

Aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie
und Onkologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Uwe Wagner
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

**Synergistische Wirkung des Farnesyltransferaseinhibitors
Lonafarnib und des Kinaseinhibitors Flavopiridol auf
Proliferation und Zellzyklus von Ovarialkarzinomzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von
Sandy Heimbach geb. Christiani aus Iserlohn
Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 02.12.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. U. Wagner

1.Korreferent: Prof. Dr. R. Moll

Für Christian
und
für Frieda Elisabeth und Oskar Ferdinand

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	7-22
<u>1.1 Ovarialkarzinom</u>	7-10
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Tumorausbreitung	7
1.1.3 Klassifikation der malignen Ovarialtumoren	7
1.1.4 Symptome	8
1.1.5 Metastasierung	8
1.1.6 Diagnostik	8
1.1.7 Prognosefaktoren	8-9
1.1.8 Therapie des Ovarialkarzinoms	9-10
<u>1.1.8.1 Chemotherapie des Ovarialkarzinoms</u>	9-10
<u>1.2 Targeted Therapy</u>	10-12
<u>1.3 Lonafarnib - ein Farnesyltransferaseinhibitor</u>	12-15
1.3.1 Farnesyltransferase (FT)	12-13
1.3.2 Ras-Proteine als Onkogene	13
1.3.3 Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI)	13-15
<u>1.4 Flavopiridol – ein Kinaseinhibitor</u>	15-18
1.4.1 Zyklinabhängige Kinasen (CDKs)	15-16
1.4.2 Flavopiridol	16-17
1.4.3 Antiproliferativer Effekt	17-18
<u>1.5 Synergismus</u>	18-22
1.5.1 Polychemotherapie	18
1.5.2 Synergismus bei Chemotherapie und Biologicals	18-19
1.5.3 Kombination von Lonafarnib mit anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen	19-20
1.5.4 Kombination von Flavopiridol mit anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen	20-21
1.5.5 Interaktionsmodell	21
1.5.6 Berechnung der Interaktionsindizes (nach Tallarida)	21
<u>1.6 Zielsetzung</u>	22

<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	23-43
<u>2.1 Material</u>	23-30
2.1.1 Zellkultur	23-24
<u>2.1.1.1 Charakterisierung der Zelllinien:</u>	23
2.1.1.1.1 <i>SKOV-3-Zellen</i>	23
2.1.1.1.2 <i>BG-1-Zellen</i>	23
<u>2.1.1.2 Chemikalien und Lösungen</u>	23-24
<u>2.1.1.3 Geräte</u>	24
<u>2.1.1.4 Verbrauchsmaterialien</u>	24
2.1.2 Proliferationsassays	25-26
<u>2.1.2.1 Chemikalien und Lösungen</u>	25
<u>2.1.2.2 Geräte</u>	25
<u>2.1.2.3 Verbrauchsmaterialien</u>	25-26
2.1.3 Annexin-V-Versuch	26
<u>2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen</u>	26
<u>2.1.3.2 Geräte</u>	26
<u>2.1.3.3 Verbrauchsmaterialien</u>	26
2.1.4 Zellzyklusanalyse	26-27
<u>2.1.4.1 Chemikalien und Lösungen</u>	26-27
<u>2.1.4.2 Geräte</u>	27
<u>2.1.4.3 Verbrauchsmaterialien</u>	27
2.1.5 Western Blot	27-30
<u>2.1.5.1 Chemikalien und Lösungen</u>	27
<u>2.1.5.2 Geräte</u>	28
<u>2.1.5.3 Ansätze</u>	28-30
<u>2.1.5.4 Antikörper</u>	30
<u>2.2 Methoden</u>	30-43
2.2.1 Zellkultur	30-32
<u>2.2.1.1 Kulturbedingungen</u>	30-31
<u>2.2.1.2 Passagieren von Zellen</u>	31
<u>2.2.1.3 Mediumwechsel</u>	31

