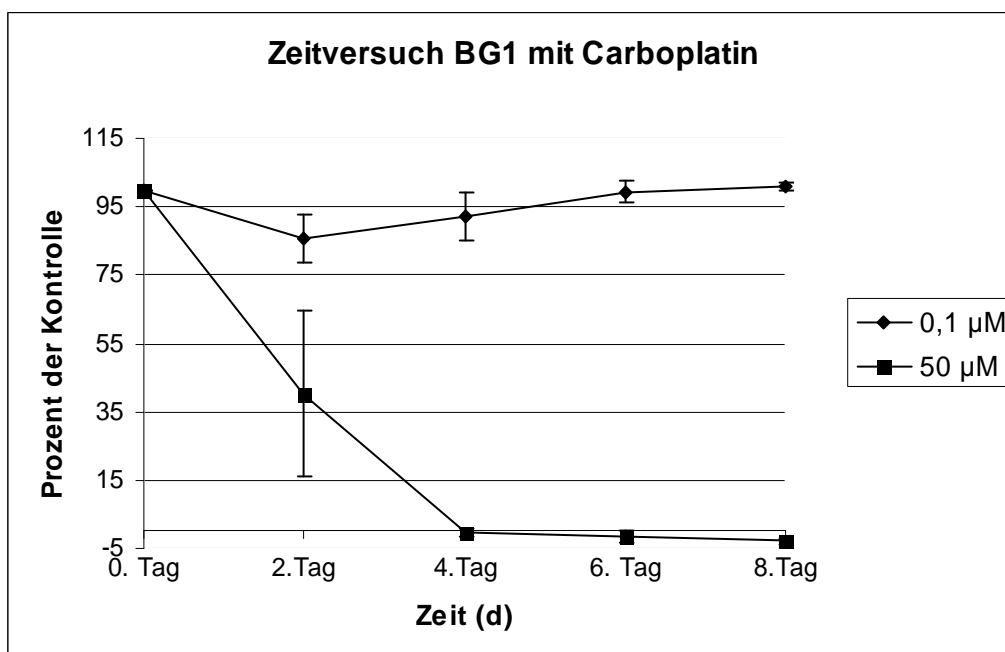


Abb. 3-3: Zeitabhängigkeit der Wachstumshemmung bei mit Carboplatin behandelten BG1-Zellen. Repräsentativ gezeigt sind eine hohe und eine niedrige Konzentration. Bei der niedrigen Konzentration ist keine Verbesserung der Wachstumshemmung nach dem 2. Tag zu erkennen.



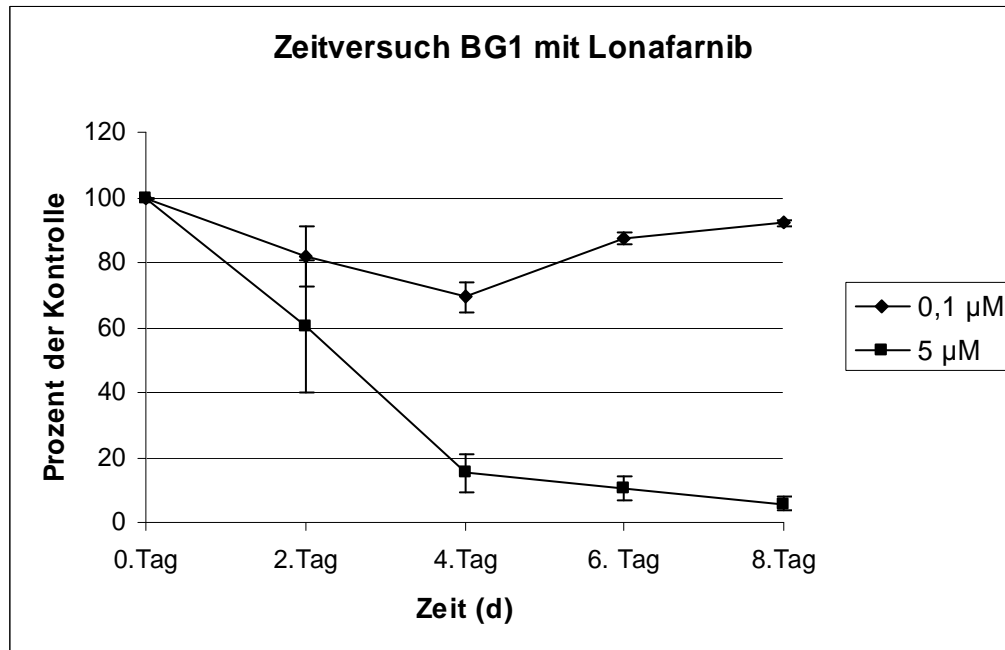


Abb. 3-4: Zeitabhängigkeit der Wachstumshemmung bei mit Lonafarnib behandelten BG1-Zellen. Nach dem 4. Tag lässt sich bei der niedrigen Konzentration keine Verbesserung der Wachstumshemmung feststellen.

Bei beiden Zellreihen zeigt sich, sowohl bei Behandlung mit Carboplatin als auch mit Lonafarnib, über das breit verteilte Feld der gewählten Konzentrationen keine wesentliche Verbesserung der Wachstumshemmung nach dem 4. Tag.

Somit wurde, da hier die Hemmung des Zellwachstums über das breite Spektrum der gewählten Konzentrationen am besten war, der 4. Tag für die Auswertung der folgenden Proliferationsassays gewählt.

Des Weiteren deutet sich hier an, dass die Zellreihe Skov3 etwas weniger sensibel auf beide Medikamente reagiert als BG1.

### 3.1.2 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wachstumshemmender Effekte von Carboplatin und Lonafarnib auf BG1 und Skov3

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von wachstumshemmenden Effekten wurde Carboplatin bzw. Lonafarnib in ansteigender Konzentration auf die Zellen gegeben.

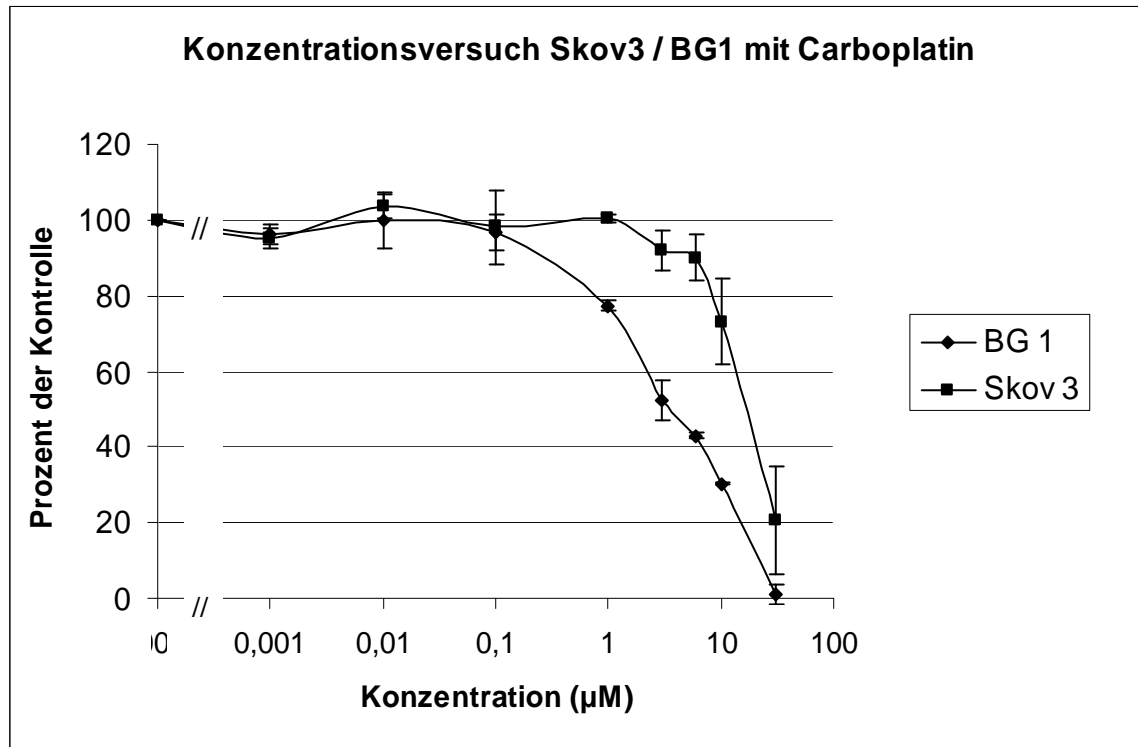


Abb. 3-5: Konzentrationsabhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Carboplatin auf BG1 und Skov3- Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine im T-Test signifikante Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle ergab sich bei BG1 ab  $1\mu\text{M}$ , bei Skov 3 ab  $3\mu\text{M}$  Carboplatin. 50% Wachstumshemmung konnte bei der Zellreihe BG1 ab einer Carboplatinkonzentration von  $3,8\mu\text{M}$  erreicht werden. Skov3-Zellen hingegen wurden erst ab einer Konzentration von  $18,8\mu\text{M}$  zu 50% im Wachstum gehemmt.

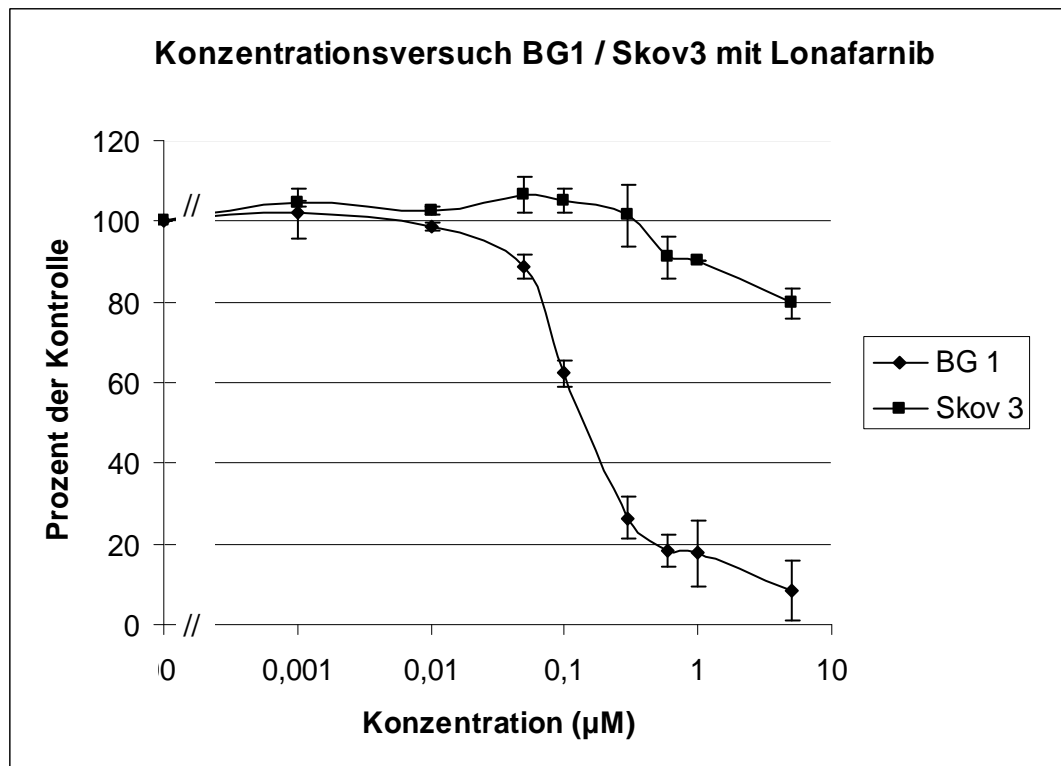


Abb. 3-6: Konzentrationsabhängigkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Lonafarnib auf BG1 und Skov3- Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Werte im T-Test ergaben sich bei beiden Zellreihen ab 0,05µM Lonafarnib. Mehr als 50% Wachstumshemmung wurde bei der Zellreihe BG1 ab einer Konzentration von 0,17µM erreicht. Bei Skov 3 wurde mit der am höchsten eingesetzten Konzentration von 5µM nur eine Wachstumshemmung von 20,4% erreicht.

Die Berechnung der Konzentrationen, bei denen eine 50%ige Wachstumshemmung resultiert, ergab folgende Ergebnisse:

IC50 (µM)	Carboplatin	Lonafarnib
BG1	3,8	0,17
Skov3	18,8	--

Tabelle 3-1: linear berechnete IC 50 – Werte, mit Lonafarnib wurde diese Wachstumshemmung bei Skov3 nicht erreicht.

Die Signifikanztestung mittels T-Test ergab die folgenden Ergebnisse:

Signifikante Werte ( $p < 0,05$ )	Carboplatin	Lonafarnib
BG1	1	0,05
Skov3	3	0,05

Tabelle 3-2: ab der angegebenen verwendeten Konzentration ( $\mu\text{M}$ ) ergaben sich signifikante Werte im T-Test.

In beiden Diagrammen ist zu sehen, dass ab einer für beide Zellreihen unterschiedlichen Konzentration die Hemmung des Zellwachstums positiv mit der Konzentration des jeweiligen Medikaments korreliert. Signifikante Wachstumshemmung wird bei BG1 ab einer Konzentration von  $0,05\mu\text{M}$  Lonafarnib bzw.  $1\mu\text{M}$  Carboplatin erreicht. Skov3 zeigt eine signifikante Hemmung ab  $0,05\mu\text{M}$  Lonafarnib und  $3\mu\text{M}$  Carboplatin. Wie sich schon in den Experimenten der Zeitabhängigkeit andeutete, ist die zur 50 %igen Wachstumshemmung erforderliche Medikamentenkonzentration bei der Zellreihe Skov3 höher als bei der Zellreihe BG1. 50% Wachstumshemmung wird mit Carboplatin bei BG1 mit einer Konzentration von  $3,8\mu\text{M}$  erreicht, während die 50% Marke bei Skov3 erst bei Konzentrationen von  $18,8\mu\text{M}$  überschritten wird. Bei der Behandlung von Skov3-Zellen mit Lonafarnib reichen die gewählten Konzentrationen nicht aus, um eine Wachstumshemmung von 50% oder mehr zu erreichen. Der beste cytostatische Effekt wird mit der höchsten verwendeten Konzentration von  $5\mu\text{M}$  erreicht, das Wachstum beträgt hier jedoch noch 79,6% von der Kontrolle.

Die Zellreihe BG1 reagiert auch auf Lonafarnib empfindlicher als Skov3. Mehr als 50% Hemmung wird mit Konzentrationen, die größer als  $0,17\mu\text{M}$  sind, erreicht. Die maximale Hemmung wird mit  $5\mu\text{M}$  Lonafarnib erzielt, das Wachstum beträgt noch 8,3% der Kontrolle.

### **3.1.3 Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib in der Wachstumshemmung von BG1- und Skov3- Zellen**

Zur Untersuchung synergistischer Effekte der beiden verwendeten Medikamente wurden 3 Mikrotiterplatten mit einem Medikament in ansteigender Konzentration und

mit dem entsprechend anderen Medikament in fester Konzentration behandelt. Bei der 4. Platte wurde nur das in ansteigender Konzentration ausplattierte Medikament verwendet, so dass zwischen Einzelwirkung und gemeinsamer Medikamentenwirkung unterschieden werden konnte. Außerdem wurde auf jeder Platte, die 2 Medikamente enthielt, neben der üblichen Kontrolle mit den Lösungsmitteln der Medikamente, eine weitere Kontrolle, die nur das auf dieser Platte in fester Konzentration verwendete Medikament enthielt, ausplattiert.

### 3.1.4 Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib in der Wachstumshemmung von BG1- und Skov3-Zellen

#### 3.1.4.1 Synergismusversuche mit BG1

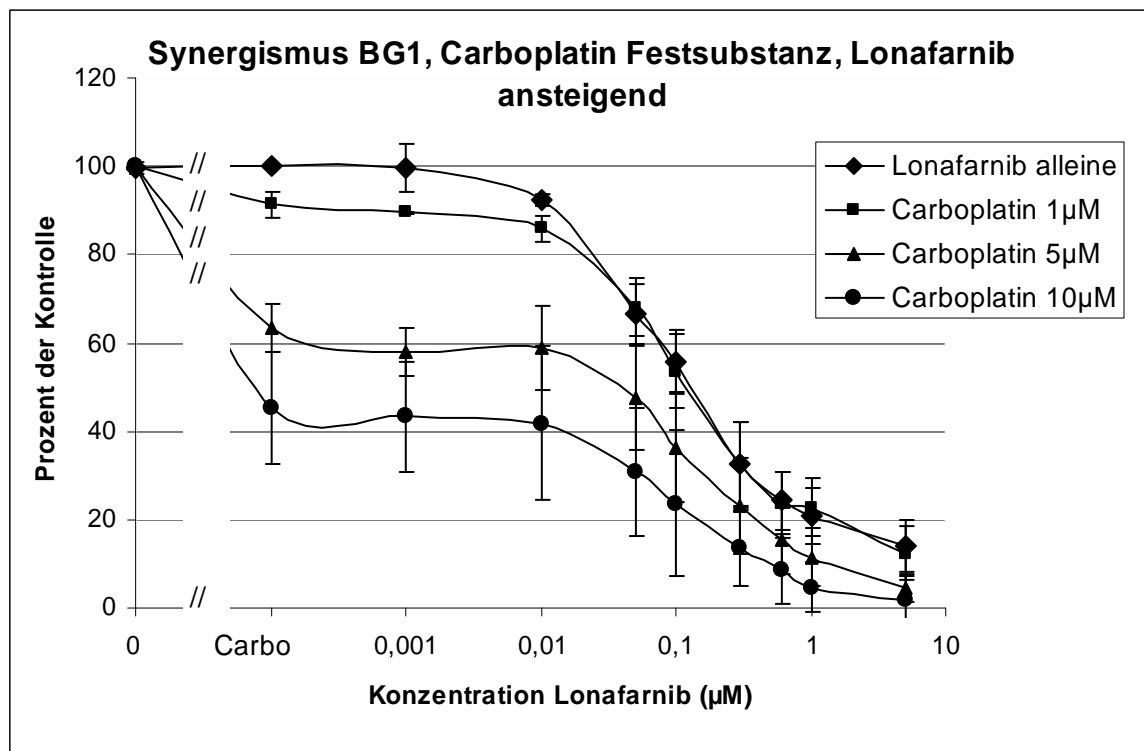


Abb. 3-7 Zusammenstellung von 4 mit BG1 Zellen bestückten 96-Wellplatten aus 2 unabhängigen Versuchen. Die erste wurde nur mit Lonafarnib in ansteigender Konzentration behandelt. Bei den weiteren drei Platten wurde Carboplatin in einer festen Konzentration pro Platte zusätzlich zu Lonafarnib verwendet.

Die Signifikanztestung mittels T-Test für die unter Abb. 3-7 zusammengefassten Experimente mit BG1 ergab folgende Ergebnisse:

Carboplatin ( $\mu\text{M}$ )	0 (Lonafarnib alleine)	1	5	10
Lonafarnib ( $\mu\text{M}$ )	(0,05)	0,05	0,05	0,05

Tabelle 3-3: Benötigte Mindestkonzentration von Lonafarnib zur Erzielung einer signifikanten Wachstumshemmung ( $p < 0,05$ ) gegenüber der alleinigen Anwendung von Carboplatin bzw. gegenüber der Kontrolle. Alle höheren Konzentrationen waren signifikant.

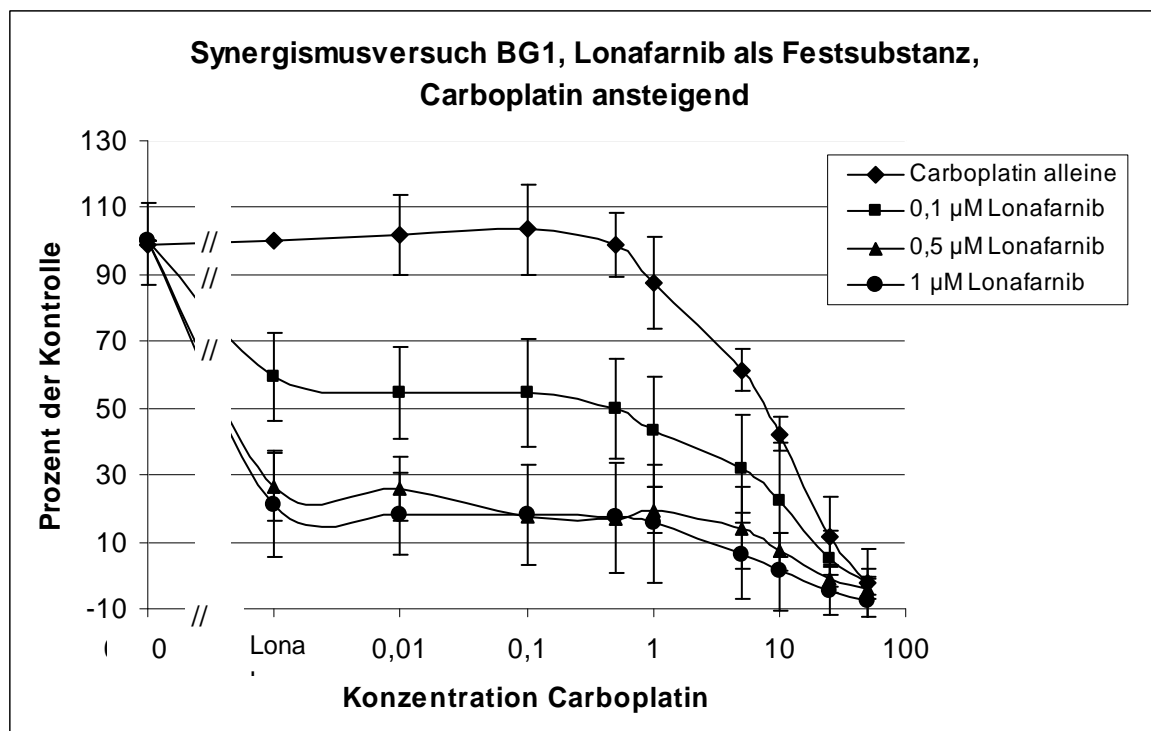


Abb. 3-8: Zusammenstellung von 4 mit BG1 Zellen bestückten 96-Wellplatten. Die erste wurde nur mit Carboplatin in ansteigender Konzentration behandelt. Bei den weiteren drei Platten wurde Lonafarnib in einer festen Konzentration pro Platte zusätzlich zu Carboplatin verwendet.

Die Signifikanztestung mittels T-Test für die unter Abb. 3-8 zusammengefassten Experimente mit BG1 ergab folgende Ergebnisse:

<b>Lonafarnib (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>0 (Carboplatin alleine)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>
<b>Carboplatin (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	(5)	5	0,1	5

Tabelle 3-4: Benötigte Mindestkonzentration von Carboplatin zur Erzielung einer signifikanten Wachstumshemmung ( $p < 0,05$ ) gegenüber der alleinigen Anwendung von Lonafarnib bzw. gegenüber der Kontrolle. Alle höheren Konzentrationen waren signifikant.

Bei Vergleich von Abb. 3-7 und Abb. 3-8, die die Zusammenstellung der mit BG1-Zellen durchgeführten Experimente darstellen, ist zunächst erkennbar, dass die Zellen auf die Behandlung mit Lonafarnib sehr viel besser ansprechen, als bei Exposition zu Carboplatin. Dies fällt zum einen in Abb. 3-7 auf: Die Kurve der Platte, die mit  $1 \mu\text{M}$  Carboplatin (und Lonafarnib) behandelt wurde zeigt einen fast komplett gleichen Verlauf wie die Kurve der Platte, die nur mit Lonafarnib behandelt worden ist. Dies bestätigt sich auch in Abb. 3-8: Die nur mit der Festsubstanz Carboplatin behandelte Platte zeigt erst in sehr hohen Konzentrationen einen Abfall.

Grundvoraussetzung für synergistische Effekte ist zum einen, dass die betrachtete Kurve mehr Wachstumshemmung zeigen, als die mit nur der Substanz ansteigender Konzentration behandelte Platte. Zum anderen müsste die Wachstumshemmung größer sein als die nur durch die Festsubstanz hervorgerufene Hemmung. Dies ist ersichtlich in Abb. 3-7: Bei Behandlung mit  $1$ ,  $5$  und  $10 \mu\text{M}$  Carboplatin beginnt die Wachstumshemmung ab  $0,05 \mu\text{M}$  Lonafarnib unter die jeweils von Carboplatin alleine hervorgerufene Hemmung zu sinken; ab diesem Wert ist die Wachstumshemmung auch signifikant.

In Abb. 3-8 bzw. Tabelle 3-4 ist ein signifikanter Effekt bei einer Lonafarnib Festsubstanzkonzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  und einer Carboplatinkonzentration ab  $5 \mu\text{M}$  zu verzeichnen. Bei Verwendung von  $0,5 \mu\text{M}$  Lonafarnib als Festsubstanz beginnen signifikante Effekte schon ab einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  Carboplatin. Eine signifikante Hemmung gegenüber der alleinigen Lonafarnibanwendung ergibt sich bei  $1 \mu\text{M}$  Lonafarnib erst bei  $5 \mu\text{M}$  Carboplatin. Durch berechnete Interaktionsindex belegbare synergistische Effekte waren bei einigen Konzentrationen nachweisbar; siehe Tabelle 3-7.

### 3.1.4.2 Synergismusversuche mit Skov3

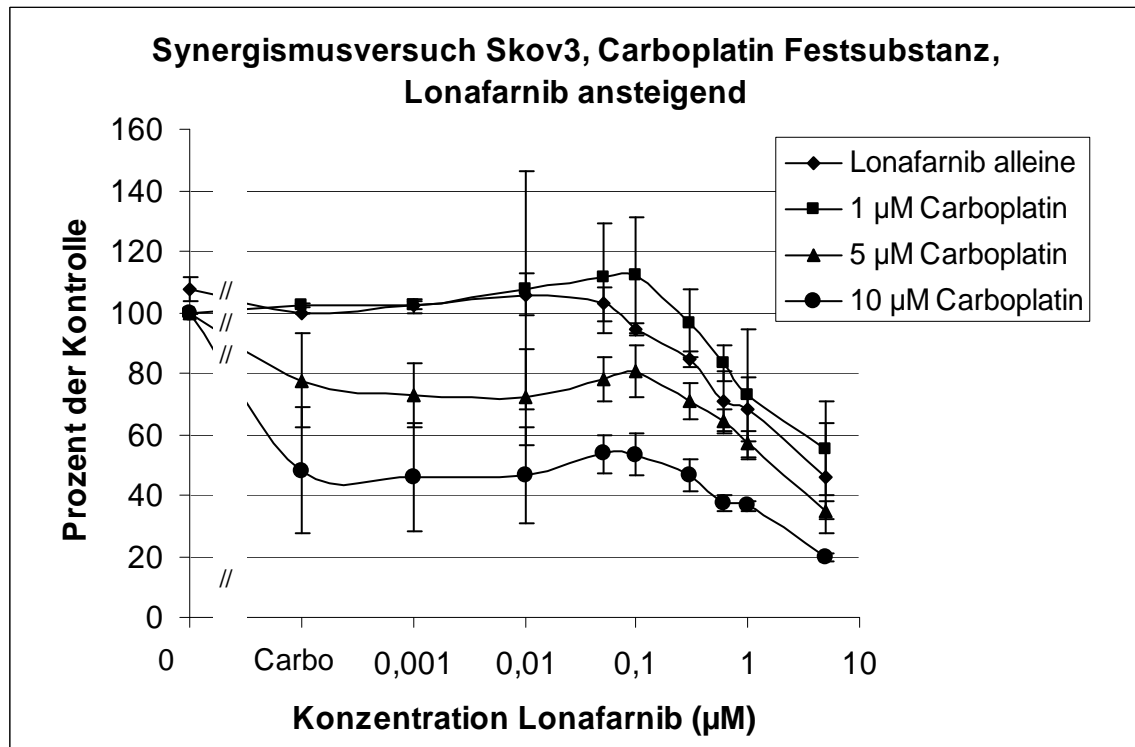


Abb. 3-9: Zusammenstellung von 4 mit Skov3- Zellen bestückten 96-Wellplatten. Die erste wurde nur mit Lonafarnib in ansteigender Konzentration behandelt. Bei den weiteren drei Platten wurde Carboplatin in einer festen Konzentration pro Platte zusätzlich zu Lonafarnib verwendet.

Die Signifikanztestung mittels T-Test für die unter Abb. 3-9 zusammengefassten Experimente mit Skov3 ergab folgende Ergebnisse:

Carboplatin (µM)	0 (Lonafarnib alleine)	1	5	10
Lonafarnib (µM)	(0,1)	0,6	0,6	0,6

Tabelle 3-5: Benötigte Mindestkonzentration von Lonafarnib zur Erzielung einer signifikanten Wachstumshemmung ( $p < 0,05$ ) gegenüber der alleinigen Anwendung von Carboplatin bzw. gegenüber der Kontrolle.