<u>2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen</u>	31-32
<u>2.2.1.5 Reaktivierung von kryokonservierten Zellen</u>	32
<u>2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl</u>	32
2.2.2 Proliferationsassays mittels Kristallviolett-färbung	32-38
<u>2.2.2.1 Durchführung</u>	32-33
<u>2.2.2.2 Bestätigung der Abhängigkeit der Extinktion von der Zellzahl</u>	33-34
<u>2.2.2.3 Zeitabhängigkeit</u>	34-35
<u>2.2.2.4 Konzentrationsabhängigkeit</u>	35-36
<u>2.2.2.5 Synergismusversuche</u>	36-38
2.2.3 Annexin-V-Versuch	38-39
2.2.4 Zellzyklusanalyse: Färbung mit Propidiumiodid	39-40
<u>2.2.4.1 Methodik der Durchflußzytometrie</u>	40
2.2.5 Western-Blot	40-43
<u>2.2.5.1 Prinzip der Methode</u>	40
<u>2.2.5.2 Herstellung der Zellpellets</u>	40-41
<u>2.2.5.3 Lysieren des Zellpellets</u>	41
<u>2.2.5.4 Antikörper</u>	41-42
<u>2.2.5.5 SDS-Page/Western Blot Mini Gele</u>	42
<u>2.2.5.6 Vorbereitung für das Blotting</u>	42
<u>2.2.5.7 Blotting</u>	43
<u>3. ERGEBNISSE</u>	43-88
<u>3.1 Proliferationsassays</u>	43-75
3.1.1 Zeitabhängigkeit	44-49
<u>3.1.1.1 SKOV3</u>	45-47
<u>3.1.1.2 BG1</u>	47-49
3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit	49-56
<u>3.1.2.1 SKOV3</u>	49-52
<u>3.1.2.2 BG1</u>	52-55
<u>3.1.2.3 Vergleich beider Zelllinien in Bezug auf Wachstumshemmung durch die Substanzen</u>	55-56

3.1.3 Synergismusversuche	56-75
<u>3.1.3.1 SKOV3</u>	56-65
<u>3.1.3.2 BG1</u>	66-75
<u>3.2 Annexin-V-Versuch</u>	75-79
3.2.1 Methodik	75-76
3.2.2 SKOV3	76-77
3.2.3 BG1	77-79
<u>3.3 Zellzyklusanalyse</u>	79-84
3.3.1 SKOV3	80-82
3.3.2 BG1	82-84
<u>3.4 Western Blotting</u>	85-88
3.4.1 Aktin	85
<u>3.4.1.1 SKOV3</u>	85
<u>3.4.1.2 BG1</u>	85
3.4.2 HDJ2	86-87
<u>3.4.2.1 SKOV3</u>	86
3.4.2.2 BG1	86-87
3.4.3 HIF	87-88
<u>3.4.3.1 SKOV3</u>	87
<u>3.4.3.2 BG1</u>	87-88
<u>4. DISKUSSION</u>	89-102
<u>4.1 Ziel der Studie</u>	89
<u>4.2 Antiproliferative Eigenschaften der Einzelsubstanzen (Proliferationsversuche)</u>	89-90
4.2.1 Synergismus bei BG1-Zellen , jedoch nicht bei SKOV3	90
<u>4.3 Apoptose- und Nekroseinduktion und Reduktion vitaler Zellen bei kombinierter Substanzapplikation</u>	90-91
<u>4.4 Veränderungen des Zellzyklus</u>	91-93
4.4.1. SKOV3	91-92
4.4.2 BG1	92-93
<u>4.5 Proteinexpression – Western Blots</u>	93

<u>4.6 Flavopiridol als Einzelsubstanz</u>	93-97
4.6.1 Beeinflussung der CDK	94-96
<u>4.6.1.1 CDK1: ATP-Hemmung</u>	94
<u>4.6.1.2 CDK-2, CDK-4 und CDK-6: Hypophosphorylierung des Rb-Proteins</u>	94-95
<u>4.6.1.3 CDK-9/7: Inhibition antiapoptotischer Proteine</u>	95
<u>4.6.1.4 CDK-4/6: Verminderung von erb-B2-Rezeptor-Leveln</u>	95-96
4.6.2 Antiapoptotische Wirkung	96-97
<u>4.7 Lonafarnib als Einzelsubstanz</u>	97-99
4.7.1 Zellzyklus	97
4.7.2 Apoptoseinduktion durch Lonafarnib	97-99
<u>4.8 Zelllinien</u>	100
4.8.1 SKOV3	100
4.8.2 BG1	100
<u>4.9 Interaktionen zwischen Flavopiridol und Lonafarnib</u>	100-102
<u>Anhang</u>	103-114
Zusammenfassung	103-104
Abstract	105-106
Literaturverzeichnis	107-112
Verzeichnis der akademischen Lehrer	113
Danksagung	114

1. EINLEITUNG

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der häufigste zum Tode führende gynäkologische Tumor und steht an vierter Stelle der Todesursachen durch Krebserkrankungen bei Frauen (Behbakh et al., 2007). Über 60% der Karzinome werden erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert; eine Ursache für die schlechte Prognose (Fehrmann et al., 2007). Die größte Wahrscheinlichkeit, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, findet sich bei Frauen im sechsten Lebensjahrzehnt. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines malignen Ovarialtumores gelten:

Tab.1.1.1: Risikofaktoren bei der Entstehung maligner Ovarialtumore: eine familiäre Disposition scheint die größte Rolle zu spielen (Ozols, 2005).

Nulliparität
Hoher sozialer Status
Fehlende Einnahme oraler Kontrazeptiva
Frühe Menarche
Späte Menopause
Östrogeneinnahme
Familiäre Disposition

1.1.2 Tumorausbreitung

Zur Beschreibung der Tumorausbreitung werden die Regeln der UICC 1987 verwendet, wodurch auch eine Angleichung an die FIGO-Kriterien möglich ist.

1.1.3 Klassifikation der malignen Ovarialtumoren

Ovarialtumore werden nach morphologischen Gesichtspunkten in Low-malignent-potential (=LMP oder Borderline) und eindeutig maligne Tumoren, sowie histologisch entsprechend den Empfehlungen der WHO (2003) eingeteilt (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

1.1.4 Symptome

Nur selten finden sich charakteristische Symptome, die auf das Vorliegen eines Ovarialtumores hinweisen. Bei ca. 80% aller Patientinnen wird der Tumor erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Shetty et al., 2012). Häufig wird die Diagnose erst bei Tumorgrößen von über 10cm gestellt. Teilweise treten abdominelles Druckgefühl und Schmerzen sowie vaginale Blutungen (gelegentlich durch im Stroma der Karzinome vermehrt gebildete Östrogene, welche eine Endometriumhyperplasie verursachen) auf. Miktionsstörungen, Harnleiterstauungen und Defäkationsschmerzen sind in der Regel bereits Anzeichen für verdrängendes oder infiltratives Tumorwachstum (Salzberg et al., 2005).

1.1.5 Metastasierung

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei fortgeschrittenem Stadium bei unter 30% und hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten nicht wesentlich verändert (Stakleff et al., 2012).

Ovarialkarzinome metastasieren außer in Uterus und Tuben auch in das umliegende Beckengewebe sowie ins Peritoneum. Häufig finden sich auch regionäre Lymphknotenmetastasen und maligne Zellen im Aszites. Fernmetastasen sprechen für ein sehr weit fortgeschrittenes Tumorstadium (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

1.1.6 Diagnostik

Tab. 1.1.2: Diagnostik bei Verdacht auf malignen Ovarialtumor (Ozols, 2005).

gynäkologische Untersuchung
vaginale und abdominale Ultraschalluntersuchung
Röntgenuntersuchung (ggf. Thorax, intravenöses Ausscheidungsurogramm und Kolonkontrasteinlauf) zur Stadieneinteilung und Operationsplanung bei malignem Tumor
Bei entsprechender Fragestellung: CT, MRT, Szintigraphie, Zystoskopie, Rektosigmoidoskopie sowie Gastroskopie bzw. Magen-Darm-Passage

1.1.7 Prognosefaktoren

Allgemein spielt für die Prognose der Grad der Tumorausbreitung vor chirurgischer Intervention und insbesondere die Größe des postoperativ verbleibenden

Karzinomrestes eine Rolle. Ebenso sind das Tumorstadium, eine Ruptur des Karzinoms, der Differenzierungsgrad sowie Mitosefrequenz, Lymphknotenstatus und histologischer Karzinomtypus von Bedeutung (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

Ein Onkogen, welches einen Wachstumsfaktor-Rezeptor kodiert, der bei der Entstehung von Ovarial-Karzinomen eine Rolle spielt, ist erb-B2. Als weiteres Gen ist K-ras, das durch Synthese einer Proteinkinase den intrazellulären Signalweg beeinflusst, beteiligt. Ebenso ist das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken bei Vorliegen von Mutationen der Gene BRCA1, BRCA2 (Tagliaferri et al., 2009), MLH1, MSH2 und TP53 erhöht (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