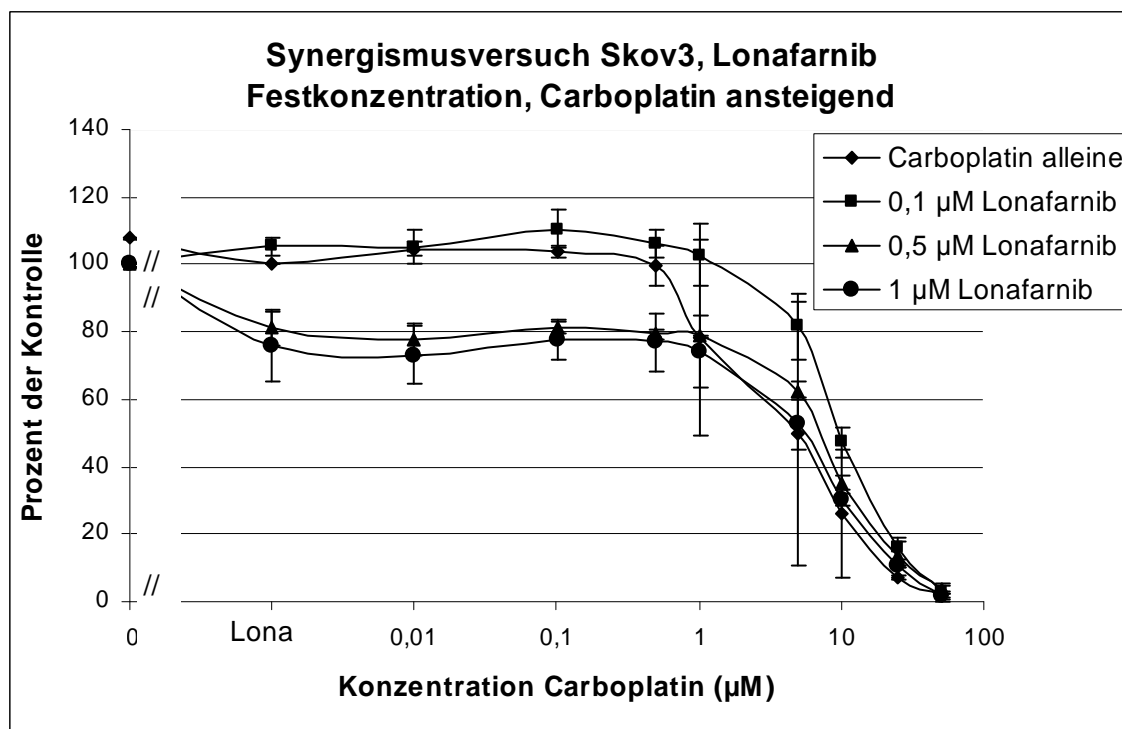


Abb. 3-10: Zusammenstellung von 4 mit Skov3 Zellen bestückten 96-Wellplatten. Die erste wurde nur mit Carboplatin in ansteigender Konzentration behandelt. Bei den weiteren drei Platten wurde Lonafarnib in einer festen Konzentration pro Platte zusätzlich zu Carboplatin verwendet.

Die Signifikanztestung mittels T-Test für Skov3 ergab folgende Ergebnisse:

Lonafarnib (µM)	0 (Carboplatin alleine)	0,1	0,5	1
Carboplatin (µM)	(0,5)	5	5	5

Tabelle 3-6: Benötigte Mindestkonzentration von Carboplatin zur Erzielung einer signifikanten Wachstumshemmung ( $p < 0,05$ ) gegenüber der alleinigen Anwendung von Lonafarnib bzw. gegenüber der Kontrolle.

Bei der Zellreihe Skov3 ist in Abb. 3-9 zunächst auffällig, dass bei Verwendung von 1µM Carboplatin als Festsubstanz (und Lonafarnib in ansteigender Konzentration) weniger Wachstumshemmung erzielt wird als bei alleiniger Verwendung von Lonafarnib. Signifikante Wachstumshemmungen liegen, wie aus Tabelle 3-5 ersichtlich, ohne Verwendung von Carboplatin ab einer Lonafarnibkonzentration von 0,1µM und bei Verwendung von 1µM Carboplatin ab 0,6µM Lonafarnib vor.

Die höher dosierten Carboplatinfestsubstanzen (5- und 10µM) in Verbindung mit Lonafarnib zeigen mehr Wachstumshemmung als bei Verwendung von Lonafarnib als

Einzelsubstanz, wie aus dem Kurvenverlauf unterhalb der Kurve ohne Carboplatin abzuleiten ist.

Signifikante Effekte gegenüber alleiniger Behandlung mit Carboplatin finden sich jeweils ab 0,6µM.

Auch in Abb. 3-10, bei Verwendung von Lonafarnib als Fest- und Carboplatin in ansteigender Konzentration, ist zu sehen, dass bei nur geringer Konzentration von Lonafarnib (0,1µM) und Carboplatin in ansteigender Konzentration weniger Wachstumshemmung vorliegt, als bei alleiniger Verwendung von Carboplatin.

Die Graphen der höher dosierten Festsubstanzen (0,5 und 1µM) verlaufen zunächst unterhalb des ohne Lonafarnib geführten Graphen. Bei den höheren Konzentrationen von Carboplatin ist der Verlauf der einzelnen Kurven sehr dicht beieinander.

Signifikante Wachstumshemmung gegenüber der jeweiligen Einzelwirkung von Lonafarnib werden entsprechend Tabelle 3-6 bei den Kombinationen ab 5 µM Lonafarnib erreicht. Die alleinige Carboplatinverwendung führt gegenüber der unbehandelten Kontrolle schon ab 0,5 µM Carboplatin zu einer signifikanten Wachstumshemmung.

Die Berechnung der Interaktionsindex ergab für einige Konzentrationen einen Synergismus bzw. additive Effekte. Siehe hierzu Tabelle 3-8.

### **3.1.4.3 Berechnung synergistischer Effekte mittels Interaktionsindex**

Zur genaueren Untersuchung auf synergistische Effekte wurde der Interaktionsindex nach folgender Formel berechnet:

$$y = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

y = Interaktionsindex, y < 1: Synergismus ; y = 1: Additiver Effekt ; y > 1: Antagonismus

a bzw. b = für definierten Effekt benötigte Medikamentenkonzentration in Kombination  
A bzw. B = für definierten Effekt benötigte Medikamentenkonzentration bei alleiniger Anwendung

Für BG1 konnte bei Kombination von Carboplatin und Lonafarnib in den folgenden Konzentrationen ein Interaktionsindex  $< 1$  errechnet werden:

<b>Lonafarnib (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Carboplatin 5<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Carboplatin 10<math>\mu\text{M}</math></b>
<b>0,05</b>	<i>0,87</i>	<i>0,78</i>
<b>0,10</b>	<i>0,76</i>	<i>0,68</i>
<b>0,30</b>	<i>0,66</i>	<i>0,47</i>
<b>0,60</b>	<i>0,35</i>	<i>0,40</i>
<b>1,00</b>	<i>0,35</i>	<i>0,36</i>

Tabelle 3-7: BG1-Interaktionsindexe, die einen Synergismus ergeben. **Fettgedruckt:** verwendete Konzentration des entsprechenden Medikamentes, *kursiv:* errechnete Interaktionsindexe

Die Berechnung der Interaktionsindexe für Skov 3 ergab folgende Ergebnisse:

<b>Lonafarnib (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Carboplatin 5<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Carboplatin 10<math>\mu\text{M}</math></b>
<b>0,3</b>	---	<i>1,16</i>
<b>0,6</b>	<i>1,09</i>	<i>1</i>
<b>1</b>	<i>0,97</i>	<i>1,03</i>
<b>5</b>	<i>0,41</i>	<i>0,52</i>

Tabelle 3-8: Skov-3 Interaktionsindexe. Berechnet wurden die Werte durch Ermittlung von benötigten Konzentrationen in Kombinationsanwendung sowie für den gleichen Effekt erforderliche Einzelanwendungen von Lonafarnib bzw. Carboplatin.

## 3.2 Zellzyklusanalysen durch DNA Quantifizierung mittels

### Propidiumiodid

Die Zellzyklusanalyse wurde durchgeführt, um die bisherigen Beobachtungen bei den Proliferationsassays genauer zu spezifizieren und die Effekte der Substanzen auf den Zellzyklus zu untersuchen.

Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und macht diese so einem quantitativen Nachweis zugänglich.

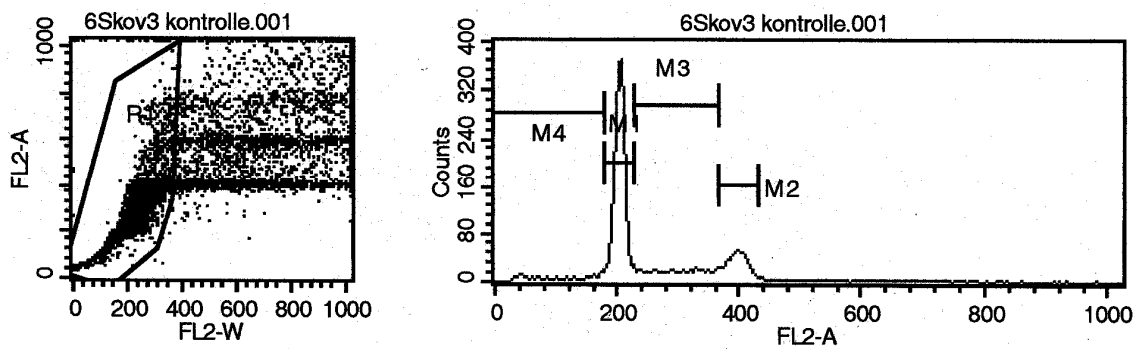


Abb. 3-11 Beispiel einer Zellzyklusanalyse mit Skov3, unbehandelte Kontrolle. M1 entspricht den Zellen in der G0/G1 Phase, M2/M3 der G2/M-Phase und M4 den nekrotischen und apoptotischen Zellen.

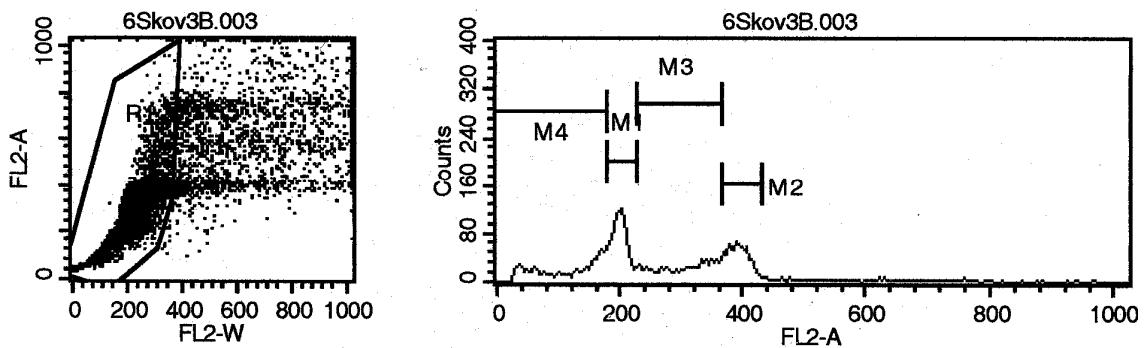


Abb. 3-12: Beispiel für eine Zellzyklusanalyse von mit 10 $\mu$ M Carboplatin behandelten Skov3 Zellen. Es befinden sich weniger Zellen in der G0/G1-Phase. Der Anteil der apoptotisch- und nekrotischen Zellen hat gegenüber der Kontrolle zugenommen.

### 3.2.1 Zellzyklusanalyse BG1

Die Zusammenstellung von 3 Zellzyklusanalysen mit BG1 ergab folgende Ergebnisse:

BG1	Kontrolle	Carbo: 5 $\mu$ M	Carbo: 10 $\mu$ M	Lona: 0,05 $\mu$ M	Lona: 0,3 $\mu$ M	Carbo:5 $\mu$ M Lona: 0,3 $\mu$ M	Carbo:10 $\mu$ M Lona: 0,05 $\mu$ M
<b>Apoptose/Nekrose</b>	15,16	24,25	28,00	20,24	26,79	33,04	32,41
<b>G0-/G1-Phase</b>	47,52	40,41	34,81	42,68	33,60	34,48	34,05
<b>G2-/M-Phase</b>	36,61	34,77	34,43	36,36	38,26	31,75	33,04

Tabelle 3-9: BG1 Zellzyklusanalyse. Prozentuale Verteilung der Zellpopulation nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Carboplatin und Lonafarnib.

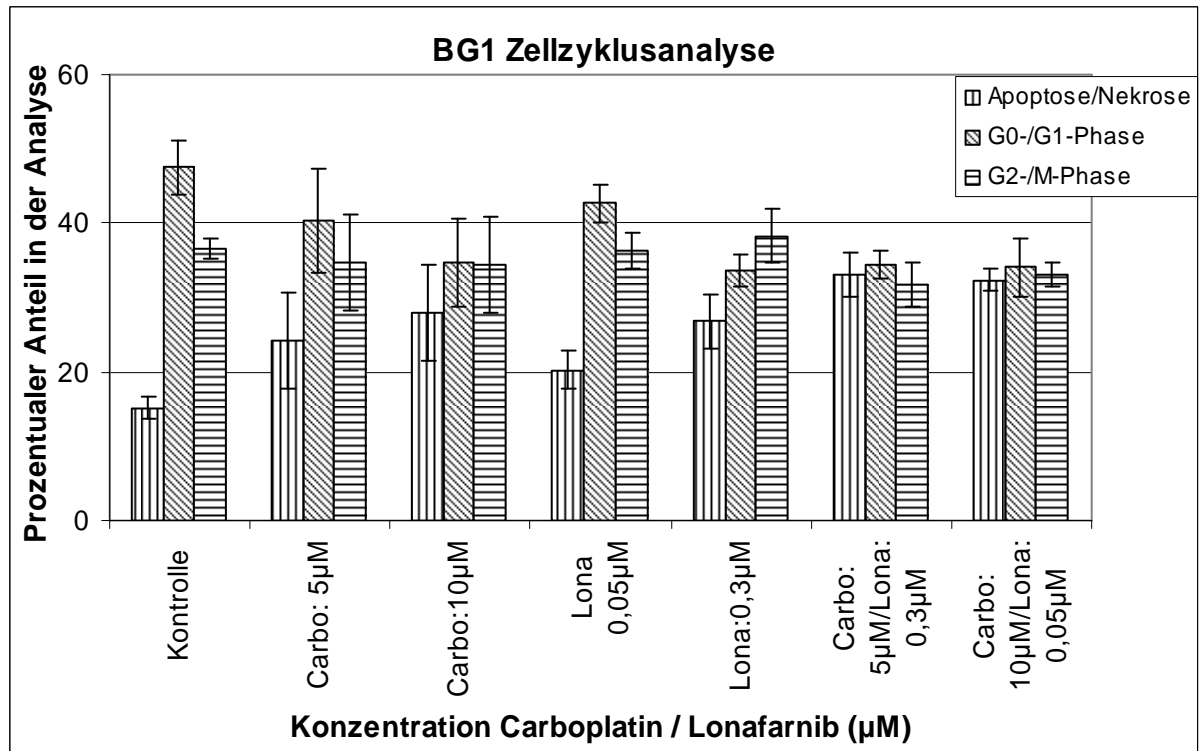


Abb. 3-13: Zusammenstellung von 3 Zellzyklusanalysen an BG1-Zellen mittels Propidiumiodidfärbung.

Aus der Tabelle 3-9 und Abb. 3-13 ist ersichtlich, dass sich der in der G0/G1-Phase befindliche Anteil der BG1-Zellpopulation nach Behandlung mit den Substanzen zugunsten des apoptotisch / nekrotischen Anteils verschiebt. Dieser Trend ist über das Spektrum der verwendeten Konzentrationen zu beobachten, etwas stärker jedoch bei den mit beiden Medikamenten behandelten Populationen.