Häufig finden sich Mutationen des p53-Genes (TP53), was insofern von Bedeutung ist, als daß damit eine Resistenz gegenüber Cisplatin vergesellschaftet ist (Mabuchi et al., 2007). Ein gewisser Anteil (ca. 10%) der Karzinome zeigt eine genetische Komponente; gekennzeichnet durch das gemeinsame Auftreten mit Mammakarzinomen, gelegentlich auch mit Colon- oder Uterusmalignomen (HNPCC) oder im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

1.1.8 Therapie des Ovarialkarzinoms

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms besteht in operativer Tumorentfernung und Chemotherapie. Da gerade bei Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium der wichtigste Prognosefaktor die Größe des postoperativen Tumorrestes ist (s. unter Prognosefaktoren), sollte Ziel der chirurgischen Intervention die komplette Resektion bzw. eine Reduktion der Tumormasse auf deutlich weniger als 1cm im Durchmesser sein (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

1.1.8.1 Chemotherapie des Ovarialkarzinoms

Ovarialkarzinome im Stadium IA, Grad 1 werden nach adäquatem chirurgischen Staging in kurativer Zielsetzung nur operativ therapiert. Patientinnen mit Karzinomen

der Stadien FIGO I-II (außer Stadium IA, Grad 1) sollten nach chirurgischer Intervention eine platinhaltige (Carboplatin) Chemotherapie erhalten.

Bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (FIGO IIB-IV) empfiehlt sich eine primäre platin- und taxanhaltige Chemotherapie, wobei die Kombination von Paclitaxel und Carboplatin einerseits einer Platin-Monotherapie und andererseits Substanzen wie z.B. Docetaxel oder Cisplatin durch ein günstigeres Toxizitätsprofil überlegen ist. Desweiteren ist die Hinzunahme von Bevacizumab zur Chemotherapie und als Erhaltungstherapie möglich (Perren et al. 2011; Burger et al., 2011). Bislang steht eine einheitliche Empfehlung zur Erhaltungstherapie im Anschluß an eine platin-/taxanhaltige Chemotherapie noch aus.

Bei Rezidivsituationen innerhalb von sechs Monaten nach Beendigung einer ersten Therapie sollte bei platinrefraktären Karzinomen eine Monotherapie mit nicht-platinhaltigen Substanzen durchgeführt werden, da von einer operativen Tumorreduktion in der Regel abzuraten ist. Als geeignete Monotherapeutika gelten Topotecan sowie pegyliertes liposomales Doxorubicin. Bei nicht primär mit Taxanen behandelten Ovarialtumoren kann Paclitaxel verwendet werden. Teilweise werden auch GnRH-Analoga, Tamoxifen, Treosulfan, Gestagen und Etoposid empfohlen (Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007).

1.2 Targeted Therapy

Gerade bei fortgeschrittenen soliden Tumoren gelangt die traditionelle zytotoxische Chemotherapie an ihre Grenzen. Durch die Entwicklung von gezielten Behandlungsmöglichkeiten insbesondere auf molekularer Ebene läßt sich der therapeutische Index oftmals steigern (Green, 2004). Im Gegensatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika, die durch weitgreifendere, allgemeinere Mechanismen zelluläre Strukturen oder Prozesse stören, greifen die bei der Targeted Therapy eingesetzten Medikamente direkt in die neoplastische Transformation ein (Grant et al., 2004).

Biologische Behandlungsansätze zielen also selektiv auf maligne Prozesse, sind weniger toxisch und oft wirksam bei Resistenzen gegenüber den herkömmlichen Chemotherapeutika (Behbakht et al., 2007). Seit Entdeckung des human epidermal growth factor receptor (HER), der zur Familie der transmembranen Tyrosin-Kinasen

zählt, und des der selben Familie zuzuordnenden HER2 (ErbB2) gibt es beispielsweise eine weitere Therapieoption bei der Behandlung von Brustkrebs: bei bis zu 30% dieser Karzinome findet sich eine Überexpression des HER2neu-Rezeptors, was ein Ziel für eine Therapie mit anti-HER2-Antikörpern (Trastuzumab; Herceptin®) darstellt. Durch Kombination mit einer Chemotherapie kann die Empfindlichkeit gegenüber dem Antikörper noch gesteigert werden, so daß eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden kann (Green, 2004).

Bei Behandlung von malignen Ovarialtumoren zeigen jedoch mehrere Phase-II-Studien zur Untersuchung von Targeted-Therapy-Strategien bislang eher enttäuschende Ergebnisse: Die Kombination von Carboplatin mit Thalidomid ergibt beispielsweise keinen Vorteil. Trastuzumab (Herceptin®) ist nur bei 7% der HER2neu-Rezeptor überexprimierenden Karzinome (ohnehin nur 11% aller Ovarialkarzinome) erfolgversprechend.

Oregovomab, ein Antigen-Antikörper 125, führt in der Konsolidierungstherapie von fortgeschrittenen Tumoren zu keiner signifikanten Überlebenszeitverlängerung (Berek et al, 2009); ebenso wenig scheint die Kombination von Gefitinib und Tamoxifen (ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor) bei Behandlung von refraktären Karzinomen innerhalb von Phase-II-Studien Auswirkungen zu haben (Wagner et al., 2007).

Eine derzeit in Studien untersuchte sogenannte Targeted Therapy von Ovarialkarzinomen ist TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) - es wird dabei der Tumo-Nekrose-Faktor aktiviert; es kommt durch Triggerung von zellmembranständigen Rezeptoren und daraufhin ausgelösten Caspaseabhängigen Mechanismen zu einer gezielten Apoptoseinduktion in Tumorzellen unter weitgehender Schonung normaler Zellen (Behbakht et al., 2007).

Bei der sogenannten Targeted Therapy ist die initiale Selektion von Patienten von größter Bedeutung, denn wie zahlreiche Studien belegen ist der Behandlungserfolg der dabei verwendeten Substanzen davon abhängig. (Beispielsweise ist Trastuzumab eben nur bei den Mammakarzinomen antiproliferativ wirksam, bei denen eine HER2neu-Rezeptor-Überexpression vorliegt.)

Parallel zu den derzeit laufenden Studien zur Targeted Therapy mit z.B. oben genannten Substanzen (Oregovomab, anti-idiotypen Antikörpern gegen Anticancer Antigen 125, Erlotinib, Bevacizumab und anderen Substanzen wie beispielsweise direkt gegen

vaskulären endothelialen Wachstumsrezeptor gerichtete Medikamente, Cetuximab u.a.) müssen deshalb Untersuchungen stattfinden, die jene Patienten selektieren, die von den spezifischen Behandlungsansätzen profitieren könnten. Gerade nur in kleinen Patientensubgruppen wirksame Substanzen werden zum Teil als ineffektiv eingestuft, wenn keine vorherige Selektion stattfindet, sondern das zu untersuchende Medikament innerhalb großer Phase-III-Studien evaluiert wird (Du Bois et al., 2005).

1.3 Lonafarnib - ein Farnesyltransferaseinhibitor

1.3.1 Farnesyltransferase (FT)

Das Enzym Farnesyltransferase katalysiert die Übertragung eines 15-Carbon-Isoprenyl-Lipides von Farnesyl-Diphosphat an Cysteinketten verschiedener Proteine. Der Farnesylrest wird dabei an das C-terminale-CAAX-Ende des Substrates angefügt (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = carboxyl-terminale Aminosäure) (Basso et al., 2005). Diese posttranslationale Modifikation sorgt durch Alkylierung und/oder Prenylierung für eine Verankerung der Proteine in Membranen (Mitsch, 2003). Die Prenylierung erfolgt dabei durch die Farnesyltransferase oder die Geranyltransferase I, welche eine Farnesyl- oder Geranylgruppe auf ein Protein überträgt (Caraglia et al., 2004). Viele Proteine unterliegen dieser Modifikation durch die Farnesyltransferase und spielen eine Rolle in der Signaltransduktion und Zelltransformation. Zu den auf diese Weise farnelysierten Proteinen zählen Ras, Pre-Lamin A, HDJ-2, PTP-CAAX Thyrosin-Phosphatasen, CENP-E und CENP-F (Basso et al., 2005).