Der umgekehrte Trend ist bei Betrachtung der G2-/M-Phase ersichtlich: Dieser Populationsanteil nimmt nach Behandlung mit den Medikamentenkombinationen etwas ab, bei den mit Einzelsubstanzen behandelten Zellen ist dieser Trend jedoch nur sehr schwach bzw. gar nicht vorhanden.

### 3.2.2 Zellzyklusanalyse Skov3

Die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Zellzyklusanalysen mit Skov3 ergaben folgende Ergebnisse:

Skov3	Kont- rolle	Carbo: 5 $\mu$ M	Carbo: 10 $\mu$ M	Lona: 0,5 $\mu$ M	Lona: 5 $\mu$ M	Carbo: 5 $\mu$ M Lona: 5 $\mu$ M	Carbo: 10 $\mu$ M Lona: 0,5 $\mu$ M
<b>Apoptose/ Nekrose</b>	11,96	20,07	26,34	15,03	13,31	26,39	26,05
<b>G0-/G1- Phase</b>	54,39	42,34	29,74	51,48	51,79	28,75	21,93
<b>G2-/M- Phase</b>	30,82	35,24	40,42	30,56	31,61	40,88	46,93

Tabelle 3-10: Skov 3 Zellzyklusanalyse: Prozentuale Verteilung der Zellpopulation nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Carboplatin und Lonafarnib.

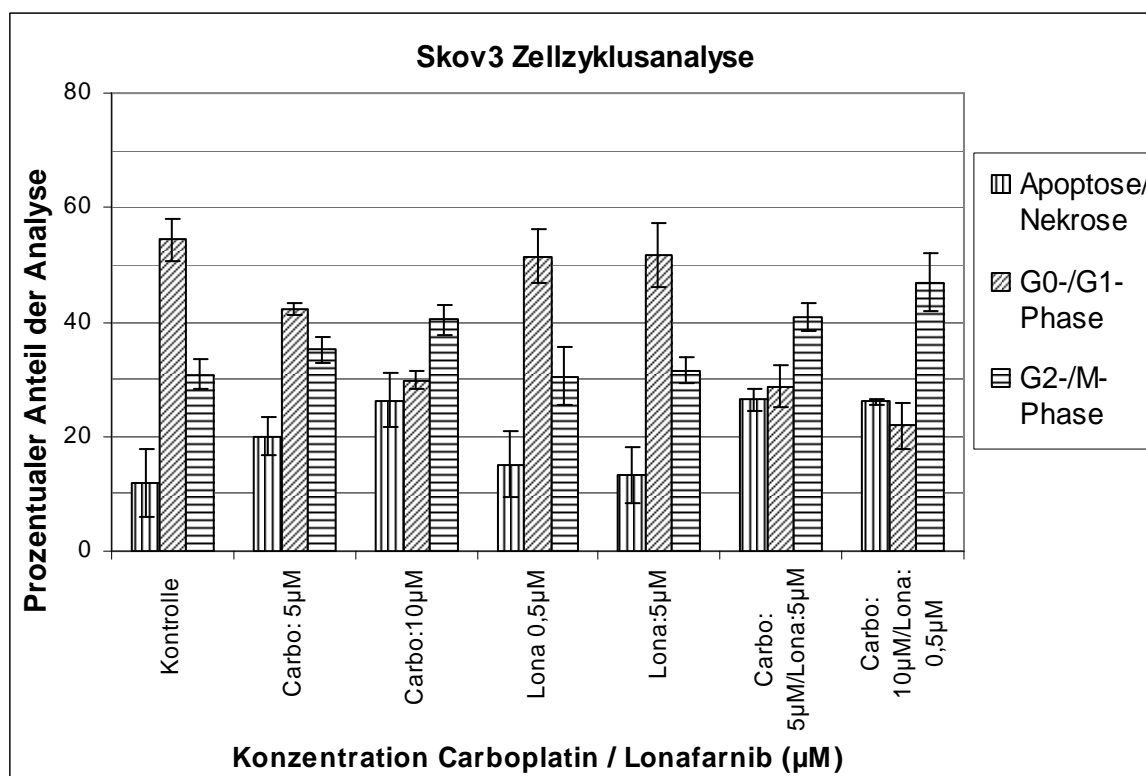


Abb. 3-14: Zusammenstellung von 3 Zellzyklusanalysen an Skov3-Zellen mittels Propidiumiodidfärbung

Auch im Falle von Skov 3 ist bei allen Konzentrationen eine Zunahme des apoptotisch/nekrotischen Populationsanteils zu beobachten. Schwächer ausgeprägt ist dieser Trend bei den nur mit Lonafarnib behandelten Zellen. Die mit Medikamentenkombinationen behandelten Zellen zeigen zwar gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der apoptotisch/nekrotischen Zellen, verglichen mit der alleinigen Carboplatinbehandlung ist jedoch kaum ein zusätzlicher Effekt zu beobachten.

Außerdem kommt es auch zu einer Zunahme der G<sub>2</sub>-/M-Phase. Insbesondere ist dies bei den Medikamentenkombinationen und Carboplatineinzelkonzentrationen zu beobachten, nicht jedoch bei den Einzelanwendungen von Lonafarnib.

### 3.3 Apoptose Messung mittels Annexin-5

Mit der Fragestellung, ob die Medikamente eher Apoptose oder Nekrose induzierend wirken, wurde die Apoptosemessung mittels Annexin-5 durchgeführt. Annexin-5 ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Phospholipid, das eine hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt. Es eignet sich, da Phosphatidylserin zu Beginn der Apoptose an die äußere Plasmamembran verlagert wird, somit als Marker für apoptotische Zellen. Nekrotische Zellen, die durch mangelnde Membranintegrität auch als Phosphatidylserin positiv erkannt werden, können durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid differenziert werden.

Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit den jeweiligen Lösungsmitteln der Medikamente (DMSO bzw. H<sub>2</sub>O) entsprechend der höchsten verwendeten Konzentration behandelt wurden.

Im Folgenden zwei beispielhafte Exemplare eines Annexin-5 Assays:

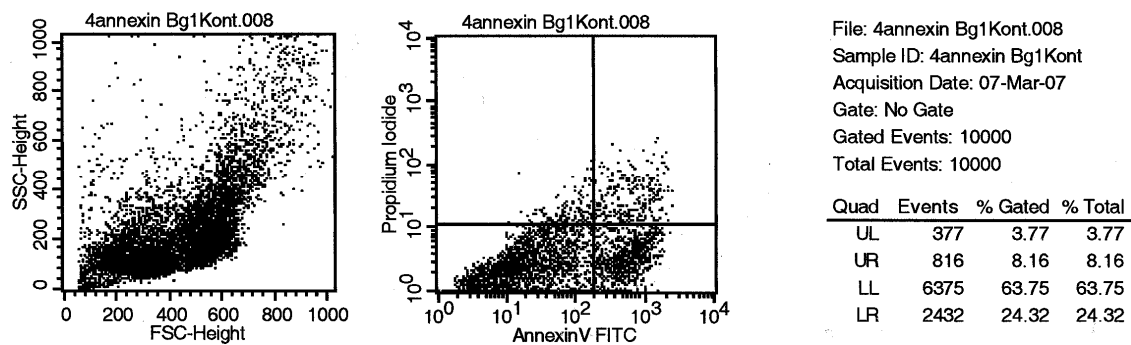


Abb. 3-15: Beispiel für die unbehandelte Kontrolle eines Apoptoseinduktionsassays mit BG1. Die linke Abbildung (FSC-Height= Forward light scatter) zeigt das Vorwärtsstreulicht, das zur Größenbestimmung der Zellen verwendet wird. In der rechten Abbildung entspricht der linke untere Quadrant (LL) den vitalen Zellen, der rechte untere Quadrant entspricht den apoptotischen Zellen (Phosphatidylserin positiv, Propidiumiodid negativ). Bei den oberen Quadranten repräsentiert der rechte die nekrotischen (Phosphatidylserin und Propidiumiodid positiv) Zellen und der linke die Zelltrümmer (Phosphatidylserin positiv, Propidiumiodid negativ).

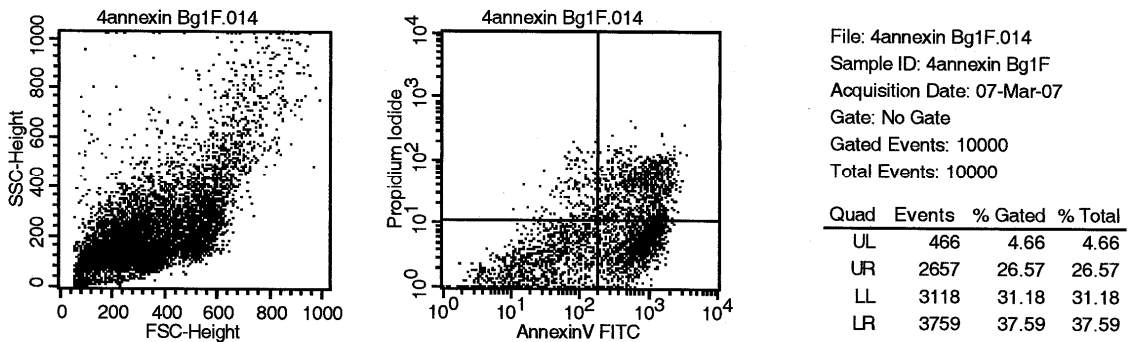


Abb. 3-16: Darstellung von mit  $10\mu\text{M}$  Carboplatin und  $0,05\mu\text{M}$  Lonafarnib behandelten Zellen (BG1). Gegenüber der Kontrolle zeigt sich eine Zunahme im rechten unteren und oberen Quadranten, also der nekrotischen und apoptotischen Zellen.

Die linke Abbildung (FSC-Height= Forward light scatter) zeigt das Vorwärtsstreulicht, das zur Größenbestimmung der Zellen verwendet wird.

### 3.3.1 Apoptose Messung BG1

BG1	Kontrolle	Carbo: $5\mu\text{M}$	Carbo: $10\mu\text{M}$	Lona $0,05\mu\text{M}$	Lona: $0,3\mu\text{M}$	Carbo: $5\mu\text{M}$ / Lona: $0,3\mu\text{M}$	Carbo: $10\mu\text{M}$ / Lona: $0,05\mu\text{M}$
Zelltrümmer	1,69	1,4	1,59	1,46	1,23	2,19	2,23
Vital	68,82	57,32	51,35	57,1	43,04	38	40,63
Nekrose	6,2	9,87	11,21	11,27	14,65	20,5	19,99
Apoptose	23,29	31,4	35,84	30,16	41,07	39,31	37,15

Tabelle 3-11: Mittelwerte der vitalen, nekrotischen und apoptotischen Populationsanteile aus 3 Apoptoseinduktionsassays mit BG1.



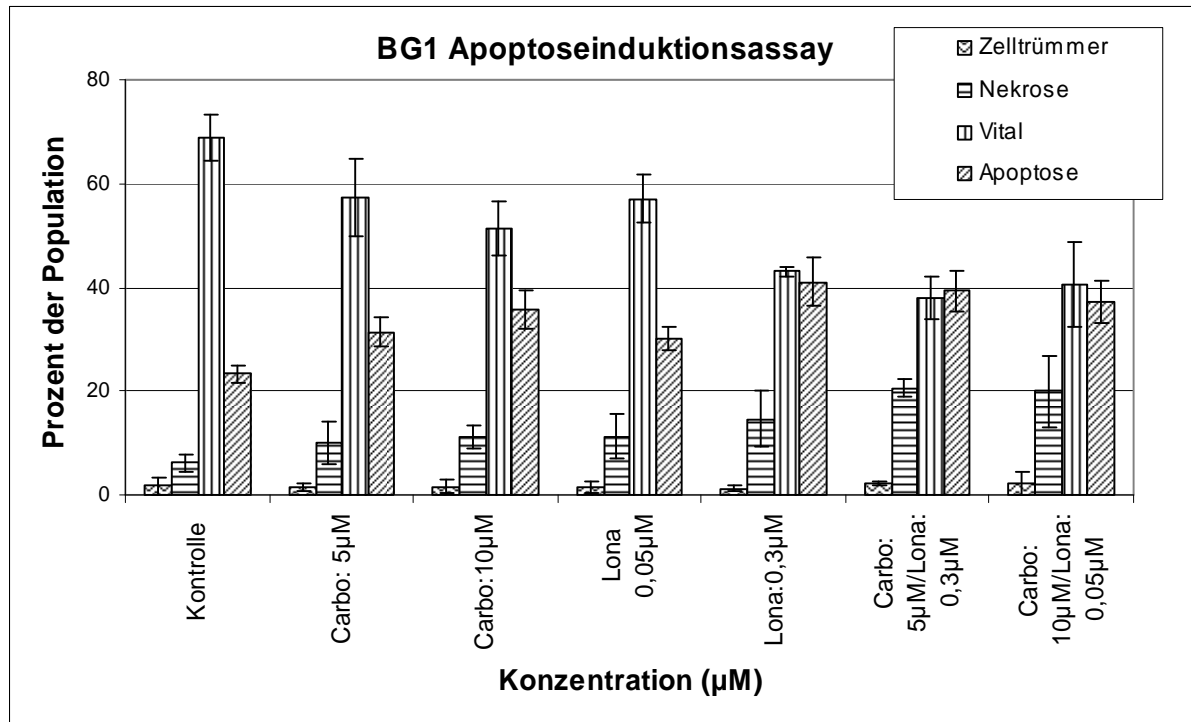


Abb. 3-17: Mittelwerte aus 3 Apoptoseinduktionsassays mit BG1.

Sowohl Carboplatin als auch Lonafarnib führt bei BG1 zu einer Zunahme des apoptotischen und nekrotischen Gesamtanteils der Zellpopulation. Die Kombination von Carboplatin 10µM und Lonafarnib 0,05µM führt dabei zu einem höheren Anteil an nekrotischen und apoptotischen Zellen als die jeweiligen Einzelsubstanzen.

Bei Kombination von Lonafarnib in höherer Konzentration (0,3 µM) und Carboplatin (5µM) ist nur eine Erhöhung des nekrotischen, nicht jedoch des apoptotischen Populationsanteils gegenüber der Einzelanwendung von Lonafarnib in gleicher Konzentration zu beobachten, verglichen mit Carboplatin in Einzelanwendung kommt es jedoch zur Zunahme von Apoptose und Nekrose.

### 3.3.2 Apoptose Messung Skov3

Skov3	Kontrolle	Carbo: 5µM	Carbo:10µM	Lona: 0,5µM	Lona:5µM	Carbo: 5µM/ Lona: 5µM	Carbo: 10µM/ Lona: 0,5µM
Zelltrümmer	3,68	6,09	5,76	6,03	5,61	4,17	4,64
Vital	77,36	71,29	70,91	72,21	70,12	58,34	51,84
Nekrose	6,92	8,85	9,09	8,61	9,74	13,57	16,85
Apoptose	12,03	13,77	14,24	13,15	14,53	23,92	26,66

Tabelle 3-12: Mittelwerte der vitalen, nekrotischen und apoptotischen Populationsanteile aus 3 Apoptoseinduktionsassays mit Skov3.