Farnesyltransferase

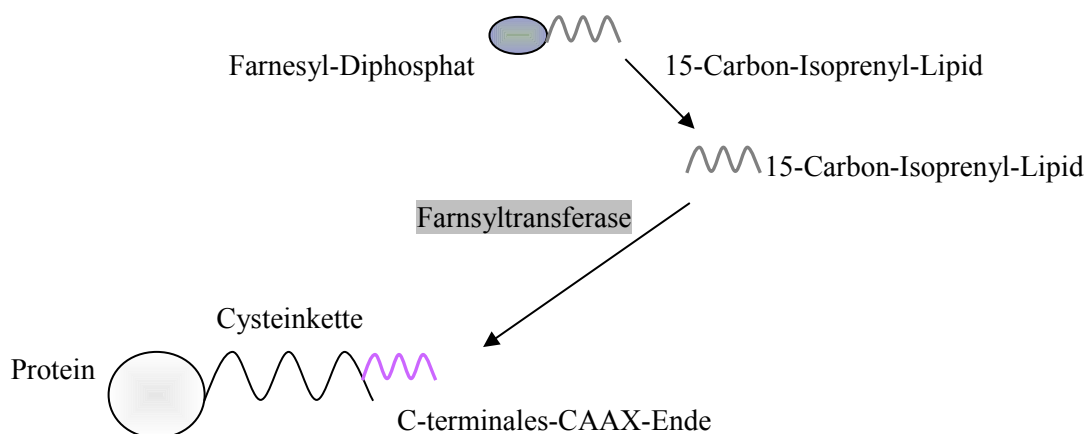


Abb. 1.3.1: Farnesyltransferase (FT): Übertragung eines 15-Carbon-Isoprenyl-Lipides von Farnesyl-Diphosphat an das C-terminale-CAAX-Ende der Cysteinkette des Substrates (Basso et al., 2005); durch diese posttranslationale Modifikation ist durch Alkylierung und/oder Prenylierung die Verankerung der Proteine in Membranen möglich (Mitsch, 2003).

1.3.2 Ras-Proteine als Onkogene

Als GTPasen sind RAS-Proteine an Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt. Derzeit unterscheidet man die RAS-Isoformen H (Harvey)-ras, N (neuronal)-ras und K (Kirsten)-ras (O'Meara et al., 2005), welche für unterschiedliche Signaloutputs verantwortlich sind (Omerovic et al., 2008). Durch Mutation verliert Ras seine eigentliche, regulatorische Fähigkeit und kann durch permanente Aktivierung zu unkontrolliertem Zellwachstums führen (Harousseau, 2007).

Zur Verankerung von Ras in der Zellmembran und vollständigen Aktivierung muß das Protein zunächst prenyliert werden. Nach der Farnelysierung erfolgt die Proteolyse der Carboxyl-AAX-Aminosäure und die Carboxymethylierung des Carboxy-terminalen Cysteins, was dazu führt, daß das Carboxy-terminale Ende hydrophobischer wird (Basso et al., 2005).

Mutationen des Ras-Genes finden sich in über 30% aller beim Menschen bekannten Neoplasien (O'Meara et al., 2005). Letztendlich führt eine RAS-Aktivierung unter anderem über die Raf-MEK-MAPK-Kaskade und den PI3K-AKT-Weg (Harousseau, 2007) durch Beeinflussung zytoplasmatischer und nuklearer Prozesse zu gesteigerter Proliferation und Angiogenese sowie Hemmung der Apoptose (Grace et al., 2005). Ohne Farnesylierung ist Ras biologisch inaktiv (Glass et al. 2000).

1.3.3 Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI)

FTI verhindern die Farnesylierung von H-Ras, also somit die Verankerung in der Zellmembran und damit die durch H-Ras induzierten Zelltransformationen. Zunächst wurden FTI vor dem Hintergrund einer erhöhten Ras-Mutationsrate als potentiell antineoplastische Substanzen entwickelt (Grace et al., 2005).

Mehrere Studien verweisen jedoch darauf, dass das Ras-Protein nicht der einzige bzw. der Hauptangriffspunkt von Farnesyltransferaseinhibitoren sein könnten; eine mögliche Erklärung für die durch FTI induzierte Aktivitätshemmung verschiedener Downstream-Ziele von Ras, wie zum Beispiel von Erk und Akt (Caraglia et al., 2004). Es konnte entgegen der initialen These, Lonafarnib sei durch Inhibition der Ras-Farnesylation

antitumorös wirksam, sogar gezeigt werden, daß die klinische Aktivität von FTI möglicherweise sogar unabhängig vom Ras-Mutationsstatus sein könnte (Marcus et al. 2005).

Lonafarnib (1-piperidinecarboxamide, 4-[2-[4-(3,10-dibromo-8-chloro-6,11-dihydro-5*H*-benzo[5,6]cyclohepta[1,2-*b*]pyridin-11-yl)-1-piperidinyl]-2-oxoethyl]) (Ghosal et al., 2006) ist ein selektiver, nonpeptischer, trizyklischer CAAX-kompetitiver Farnesyltransferaseinhibitor. Im Tierversuch konnte die antitumoröse Wirkung gezeigt werden; derzeit befinden sich FTI auch in der klinischen Testphase (siehe AGO-Ovar-15-Studie). Lonafarnib ist oral verfügbar und sowohl in Ras-abhängigen als auch in Ras-unabhängigen Neoplasien wirksam (Harousseau, 2007).

FTI zeichnen sich durch geringe Toxizität aus (Ebenezer et al., 2005). Eine hohe Effizienz von FTI zeigte sich bislang vor allem in der Therapie von bestimmten hämatologischen Neoplasien und Brustkrebs, jedoch weniger erfolgreich bei der Behandlung von soliden Tumoren mit einer hohen Inzidenz von Ras-Mutationen (Pankreas, Colon) (Harousseau, 2007). Eine mögliche Erklärung für diese klinische Einschränkung könnte in der durch Hemmung der Farnesyltransferase induzierten gesteigerten Geranylgeranylation von Proteinen wie Ras liegen (sogenannte alternative Prenylierung) (Peterson et al., 2006). Darüberhinaus könnte Ras auch nicht – wie initial angenommen - den Hauptangriffspunkt der FTI darstellen, sondern weitere farnesylierte Proteine wie kleine G-Proteine (z.B. Rho-Proteine) oder zentromer-Binding-Proteine (Harousseau, 2007). Es fehlen bislang Studien, die den genauen Wirkmechanismus, welcher, wie oben beschrieben, nicht vom Ras-Mutationsstatus abhängig zu sein scheint, evaluieren.

Unter Einfluss von FTI läßt sich eine veränderte Mobilität von H-Ras auf SDS-Polyacrylamide-Gelen feststellen; es ist jedoch durch die alternative Prenylierung schwierig, veränderten Prozessierungen der anderen Ras-Isoformen nachzugehen (Adjei et al. 2000).

Eine Möglichkeit, die Hemmung der Farnesyltransferase deutlich zu machen, ist, die Inhibition von anderen Substraten des Enzyms nachzuweisen. In Studien zeigte sich, daß FTI die Farnesylierung von Prelamin A in buccalen Mukosazellen hemmen (O'Meara et al., 2005). Weiterhin läßt sich eine Abnahme der Aktivität der Farnesyltransferase messen (Ebenezer et al., 2005). Auch das Heat-Chock-Protein HDJ-

2 stellt einen geeigneten Marker dar (O'Meare et al., 2005). Als Substrat der Farnesyltransferase zeigt bei Inhibition dieses Enzyms das unfarnelysierte Protein eine reduzierte elektrophoretische Mobilität (Ready et al., 2007).

Ein 11-50 prozentiger Anstieg von HDJ-2 ließ sich in chirurgischen Proben von Patienten, welche mit Lonafarnib in Dosierungen von 100, 200 oder 300mg zweimal täglich behandelt worden waren, erkennen (O'Meare et al., 2005).

In pharmakokinetischen Studien liegt die verwendete Dosierung von Lonafarnib zwischen 1 bis 1,5µM bis zu 5µM, womit eine Annäherung an klinische Dosierungen erreicht werden kann (Ebenezer et al., 2005). In-vitro-Behandlung mit Lonafarnib führt zu einem dosisabhängigen G2-Arrest von Glioblastomzellen, Lungenkarzinom- und Fibrosarkomzellen (Glass et al., 2000).

1.4 Flavopiridol – ein Kinaseinhibitor

1.4.1 Zyklinabhängige Kinasen (CDKs)

CDKs sind während der Mitose an der Zerlegung der Kernhülle, an Spindelaufbau und Organisation, Chromosomenkondensation und der Fragmentierung des Golgiapparates beteiligt (Rahal et al., 2008).

CDKs phosphorylieren Proteine an Serin (CDK-2)- und Threoniaminosäureresten. Durch Bindung eines Cyclins an eine CDK entsteht der aktive Cyclin-abhängige-Kinase-Komplex. Sie verfügen über eine katalytische (cdk) und eine entsprechend regulatorisch wirksame Untereinheit (Zyclin). An der katalytischen Untereinheit findet sich die ATP-Bindungstasche. Durch Phosphorylierung der ATP-Bindungstasche wird die Kinase aktiviert.