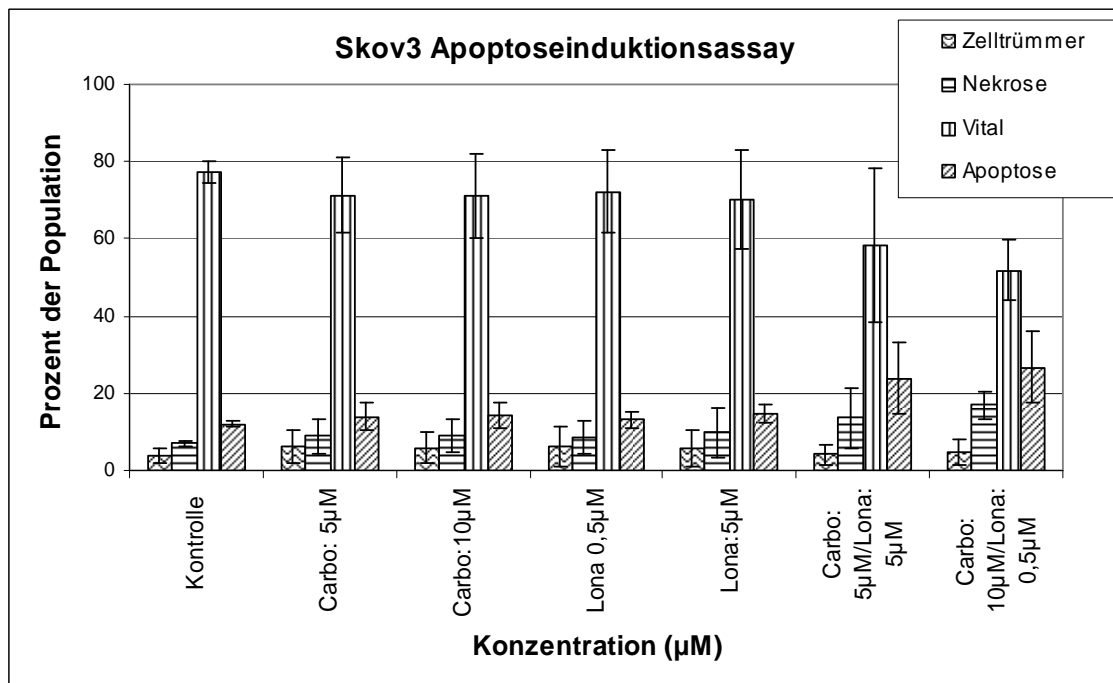


Abb. 3-18: Mittelwerte aus 3 Apoptoseinduktionsassays mit Skov3.

Auch die Betrachtung der Ergebnisse des Apoptoseinduktionsassays mit Skov 3 zeigt eine deutliche Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Populationsanteile bei allen Medikamentenkonzentrationen und -kombinationen. Weiterhin ist deutlich, dass beide

Medikamentenkombinationen (Carboplatin 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M mit Lonafarnib 5 $\mu$ M und 0,5 $\mu$ M) einen besseren Effekt erzielen, als die jeweiligen Einzelkonzentrationen.

### 3.4 Medikamentenakkumulation mit Daunorubicin

Untersucht wurde die mögliche hemmende Wirkung von Lonafarnib und Carboplatin auf Multi-Drug-Resistance Proteine, wie z.B. P-Glycoprotein und MRP 1 & 2. Als Farbstoff und bekanntes Substrat für die MDR-Proteine wurde Daunorubicin verwendet. Als Positivkontrolle wurde, da bekannt ist, dass es MDR-Proteine durch kompetitiven Antagonismus hemmt, Benzylisothiocyanat genutzt.

Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, danach wurde die Akkumulation des Daunorubicins mittels FACS gemessen.

Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

#### 3.4.1 Akkumulationsversuche BG1

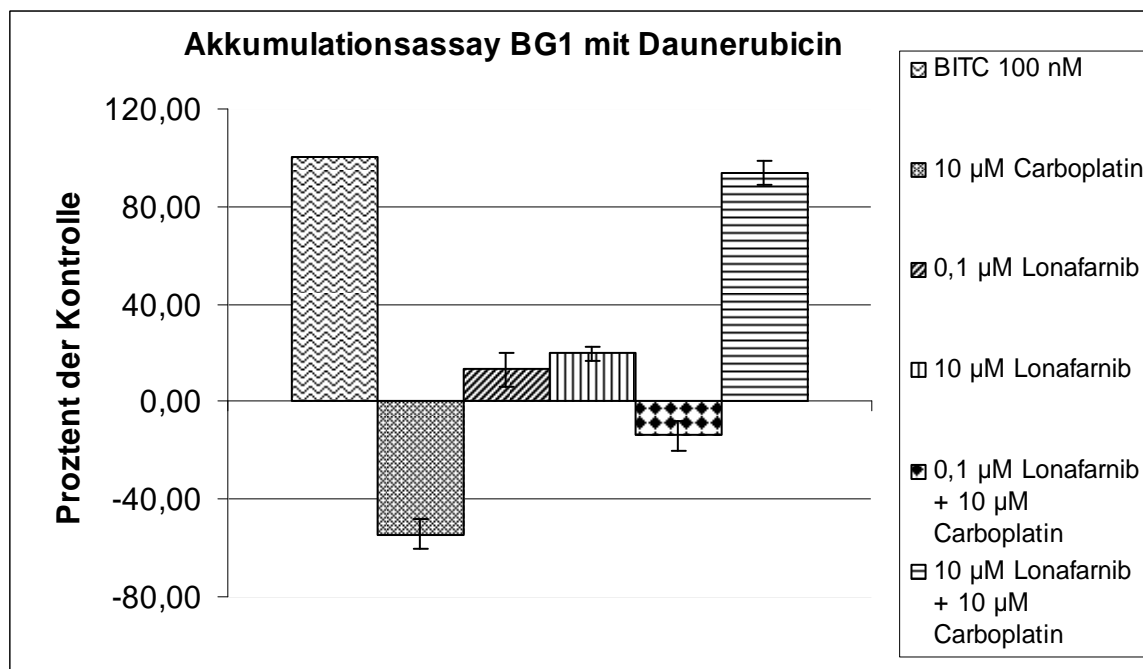


Abb. 3-19: Akkumulation von Daunorubicin in BG1. Die Differenz zwischen „Kontrolle mit DMSO“ und „Positivkontrolle mit Benzylisothiocyanat“ wurde als 100% definiert, von diesem Bezug wurden die restlichen Werte berechnet.

Verwendete Substanz	Akkummulation (%)
Benzylisothiocyanat	100,00
Carboplatin 10 $\mu$ M	-54,29
Lonafarnib 0,1 $\mu$ M	13,16
Lonafarnib 10 $\mu$ M	19,66
Lonafarnib 0,1 $\mu$ M Carboplatin 10 $\mu$ M	-13,94
Lonafarnib 10 $\mu$ M Carboplatin 10 $\mu$ M	93,64

Tabelle 3-13: genaue Werte für die Akkummulation von Daunorubicin in BG1.

In Abb. 3-19 ist zu sehen, dass sowohl die Einzelkonzentration von 10 $\mu$ M Carboplatin als auch Carboplatin in dieser Konzentration mit 0,1 $\mu$ M Lonafarnib bei BG1 zu einer verminderten Anreicherung von Daunorubicin führt.

Anders verhält es sich bei den Einzelkonzentrationen von Lonafarnib (0,1 und 10 $\mu$ M) sowie bei der Kombination von 10 $\mu$ M Carboplatin mit der höheren Lonafarnibkonzentration (10 $\mu$ M). Hier kommt es zu einer vermehrten Anreicherung von Daunorubicin.

Im Vergleich zur Einzelanwendung von Lonafarnib 10 $\mu$ M (19,66% der Kontrolle) zeigt die Kombination mit Carboplatin eine sehr starke Anreicherung (93,64% der Kontrolle). Bei Lonafarnib korreliert die Höhe der verwendeten Konzentration positiv mit der erzielten Mehranreicherung von Daunorubicin. So führt die Verwendung von 0,1 $\mu$ M Lonafarnib zu einer Anreicherung von 13,16% gegenüber der Kontrolle, bei Verwendung von 10 $\mu$ M Lonafarnib beträgt die Anreicherung schon 19,66% der Kontrolle.

### 3.4.2 Akkumulationsversuche Skov3

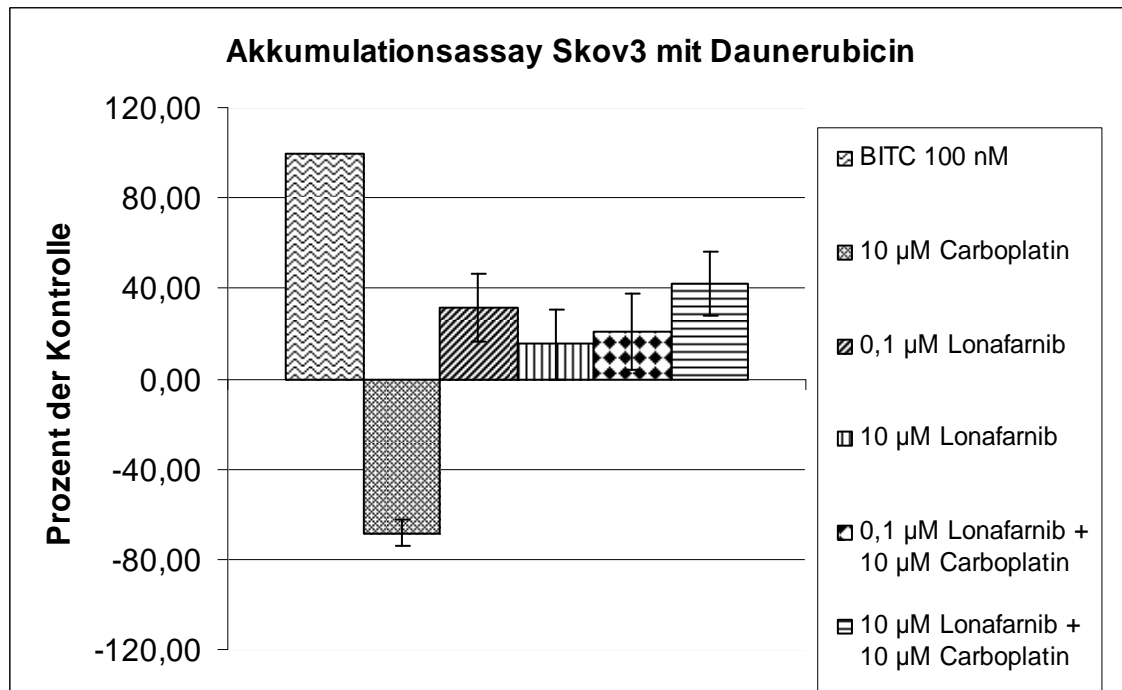


Abb. 3-20: Akkumulation von Daunorubicin in Skov3. Die Differenz zwischen „Kontrolle mit DMSO“ und „Positivkontrolle mit Benzylisothiocyanat“ wurde als 100% definiert, von diesem Bezug wurden die restlichen Werte berechnet.

Verwendete Substanz	Akkumulation (%)
Benzylisothicyanat	100,00
Carboplatin 10 µM	-68,36
Lonafarnib 0,1 µM	31,27
Lonafarnib 10 µM	15,41
Lonafarnib 0,1 µM Carboplatin 10 µM	20,43
Lonafarnib 10 µM Carboplatin 10 µM	42,05

Tabelle 3-14: genaue Werte für die Akkumulation von Daunorubicin in Skov3.

Ähnliche Ergebnisse werden im Akkumulationsversuch mit Skov3 erzielt (Abb. 3-20 und Tabelle 3-14). Auch hier führt die alleinige Behandlung mit 10µM Carboplatin nicht zu einer Akkumulation, sondern zu einem vermehrten Efflux von Daunorubicin.

Die Einzelverwendung von 0,1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Lonafarnib führt zu einer vermehrten Anreicherung. Im Gegensatz zu den Versuchen mit BG1 korreliert hier die Höhe der verwendeten Konzentration jedoch nicht positiv mit der Menge des angereicherten Farbstoffs (31,27% mit 0,1 $\mu\text{M}$  Lonafarnib gegenüber 15,41% mit 10 $\mu\text{M}$  Lonafarnib).

Bei beiden Kombinationen mit Carboplatin kommt es ebenfalls zu einer vermehrten Akkumulation. Die Kombination mit 0,1 $\mu\text{M}$  Lonafarnib und Carboplatin zeigt jedoch keinen besseren Akkumulationseffekt als die alleinige Anwendung von 0,1 $\mu\text{M}$  Lonafarnib (31,27 % gegenüber 20,43%).

Die Kombination von 10 $\mu\text{M}$  Lonafarnib und 10 $\mu\text{M}$  Carboplatin führt allerdings zu einer Anreicherung, die größer ist als die beiden Einzeleffekte.

## 4 Diskussion

Der Forschungsbedarf für neue Therapien des Ovarialkarzinoms ergibt sich aus dem häufigen Versagen der aktuellen Chemotherapie und der damit verbundenen hohen Letalität dieser Erkrankung. Die Standardtherapie, bestehend aus der Kombination von Carboplatin mit Paclitaxel, ist gekennzeichnet von einer sich oft entwickelnden Resistenz des Tumors gegenüber diesen Substanzen; insbesondere problematisch ist die Carboplatinresistenz.<sup>56, 58</sup> Ein möglicher Ausweg aus diesem Problem ist die Kombination von Carboplatin mit einer neuen Substanz, welche die sich ausbildende Resistenz durch andere Wirkungsmechanismen als das klassische Zytostatikum Carboplatin überwindet.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib auf die Ovarialkarzinomzelllinien BG1 und SKOV-3. Bereits nachgewiesen worden sind synergistische Effekte zwischen Lonafarnib und Taxanen sowie bei einigen Zelllinien zwischen Lonafarnib und Cisplatin. Auch gibt es Berichte über synergistische Effekte bei der Kombination mit dem Antiöstrogen Tamoxifen und dem Aromataseinhibitor Anastrozol, so dass die Kombination mit Carboplatin Erfolg versprechend erschien.<sup>1, 33, 41</sup>

Carboplatin ist ein zu den Platinverbindungen gehörendes Zytostatikum, das vor allem zur Bekämpfung solider Tumoren eingesetzt wird. Wegen seines günstigeren Nebenwirkungsspektrums wird es seinem sehr ähnlichen Vorgänger Cisplatin vorgezogen. Seine Wirkung entfaltet es durch Bildung von Aquokomplexen und die dadurch entstehende Vernetzung von DNA-Strängen. Carboplatinresistenzen gehören zu den großen Problemen aktueller Chemotherapien.

Lonafarnib ist ein Farnesyltransferase Inhibitor, der entwickelt wurde um die posttranslationalen Modifikationen am Ras-Protein zu hemmen. Dass auch weitere Zielproteine durch Lonafarnib erreicht werden und es durch andere Mechanismen, wie die Beeinflussung von Multi Drug Resistance Proteinen, wirkt, wurde erst nachträglich entdeckt. Hinweise hierfür waren durch die Tatsache, dass Lonafarnib unabhängig vom Ras-Mutationszustand einer Zellreihe Wirkungen entfaltet, gegeben.<sup>9, 19, 42, 47, 77</sup> Auch die Entdeckung, dass es trotz alternativer Prenylation von K- und N-Ras durch die

Geranyltransferase – ein der Farnesyltransferase ähnliches Enzym – zu einer Wachstumshemmung kommen kann, trug dazu bei, dass andere Wirkungsmechanismen in Betracht gezogen wurden.<sup>76</sup> So sind zunächst andere, ebenfalls einer Farnesylation unterliegenden Proteine wie Rho, Rheb und CENP-E/ CENP-F als weitere Ansatzpunkte von Farnesyltransferase Inhibitoren wie Lonafarnib zu nennen. Ebenso beschrieben worden sind Effekte auf die Ausführung des Zellzyklus sowie die Induktion von Apoptose und die Vaskularisation maligner Tumoren. In Ras-aktivierten Tumoren erhöhten FTI außerdem die Radiosensitivität.<sup>13</sup> Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Lonafarnib die Akkumulation von Medikamenten durch Modulationen an Multi Drug Resistance Proteinen erhöhen kann.<sup>14, 59, 71</sup>

Erste Proliferationsassays zur Untersuchung von Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Medikamentenwirkung zeigten zum einen eine über das Spektrum der verwendeten Konzentrationen ausreichende Wachstumshemmung am 4. Tag nach Zugabe der Medikamente und zum anderen eine positive Korrelation zwischen Höhe der verwendeten Konzentration und erzielter Hemmung im Zellwachstum. Hier deutete sich bereits an, dass die Zellreihe SKOV-3 weniger empfindlich auf beide Substanzen reagiert als BG1. So wurde eine 50%ige Wachstumshemmung (IC<sub>50</sub>) bei BG1 mit 3,8 µM Carboplatin bzw. 0,17 µM Lonafarnib erreicht, während für gleiche Effekte bei SKOV-3 18,8 µM Carboplatin benötigt wurden. Mit Lonafarnib konnte eine 50%ige Wachstumshemmung bei SKOV-3 mit den verwendeten Konzentrationen überhaupt nicht erzielt werden (maximal verwendete Konzentration: 5µM, resultiertes Zellwachstum: 79,6% der Kontrolle).

Die Untersuchung auf ein Zusammenwirken der Medikamente zeigte, insbesondere bei BG1, bei einigen Konzentrationen ein positives Resultat mit einem Interaktionsindex kleiner als 1, also synergistische Effekte. Da dies jedoch nicht über das ganze Spektrum der verwendeten Konzentrationen nachweisbar war, muss eher von einem sich andeutenden, moderaten Synergismus ausgegangen werden

Bei Skov-3 ließ sich ein Interaktionsindex < 1 nur bei sehr wenigen Konzentrationen nachweisen, so dass allenfalls von einem leichten Synergismus bzw., da die Werte um 1 schwanken, additiven Effekt gesprochen werden kann.

Zellzyklusanalysen anderer zeigten einen G<sub>2</sub>-/M-Phasenarrest für Lonafarnib bei einigen Zellreihen.<sup>67</sup> In anderen Untersuchungen bewirkte Lonafarnib einen G<sub>1</sub>-Arrest



oder einen G2-/M-Phasen-Arrest, abhängig vom (H-)Ras-Mutationszustand der Zellreihe. Auch waren bei einigen Zelllinien überhaupt keine Änderungen im Zellzyklus nachweisbar.

Zelllinien, die H-Ras mutiert sind, reagierten auf die Behandlung mit FTI mit einem G1-Arrest. Ebenso mit einem G1-Arrest reagierten Zellen, die das Wild-Typ p-53 Tumorsuppressorprotein exprimierten. Als Mechanismen wurde hierfür bei H-Ras mutierten Zellen diskutiert, dass aufgrund keiner alternativen Farnesylation die Bindung an die Zellwand und damit die Funktion von Ras komplett unterbunden wird. Der durch p-53 induzierte G1-Arrest wurde durch eine vermehrte Expression von p-21, einem Zielprotein von p-53, erklärt, wobei ein intaktes p-53 für die Hochregulation von p-21 nötig war. Dies führt letztendlich über einen erniedrigten Cyclin E / CDK 2 – Spiegel zu einer verminderten Phosphorylierung des Rb-Proteins und damit zum G1-Zellzyklusarrest.

Dagegen führte die Behandlung von FTI sensitiven, nicht mutierten (Wild-Typ-Ras) und K-Ras mutierten Zelllinien zu einer Akkumulation in der G2-/M-Phase.<sup>6, 60</sup>

Eine mögliche Erklärung hierfür ist in den ebenfalls einer Farnesylation unterliegenden Zentromerproteinen CENP-E und CENP-F zu finden. CENP-E ist ein Kinesinmotorprotein, das über die Mikrotubulus Anheftung am Kinetochore in der Metaphase die Teilung der Schwesterchromatiden ermöglicht. Für die funktionelle Bindung von CENP-E mit den Mikrotubuli der Zelle ist die Farnesylation erforderlich.<sup>5</sup> CENP-F ist ein zellzyklusreguliertes „Chromosome Passenger Protein“, das ebenfalls für den Übergang von der G2 in die M-Phase des Zellzyklus notwendig ist. Da beide Proteine keiner alternativen Farnesylation unterliegen, führt die Behandlung mit FTI zur kompletten Funktionseinbuße. Die richtige Positionierung und Ausrichtung der Chromosomen vor der Teilung ist somit gestört und es kommt zur Akkumulation in der G2-/M-Phase.<sup>9</sup>

Im Großen und Ganzen konnten diese Effekte hier jedoch nicht gezeigt werden. Ein G1-Arrest konnte bei keiner der beiden Zellreihen nachgewiesen werden.

Die Behandlung von BG1 mit den verwendeten Medikamenten führte sowohl in Einzelbehandlung als auch in Kombination zu einer Abnahme der sich in der G0-/G1-Phase (und nicht zu einem G1-Arrest) befindlichen Zellen zugunsten des apoptotischen und nekrotischen Populationsanteils und nicht zu einer Zunahme des G2-/M-Phasenanteils. Eine Ausnahme bildet die höhere Einzelkonzentration von Lonafarnib (0,3µM): hier deutet sich mit 38,26% gegenüber 36,61% bei der Kontrolle eine leichte

Akkumulation in der G2/M-Phase an. Bei beiden verwendeten Kombinationen von Medikamenten ließ sich ein höherer Anteil von apoptotischen/nekrotischen Zellen nachweisen, so dass sich hier ein die Proliferationsassays bestätigender synergistischer Effekt andeutet.

Bei SKOV-3 zeigte die alleinige Behandlung mit Carboplatin und die Kombination von Carboplatin mit Lonafarnib Ansätze eines G2-/M-Phasenarrest, nicht jedoch die alleinige Behandlung mit Lonafarnib. Auch hier erfolgte die Umverteilung zu Lasten der G0-/G1-Phase, so dass kein G1-Arrest nachweisbar ist.

Der Teil der toten Zellen ist bei allen Konzentrationen und Kombinationen höher als in der Kontrollpopulation. Eine Kombination (Lonafarnib und Carboplatin je 5 $\mu$ M) zeigt einen höheren Anteil an apoptotischen/ nekrotischen Zellen als die jeweiligen Einzelkonzentrationen. Bei der anderen Kombination (Lonafarnib 0,5 $\mu$ M und Carboplatin 10 $\mu$ M) ist der gemeinsame Effekt höher als die Einzelanwendung von Lonafarnib, nicht jedoch als 10 $\mu$ M Carboplatin alleine. Insgesamt deuten sich auch hier synergistische Effekte an.

Nicht untersucht worden ist der Ras-Mutationszustand der verwendeten Zelllinien. Eine H-Ras Mutation ist jedoch unwahrscheinlich. Zum einen, da die meisten menschlichen Tumoren Mutationen im K-Ras Protein aufweisen und dies auch zu den am häufigsten im Ovarialkarzinom nachgewiesenen Mutationen zählt.<sup>70</sup> Zum anderen zählen H-Ras aktivierte Tumorzellen zu den auf die Behandlung mit FTI hochsensitiv reagierenden Zellen, und dass die Zellen hochsensibel auf Lonafarnib reagieren kann – insbesondere für SKOV-3 – nicht behauptet werden. Auch wurde nicht untersucht, ob ein Wild-Typ-p-53 oder die mutierte Form vorliegt.

Zur genauen Einordnung der gefundenen Effekte wäre eine weitere Untersuchung der Zellreihen auf die genannten Veränderungen sinnvoll. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die Behandlung mit sowohl Lonafarnib und Carboplatin einzeln als auch die Kombination der Medikamente Wirkungen auf den Zellzyklus hat, die insbesondere in einer Abnahme des G0-/G1- Anteils und Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen besteht.

Untersuchungen auf Apoptoseinduktion im Annexin-5-Assay ergaben eine Zunahme vor allem des apoptotischen Populationsanteils in beiden Zelllinien nach Behandlung mit Kombinationen als auch Einzelbehandlung mit Carboplatin und Lonafarnib.

Gegenüber den Einzelkonzentrationen zeigten die Kombinationen der Medikamente bei BG1 eine bessere Wirkung. Bei einer Kombination (0,05 $\mu$ M Lonafarnib und 10 $\mu$ M Carboplatin) findet sich sowohl ein höherer Anteil nekrotischer als auch apoptotischer Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelanwendungen. Die andere Kombination (0,3 $\mu$ M Lonafarnib und 5 $\mu$ M Carboplatin) weist nur einen Anstieg des nekrotischen Populationsanteils gegenüber der Einzelanwendung von 0,3 $\mu$ M Lonafarnib auf. Verglichen mit der entsprechenden Einzelanwendung von Carboplatin erhöhen sich sowohl der nekrotische als auch der apoptotische Anteil. Somit deuten sich auch hier synergistische Effekte beider Substanzen an sowie sich eine Bestätigung der bekannten Apoptoseinduktion der Medikamente zeigt.

Auch bei SKOV-3 deuten sich synergistische Effekte an: Beide Medikamentenkombinationen weisen einen höheren Anteil an sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zellen gegenüber den jeweiligen Einzelanwendungen auf. Des Weiteren führt die Kombination, bei der Carboplatin in höherer (10 $\mu$ M) und Lonafarnib in niedrigerer (0,5 $\mu$ M) Konzentration verwendet worden ist, insgesamt zu einem stärkeren Effekt als die andere Kombination von je 5 $\mu$ M beider Substanzen. Diese Beobachtung stimmt mit den Konzentrationsversuchen im Proliferationsassay überein: Die Zellreihe SKOV-3 reagiert in den gewählten Konzentrationen besser auf Carboplatin als auf Lonafarnib.

Als möglicher Mechanismus zur Auslösung von Apoptose durch Lonafarnib ist die Aktivierung von Caspase 8 sowie die vermehrte Expression von DR5 (=Death Receptor 5, ein zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehörender Todesrezeptor) beschrieben worden.<sup>65</sup> Damit aktiviert Lonafarnib den extrinsischen (und nicht intrinsischen, über die Mitochondrien gesteuerten) Weg der Apoptoseinduktion. Über sich in der Plasmamembran befindende o.g. Rezeptoren kommt es zum Start der kaskadenartigen Aktivierung von Caspasen, beginnend mit Caspase 8.

Auch Carboplatin setzt bei der Auslösung von Apoptose bei Mitgliedern der Proteasenfamilie „Caspasen“ an: Es führt zu einer Aktivierung von Caspase 3, die einen der Endschritte in der Induktion von Apoptose darstellt.<sup>32, 35</sup>

Die Ausbildung von Cis- bzw. Carboplatinresistenzen in soliden Tumoren wie dem Ovarialkarzinom wird als multifaktoriell beschrieben. Zu den Mechanismen gehören unter anderem Änderungen in: DNA Reparaturmechanismen, zum

Glutathionestoffwechsel gehörenden Enzymen, Protooncogen- und Apoptose regulierenden Genen und den Zellzyklus regulierende Proteine.<sup>63</sup>

Als ein weiterer möglicher Mechanismus der Carboplatinresistenz von malignen Neoplasien ist die Überexpression von Multi-Drug-Resistance-Proteinen beschrieben worden.<sup>3, 50</sup> Physiologische Funktion dieser Proteine ist der Schutz der Zelle vor Vergiftung. Bei der Therapie von Tumoren ergibt sich hierdurch das Problem der verminderten Akkumulation eines Medikamentes im Zellinneren, was durch die häufig vorhandene Überexpression dieser Proteine durch den Tumor besonders ausgeprägt ist. Die verminderte Akkumulation zu überwinden, ist einer der möglichen Ansätze neuer Kombinationstherapien.

Das am häufigsten überexprimierte MDR-Protein ist das P-Glykoprotein, als dessen Potenter Inhibitor sich Lonafarnib bereits erwiesen hat.

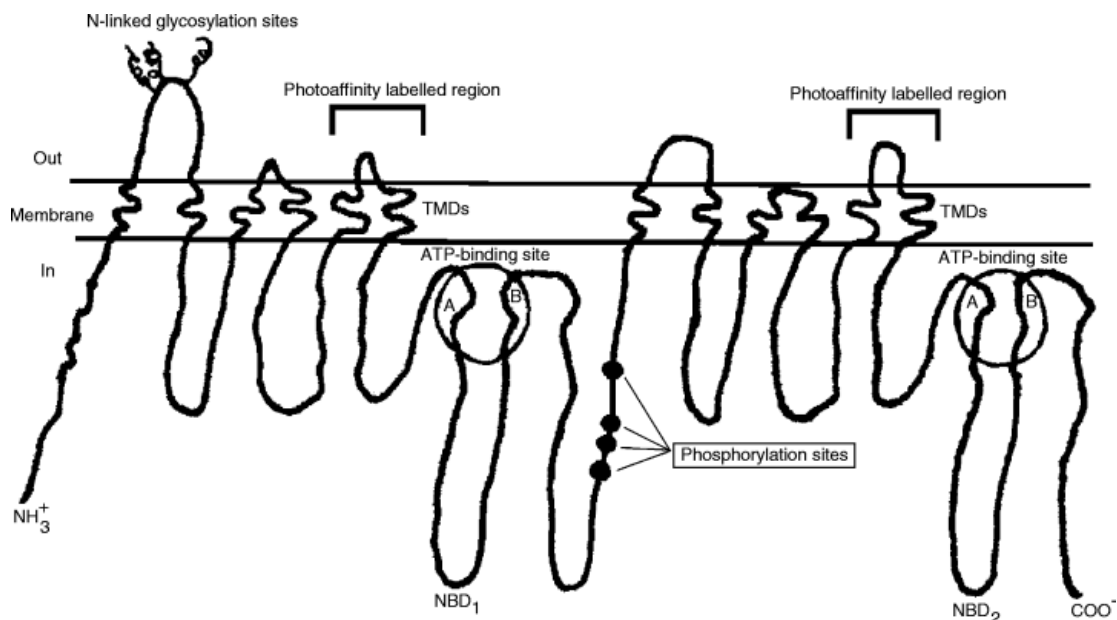


Abb. 4-1: Schematische Darstellung des P-Glycoproteins in der Zellmembran.<sup>4, 74</sup>

Bei P-Glycoprotein handelt es sich um ein 170kDa großes Plasmamembranprotein, das zur ATP-bindenden Superfamilie der Membranproteine gehört. Beim Menschen wird es durch das MDR1 und MDR2 Gen kodiert. Gebildet wird es aus zwei Hälften, die jeweils eine ATP-Bindungsstelle enthalten und funktionell miteinander interagieren. Da der Substanztransport mittels P-Glycoprotein Energie abhängig ist, ist die Fähigkeit zur Hydrolyse von ATP essentiell.

Mit der Rolle des Schutzes von Zellen vor endo- oder exogener Vergiftung einhergehend, befinden sich P-Glycoproteine physiologisch häufig an der zur Plasmamembran zeigenden Seite einer Zelle. Im unteren Gastrointestinaltrakt findet

sich P-Glycoprotein an der Mukosa und verhindert die Aufnahme bzw. fördert die Exkretion toxischer Stoffe. Auch in Leber und Niere findet es sich zu diesem Zweck am Lumen zur Galle bzw. zum Nephron.<sup>4, 23</sup>

Als generelle Mechanismen zur Hemmung des Substanztransportes wäre eine Störung der Substanzerkennung, der Bindung oder Hydrolyse von ATP denkbar. Der größte Teil der P-Glycoproteininhibitoren übt seine Wirkung aber über einen weiteren Mechanismus, dem kompetitiven Antagonismus, aus.<sup>4</sup>

Die Liste der bekannten P-Glycoproteinsubstrate umfasst eine große Anzahl von hydrophoben und amphipathischen Substanzen. Neben Medikamenten zur Krebsbekämpfung gehören beispielsweise auch in der HIV-Therapie eingesetzte Proteaseninhibitoren zu den Substraten.<sup>4, 16</sup>

Lonafarnib ist als Inhibitor sowohl des P-Glycoproteins als auch anderer zur ATP-bindenden Transporter Familie gehörender Proteine wie z.B. MRP 1 & 2 bekannt.<sup>73</sup>

Darüber, ob Carboplatin zu den P-Glycoprotein Substraten gehört, finden sich unterschiedliche Meinungen. Teilweise wird Carboplatin als Substrat genannt,<sup>30</sup> andere dagegen sagen, dass Carboplatin bzw. Platinverbindungen im Allgemeinen nicht zu den P-Glycoproteinsubstraten gehören.<sup>48, 52</sup>

Einigkeit herrscht aber darüber, dass Cisplatin – zu dem Carboplatin überwiegend kreuzresistent ist – kein Substrat des P-Glycoproteins ist.

Cisplatin wird jedoch durch andere MDR-Proteine, wie MRP1 (ABC-C1) und MRP2 (ABC-C2, cMOAT), aus der Zelle befördert.<sup>73</sup>

Eine Überexpression der beiden – ebenfalls zur Familie der ATP-abhängigen ABC-Transporter gehörenden – MRP 1&2 Proteine wurde in verschiedensten Tumoren, wie z.B. Lungen-, Blasen-, Brust- und Ovarien, gefunden.

Im Gegensatz zu P-Glykoprotein agieren MRP1 und MRP2 als Glutathion-Pumpen. Das heißt, sie transportieren an Glutathion gebundene Substanzen aus der Zelle. Glutathion-Pumpen spielen außerdem eine Rolle bei der Beseitigung von Schwermetallen. Auch Cisplatin ist dafür bekannt, intrazellulär mit Glutathion zu interagieren.<sup>37</sup> Sowohl für MRP1 als auch MRP2 wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Überexpression des Proteins und Cisplatinresistenz der Zellen gefunden.<sup>36, 40</sup>

Die hierzu durchgeführten Untersuchungen an der Zellreihe BG1 mit Daunorubicin ergaben, dass die Kombination von Lonafarnib und Carboplatin in einer der verwendeten Konzentrationen zu einer vermehrten Akkumulation des Daunorubicins

gegenüber der Kontrolle führten (je 10 $\mu$ M Lonafarnib und Carboplatin). Auch in der Einzelanwendung konnte für Lonafarnib dieser Effekt bei den verwendeten Konzentrationen nachgewiesen werden; hier korrelierte die Höhe der Konzentration positiv mit dem Akkumulationseffekt des Daunorubicins (13,16% bei 0,1 $\mu$ M und 19,66% bei 10 $\mu$ M). Die Kombination von je 10 $\mu$ M beider Substanzen erbrachte außerdem eine stärkere Akkumulation als beide Medikamente einzeln, entsprechend einem sich erneut andeutendem synergistischen Effekt. Eine verminderte Akkumulation des Daunorubicins dagegen erbrachte die Einzelanwendung von Carboplatin sowie die Kombination mit der niedrigeren Lonafarnibkonzentration.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Akkumulationsversuche mit SKOV-3: Die Einzelanwendung mit Carboplatin erbrachte eine verminderte Akkumulation gegenüber der Kontrolle. Die Kombinationen und Einzelanwendungen von Lonafarnib zeigten eine positive Akkumulation gegenüber der Kontrolle. Jedoch korrelierte hier bei Lonafarnib die Höhe der Konzentration nicht positiv mit dem Effekt (0,1 $\mu$ M, 31,27% und 10 $\mu$ M, 15,41%). Beide Medikamentenkombinationen erbrachten positive Akkumulationen; anders als bei der Einzelanwendung war die höhere Lonafarnibkonzentration der niedrigeren (jeweils mit 10 $\mu$ M Carboplatin) überlegen (20,43% gegenüber 42,05%).

Es deutet sich somit auch hier ein synergistischer Effekt zwischen den beiden Medikamenten an.

Die beschriebene verminderte Anreicherung von Daunorubicin unter Carboplatin in Einzelanwendung ist bei beiden Zellreihen zu finden; bei BG1 ist sie außerdem bei der Kombination von Carboplatin mit der geringeren Lonafarnibkonzentration (0,1 $\mu$ M) zu finden. Mit den hier angewendeten Methoden ist diese Beobachtung nicht endgültig erklärbar. Es scheint jedoch durch die verwendeten Substanzen hervorgerufene Effekte an den Effluxpumpen zu geben.

Es bleibt festzuhalten, dass die eingangs gestellte Frage, ob sich synergistische Effekte zwischen Carboplatin und Lonafarnib in vitro feststellen lassen, grundsätzlich bejaht werden kann.

Dies zeigte sich zum einen durch die durchgeführten Proliferationsassays mit einem Interaktionsindex kleiner als 1 bei einigen Konzentrationen. Da dies jedoch nicht über das komplette Konzentrationspektrum der Fall ist, sollte – insbesondere bei SKOV-3 – von sich andeutenden, moderat synergistischen und additiven Effekten gesprochen werden.

Auch in den weiterhin durchgeführten Experimenten zur Zellzyklusanalyse hat sich ein Synergismus angedeutet: der Populationsanteil der toten Zellen (apoptotisch oder nekrotisch) war bei einigen Kombinationen der Medikamente größer als unter Einzelanwendung.

Bei Messungen der Apoptoseinduktion zeigten sich weniger vitale Zellen bei Anwendung der Medikamentenkombination und bei einem Großteil der Fälle ein größerer Anteil sowohl nekrotischer als auch apoptotischer Zellen.

Die Untersuchung der Medikamentenakkumulation führte zu etwas widersprüchlichen Ergebnissen. Sehr deutlich wurde hier, dass der Synergismus, der diesen Wirkungsmechanismus von Lonafarnib betrifft, nur in einigen, und bei BG1 nur einer der verwendeten Kombination zu finden war.

Fraglich ist außerdem, warum die Einzelanwendung von Carboplatin zu einer so stark gehemmten Medikamentenakkumulation führen sollte, obwohl eine generelle Resistenz der verwendeten Zelllinien mit anderen Methoden nicht zu beobachten war. Um diese Frage zu klären, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Carboplatin.

Ein Synergismus, nachgewiesen durch Proliferationsassays, wurde zwischen Lonafarnib und Paclitaxel bereits für andere Zelllinien (IGROV-1, TOV-112D, PA-1) gezeigt.<sup>67</sup> Für den Zellzyklus betreffende Effekte von Lonafarnib wurden, wie oben beschrieben, bereits verschiedene Ergebnisse gefunden: In einigen Zellreihen wurden G0/G1- Arreste beschrieben, in anderen kam es zum G2-/M-Phasen Arrest. Auch gibt es Berichte darüber, dass Lonafarnib bei bestimmten Zellreihen keinen Effekt auf den Zellzyklus ausübt.<sup>1, 64, 67</sup> Somit scheinen die Zellzyklusveränderungen spezifisch für einzelne Zellreihen zu sein.

Die gefundene Apoptoseinduktion von sowohl Lonafarnib als auch Carboplatin ist bekannt und stimmt mit anderen überein.<sup>35, 64, 65</sup>

Bezüglich der klinischen Anwendung von Lonafarnib liegen bereits einige Ergebnisse vor. Lonafarnib wurde in einer Phase 1 Studie an Erkrankten getestet und die Dosierung, bei der die Nebenwirkungen vertretbar und die Wirkung dennoch ausreichend ist, für Phase 2 Studien bestimmt.<sup>8, 11, 21</sup> In einer weiteren Studie ist festgestellt worden, dass es möglicherweise besser sei, Lonafarnib hoch und intermittierend zu verabreichen, als in niedrigerer und dafür kontinuierlicherer Dosierung.<sup>42</sup>

Auch konnte eine in vivo Wirkung von Lonafarnib bei Behandlung von CML Patienten nachgewiesen werden.<sup>11</sup>

Die Monotherapie mit Lonafarnib in einer Phase 2 Studie erbrachte beim therapierefraktären kolorektalen Karzinom keine zufrieden stellenden Ergebnisse.<sup>62</sup> Die Kombination mit Paclitaxel in einer weiteren Phase 2 sowie einer Phase 1 Studie beim ebenfalls therapierefraktären NSCLC erbrachte dagegen positive Resultate. Es konnte eine klinisch relevante Wirkung dieser Kombination bei wenig Toxizität nachgewiesen werden.<sup>33, 34</sup> Auch die Kombination mit Gemcitabine erbrachte – diemal beim fortgeschrittenen Urothelkarzinom – positive, die Durchführbarkeit bestätigende Ergebnisse.<sup>68</sup>

Diese insgesamt positiven Resultate bereits durchgeführter Phase 1 & 2 Studien mit Lonafarnib zeigen die klinische Bedeutsamkeit dieser Substanz. Erfolgreich waren insbesondere Kombinationstherapien mit anderen Substanzen, so dass ein neuer in vitro- Nachweis synergistischer Effekte – nun mit Carboplatin – die weiteren Möglichkeiten von Kombinationsmöglichkeiten des FTI Lonafarnib aufzeigt. Da jedoch nur 2 Zellreihen des Ovarialkarzinoms untersucht worden sind müssten, damit die gefundenen Effekte besser zu verallgemeinern wären, weitere Untersuchungen mit anderen Zelllinien des Ovarialkarzinoms durchgeführt werden. Außerdem wäre – bezogen auf die Zellzyklusanalyse – eine Untersuchung der verwendeten Zellen auf den Ras- und p-53 Mutationszustand sinnvoll.



## 5 Zusammenfassung

Sich schnell entwickelnde Platinresistenzen gehören zu den ungelösten Problemen der Chemotherapie des Ovarialkarzinoms. Die Kombination von Carboplatin mit neuen Substanzen ist eine Möglichkeit, diesen Hindernissen zu begegnen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich *in vitro* synergistische Effekte zwischen Carboplatin und dem Farnesyltransferase Inhibitor Lonafarnib in den humanen Ovarialkarzinomzelllinien BG1 und SKOV-3 nachweisen lassen.

Proliferationsassays zeigten bei beiden Zelllinien neben einer positiven Korrelation zwischen Substanzkonzentration und Wachstumshemmung synergistische Effekte bei einigen Konzentrationen. Berechnet worden sind diese durch den Interaktionsindex.

Weiterhin untersucht worden sind die Wirkungen der Medikamente auf den Zellzyklus. Nicht nachweisbar war hierbei ein in der Literatur bereits beschriebener G1-Arrest durch Lonafarnib. Ein G2-/M-Phasenarrest ließ sich ansatzweise bei einer Zellreihe (SKOV-3) feststellen. Insgesamt bestanden die Effekte eher in einer Zunahme von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Mit einer Ausnahme korrelierte auch hier die Konzentration positiv mit dem Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen.

Bei einigen Kombinationen deutete sich außerdem der in den Proliferationsassays gefundene Synergismus an, da bei Kombinationsbehandlung ein größerer Anteil der Population nekrotisch/apoptotisch war als bei den jeweiligen Einzelbehandlungen.

Ebenfalls durchgeführt worden sind Apoptoseinduktionsassays mit Annexin-5. Beide Substanzen führten zu einer Zunahme von beiden Formen des Zelltodes, stärker induziert worden ist jedoch die Apoptose, was die Ergebnisse anderer bestätigt. Mit einer Ausnahme bei BG1 deutete sich auch hier wieder der Synergismus zwischen den beiden Substanzen an, indem der Anteil sowohl apoptotischer als auch nekrotischer Zellen bei gemeinsamer Anwendung größer war als bei alleiniger.

Eine verminderte Medikamentenakkumulation als Folge einer Überexpression von MDR-Proteinen wird als eine mögliche Ursache von Resistenzen gegenüber Zytostatika angesehen. Untersuchungen hierzu erbrachten zum einen, dass Lonafarnib allein und bei einigen Konzentrationen auch gemeinsam mit Carboplatin zu einer erhöhten Akkumulation von Daunorubicin gegenüber der Kontrolle führt. Carboplatin alleine führte dagegen zu einer verminderten Akkumulation.

Bei einigen Kombinationen der Substanzen ergab sich auch hier wieder eine bessere Wirkung als bei Einzelanwendung, entsprechend einem sich wie bei den anderen Methoden andeutenden Synergismus.

Bei allen Methoden hat sich außerdem gezeigt, dass die Zellreihe SKOV-3 etwas weniger sensibel auf beide Substanzen reagierte als BG1.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass grundsätzlich davon ausgegangen werden kann, dass es zwischen Carboplatin und Lonafarnib in vitro synergistische Effekte gibt. Die Bedeutung der hier vorgestellten Untersuchungen wird durch eine aktuell durchgeführte Phase II Studie einer Kombinations- und Erhaltungstherapie mit Lonafarnib beim Ovarialkarzinom der AGO Studiengruppe Deutschland unterstrichen.

In Zukunft genauer untersucht werden könnte zum einen, warum nur bei einigen Konzentrationen ein Synergismus gefunden worden ist. Zum anderen wäre, zur genaueren Einordnung der Effekte in der Zellzyklusanalyse eine Untersuchung auf p-53 und Ras- Mutationszustand der Zellreihen interessant. Bezogen auf die Versuche zur Medikamentenakkumulation könnte weiter untersucht werden, warum Carboplatin in Einzelanwendung zu einem so starken Efflux von Daunorubicin führt. Des Weiteren sind zur Verallgemeinerung Untersuchungen an anderen Zelllinien des Ovarialkarzinoms notwendig.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette
ATP	Adenosintriphosphat
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FACS	Flourescence activated cell sorting, Durchflusscytometrie
FCS	fötales Kälber Serum
FIGO	Federation Internationale de Gynecology et de l'Obstetrique, Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
g	Gray, Beschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
kDa	Kilo Dalton
MDR	Multi Drug Resistance
MRP	Multi Drug Resistance Related Proteins
NSCLC	Non small Cell Lung Cancer, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ras-Protooncogen	Rat sarcoma- Protooncogen
Rb-Protein	Retinobalstom Protein
Rheb	Ras-homologe-enriched in brain
Rhob	Ras-homologe-gene-family, member B
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium, Zellkulturmedium
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
DR5	Death Receptor 5

## 7 Literaturverzeichnis

1. ADJEI AA, DAVIS JN, BRUZEK LM, ERLICHMAN C, KAUFMANN SH. Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2001;7:1438-45.
2. AGRAWAL AG, SOMANI RR. Farnesyltransferase inhibitor as anticancer agent. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:638-52.
3. ALLEN JD, BRINKHUIS RF, VAN DEEMTER L, WIJNHOLDS J, SCHINKEL AH. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res* 2000;60:5761-6.
4. AMBUDKAR SV, DEY S, HRYCYNA CA, RAMACHANDRA M, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361-98.
5. ASHAR HR, JAMES L, GRAY K, et al. Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules. *J Biol Chem* 2000;275:30451-7.
6. ASHAR HR, JAMES L, GRAY K, et al. The farnesyl transferase inhibitor SCH 66336 induces a G(2) --> M or G(1) pause in sensitive human tumor cell lines. *Exp Cell Res* 2001;262:17-27.
7. AUERSPERG N, MACLAREN IA, KRUK PA. Ovarian surface epithelium: autonomous production of connective tissue-type extracellular matrix. *Biol Reprod* 1991;44:717-24.
8. AWADA A, ESKENS FA, PICCART M, et al. Phase I and pharmacological study of the oral farnesyltransferase inhibitor SCH 66336 given once daily to patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 2002;38:2272-8.
9. BASSO AD, KIRSCHMEIER P, BISHOP WR. Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 2006;47:15-31.
10. BASSO AD, MIRZA A, LIU G, LONG BJ, BISHOP WR, KIRSCHMEIER P. The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. *J Biol Chem* 2005;280:31101-8.
11. BORTHAKUR G, KANTARJIAN H, DALEY G, et al. Pilot study of lonafarnib, a farnesyl transferase inhibitor, in patients with chronic myeloid leukemia in the

- chronic or accelerated phase that is resistant or refractory to imatinib therapy. *Cancer* 2006;106:346-52.
12. BORTNER CD, CIDLOWSKI JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:259-81.
  13. BRUNNER TB, GUPTA AK, SHI Y, et al. Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers. *Int J Radiat Biol* 2003;79:569-76.
  14. BRUNNER TB, HAHN SM, GUPTA AK, MUSCHEL RJ, MCKENNA WG, BERNHARD EJ. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res* 2003;63:5656-68.
  15. CHOW LQ, ECKHARDT SG, O'BRYANT CL, et al. A phase I safety, pharmacological, and biological study of the farnesyl protein transferase inhibitor, lonafarnib (SCH 663366), in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62:631-46.
  16. CHUNG SY, SUNG MK, KIM NH, JANG JO, GO EJ, LEE HJ. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 2005;28:823-8.
  17. CHUNG WH, SUNG BH, KIM SS, RHIM H, KUH HJ. Synergistic interaction between tetra-arsenic oxide and paclitaxel in human cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2009;34:1669-79.
  18. COPPE JP, PATIL CK, RODIER F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008;6:2853-68.
  19. COX AD, DER CJ. Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:388-93.
  20. DOKIANAKIS DN, VARRAS MN, PAPAETHIMIOU M, et al. Ras gene activation in malignant cells of human ovarian carcinoma peritoneal fluids. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:293-7.
  21. ESKENS FA, AWADA A, CUTLER DL, et al. Phase I and pharmacokinetic study of the oral farnesyl transferase inhibitor SCH 66336 given twice daily to patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2001;19:1167-75.
  22. EWEN ME, SLUSS HK, WHITEHOUSE LL, LIVINGSTON DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 1993;74:1009-20.

23. GERMANN UA. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:927-44.
24. GHOSH R, GANAPATHY M, ALWORTH WL, CHAN DC, KUMAR AP. Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:25-35.
25. GODWIN AK, TESTA JR, HANDEL LM, et al. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:592-601.
26. HAN JY, OH SH, MORGILLO F, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha and antiangiogenic activity of farnesyltransferase inhibitor SCH66336 in human aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1272-86.
27. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
28. HARTMANN LC, LU KH, LINETTE GP, et al. Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:2149-55.
29. HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
30. IHNAT MA, NERVI AM, ANTHONY SP, et al. Effects of mitomycin C and carboplatin pretreatment on multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression and on subsequent suppression of tumor growth by doxorubicin and paclitaxel in human metastatic breast cancer xenografted nude mice. *Oncol Res* 1999;11:303-10.
31. JAMES GL, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *J Biol Chem* 1995;270:6221-6.
32. JIN Z, EL-DEIRY WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005;4:139-63.
33. KHURI FR, GLISSON BS, KIM ES, et al. Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:2968-76.
34. KIM ES, KIES MS, FOSSELLA FV, et al. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel in patients with taxane-refractory/resistant nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005;104:561-9.

35. KITADA N, TAKARA K, ITOH C, et al. Comparative analysis of cell injury after exposure to antitumor platinum derivatives in kidney tubular epithelial cells. *Chemotherapy* 2008;54:217-23.
36. KONIG J, NIES AT, CUI Y, LEIER I, KEPPLER D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:377-94.
37. KOOL M, DE HAAS M, SCHEFFER GL, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997;57:3537-47.
38. KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3-11.
39. LI T, CHRISTOS PJ, SPARANO JA, et al. Phase II trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib plus fulvestrant in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: New York Cancer Consortium Trial P6205. *Ann Oncol* 2009;20:642-7.
40. LIANG XJ, SHEN DW, GARFIELD S, GOTTESMAN MM. Mislocalization of membrane proteins associated with multidrug resistance in cisplatin-resistant cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:5909-16.
41. LIU G, MARRINAN CH, TAYLOR SA, et al. Enhancement of the antitumor activity of tamoxifen and anastrozole by the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib (SCH66336). *Anticancer Drugs* 2007;18:923-31.
42. LIU G, TAYLOR SA, MARRINAN CH, et al. Continuous and intermittent dosing of lonafarnib potentiates the therapeutic efficacy of docetaxel on preclinical human prostate cancer models. *Int J Cancer* 2009;125:2711-20.
43. LIU JJ, CHAO JR, JIANG MC, NG SY, YEN JJ, YANG-YEN HF. Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1995;15:3654-63.
44. LIU M, BRYANT MS, CHEN J, et al. Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Res* 1998;58:4947-56.
45. LOWY DR, WILLUMSEN BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993;62:851-91.

46. MARTIN LP, HAMILTON TC, SCHILDER RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008;14:1291-5.
47. MOASSER MM, ROSEN N. The use of molecular markers in farnesyltransferase inhibitor (FTI) therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;73:135-44.
48. NANIWA J, KIGAWA J, KANAMORI Y, et al. Genetic diagnosis for chemosensitivity with drug-resistance genes in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:76-82.
49. NIELSEN LL, SHI B, HAJIAN G, et al. Combination therapy with the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 and SCH58500 (p53 adenovirus) in preclinical cancer models. *Cancer Res* 1999;59:5896-901.
50. OZBEN T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett* 2006;580:2903-9.
51. PARK MT, LEE SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:60-5.
52. PENTHEROUDAKIS G, RAZIS E, ATHANASSIADIS A, PAVLIDIS N, FOUNTZILAS G. Paclitaxel-carboplatin combination chemotherapy in advanced breast cancer: accumulating evidence for synergy, efficacy, and safety. *Med Oncol* 2006;23:147-60.
53. PFISTERER J, DU BOIS A. [Therapeutic standards for ovarian cancer.]. *Pathologe* 2007;28:222-8.
54. RABIK CA, DOLAN ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9-23.
55. ROBERT-KOCH INSTITUT UND GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND A. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 2008.
56. SANDERCOCK J, PARMAR MK, TORRI V, QIAN W. First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence. *Br J Cancer* 2002;87:815-24.
57. SARASTE A, PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-37.
58. SCHMALFELDT B, DU BOIS A, BURGESS A, et al. [Diagnosis and treatment of malignant ovarian tumors 2005: recommendations of the Kommission Ovar of the AGO]. *Zentralbl Gynakol* 2006;128:11-7.



59. SCOTT AN, HETHERIDGE C, REYNOLDS AR, NAYAK V, HODIVALA-DILKE K, MELLOR H. Farnesyltransferase inhibitors target multiple endothelial cell functions in angiogenesis. *Angiogenesis* 2008;11:337-46.
60. SEPP-LORENZINO L, ROSEN N. A farnesyl-protein transferase inhibitor induces p21 expression and G1 block in p53 wild type tumor cells. *J Biol Chem* 1998;273:20243-51.
61. SERRANO M, LIN AW, MCCURRACH ME, BEACH D, LOWE SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593-602.
62. SHARMA S, KEMENY N, KELSEN DP, et al. A phase II trial of farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336, given by twice-daily oral administration, in patients with metastatic colorectal cancer refractory to 5-fluorouracil and irinotecan. *Ann Oncol* 2002;13:1067-71.
63. SHEN DW, GOLDENBERG S, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Decreased accumulation of [14C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol* 2000;183:108-16.
64. SMALLEY KS, EISEN TG. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, pro-apoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. *Int J Cancer* 2003;105:165-75.
65. SUN SY, LIU X, ZOU W, YUE P, MARCUS AI, KHURI FR. The farnesyltransferase inhibitor lonafarnib induces CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein-dependent expression of death receptor 5, leading to induction of apoptosis in human cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:18800-9.
66. TALLARIDA RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 2002;98:163-8.
67. TAYLOR SA, MARRINAN CH, LIU G, et al. Combining the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel results in enhanced growth inhibitory effects on human ovarian cancer models in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2008;109:97-106.
68. THEODORE C, GEOFFROIS L, VERMORKEN JB, et al. Multicentre EORTC study 16997: feasibility and phase II trial of farnesyl transferase inhibitor & gemcitabine combination in salvage treatment of advanced urothelial tract cancers. *Eur J Cancer* 2005;41:1150-7.

69. VAN DER WEIDE K, DE JONGE-PEETERS SD, KUIPERS F, DE VRIES EG, VELLENGA E. Combining simvastatin with the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib results in an enhanced cytotoxic effect in a subset of primary CD34+ acute myeloid leukemia samples. *Clin Cancer Res* 2009;15:3076-83.
70. VARRAS MN, SOURVINOS G, DIAKOMANOLIS E, et al. Detection and clinical correlations of ras gene mutations in human ovarian tumors. *Oncology* 1999;56:89-96.
71. WANG E, CASCIANO CN, CLEMENT RP, JOHNSON WW. The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 is a potent inhibitor of MDR1 product P-glycoprotein. *Cancer Res* 2001;61:7525-9.
72. WANG EJ, CASCIANO CN, CLEMENT RP, JOHNSON WW. In vitro flow cytometry method to quantitatively assess inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2000;28:522-8.
73. WANG EJ, JOHNSON WW. The farnesyl protein transferase inhibitor lonafarnib (SCH66336) is an inhibitor of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Chemotherapy* 2003;49:303-8.
74. WANG RB, KUO CL, LIEN LL, LIEN EJ. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *J Clin Pharm Ther* 2003;28:203-28.
75. WESIERSKA-GADEK J, KRAMER MP, SCHMID G. A combined treatment of HeLa cells with the farnesyl protein transferase inhibitor L-744,832 and cisplatin significantly increases the therapeutic effect as compared to cisplatin monotherapy. *J Cell Biochem* 2008;104:189-201.
76. WHYTE DB, KIRSCHMEIER P, HOCKENBERRY TN, et al. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 1997;272:14459-64.
77. ZHANG FL, KIRSCHMEIER P, CARR D, et al. Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I. *J Biol Chem* 1997;272:10232-9.

## **8 Anhang**

### **8.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Synergistische Effekte von Lonafarnib und Carboplatin auf humane Ovarialkarzinomzellen in vitro“ in der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie unter Leitung von Herrn Professor Dr. Wagner mit Unterstützung durch Herrn Dr. Baumann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.“

Kiel ,

## 8.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Baumann bedanken. Er hatte trotz vielfältiger anderer Aufgaben und Verpflichtungen stets ein offenes Ohr für kleine und große Probleme, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit auftauchten. Seine gute Betreuung hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso gedankt sei Professor Wagner für das Ermöglichen und Korrekturlesen dieser Dissertation.

Den Mitarbeitern des Zellkulturlabors der Frauenklinik – Traute Plaum, Achim Allmeroth und Dr. Silke Reinartz – möchte ich für die vielfältigen Einführungen in Labormethoden sowie Hilfestellungen bei technischen Problemen im Labor danken.

Bei Hanna Kim möchte ich mich für die gemeinsamen Stunden im Labor bedanken. Insbesondere die dort verbrachten Wochenenden wären ohne ihre Gesellschaft und die netten Gespräche sehr einsam geworden.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Benjamin Stolze für die Hilfe bei Computerproblemen und Datensicherungen.

Und zuletzt geht ein ganz großer Dank an meine Eltern: Ihre dauerhafte ermutigende seelische sowie finanzielle Unterstützung ermöglichte mir sowohl das Meistern meines Studiums als auch die Fertigstellung dieser Dissertation.

### 8.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Behr, Berger, Bertalanffy, Burghard, Cetin, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Eberhardt, Elsässer, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Georg, Gerdes, Görg C., Görg K., Grau, Gress, Grimm, Grundmann, Hadji, Hasilik, Hofmann, Hoyer, Kaltenborn, Kann, Kircher, Klose, König, Koolman, Kroll, Lang, Langer, Leonhardt, Leppek, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Schäfer, Schnabel, Schneider, Schofer, Sekundo, Sesterhenn, Stiletto, Rothmund, Seitz, Steiniger, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wündisch, Zemlin.