CDK

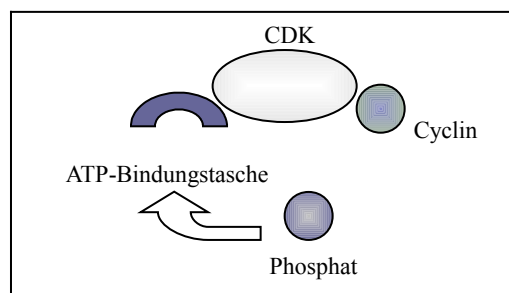


Abb. 1.4.1: Cyclinabhängige Kinasen: Bindung eines Cyclins an eine CDK und Aktivierung durch Phosphorylierung der ATP-Bindungseinheit

Wirkmechanismus von Flavopiridol

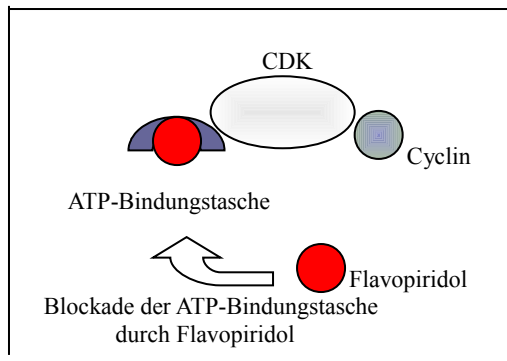


Abb. 1.4.2: Inhibition der CDK durch Flavopiridol durch Blockade der ATP-Bindungseinheit

Flavopiridol blockiert auf direktem Wege die Wirkung dieser Kinasen, da es die ATP-Bindungsstellen besetzt (Newcomb, 2004). Insbesondere die cyclinabhängige Kinase 4 (CDK, *cyclin dependent kinase*) scheint durch die Substanz beeinflussbar zu sein, in geringerem Ausmaße auch CDK 1 und 2 (Pérez-Roger et al., 2000).

1.4.2 Flavopiridol

Flavopiridol (5,7-Dihydroxy-8-(4-N-Methyl-2-Hydroxypyridyl)-6'-Chloroflavon Hydrochlorid) (Newcomb, 2004) ist ein halbsynthetisches Derivat von Rohitukine, ein aus indischen Pflanzen isoliertes Alkaloid (Mayer et al., 2005). Strukturell ist es mit einer aus der Pflanze *Dysoxylum binectariferum* isolierten Verbindung verwandt (Raju et al., 2003). Es agiert als Inhibitor von Thyrosin- und Serinkinasen (Newcomb, 2004) und verschiedener zyclinabhängiger Kinasen. In hohen Dosen hemmt es den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor und Proteinkinasen (Shapiro et al., 2001). In vivo sind auftretende Diarrhoen dosislimitierend (Innocenti et al., 2000).

Flavopiridol führt in vitro zu einem Zellzyklusarrest. Je nach untersuchtem System zeigt sich ein G1 – und G2-Phasen-Arrest und einer Verminderung der CDK2-Aktivität. Darüberhinaus kann es auch eine von p53-unabhängige Apoptose induzieren (Shapiro et al., 1999).

Es lassen sich synergistische Effekte bei der Kombination mit Docetaxel und Flavopiridol mit anschließender Radiatio nachweisen (Kim et al., 2004). In einer Phase-I-Studie konnte die synergistische Wirkung von Flavopiridol und Doxorubicin auf Sarkomzellen in vitro und vivo nachgewiesen werden (Luke et al., 2012).

Mittlerweile befindet sich Flavopiridol in verschiedenen Phase-II-Studien, in welchen seine Effizienz u.a. bei akuter myeloischer Leukämie (Karp et al., 2012), in Kombination mit Cisplatin bei Platin-resistenten Ovarialkarzinom und primärer Peritonealkarzinose (Bible et al., 2012) sowie zusammen mit Irinotecan zur Therapie bei p53-wild-type-Magenadenokarzinom (Shah et al., 2012) untersucht wird.

P-TEFb ist eine Kinase, welche durch Phosphorylierung eine Aktivierung der RNA-Polymerase II bewirkt (Bible et al., 2005). Flavopiridol hemmt P-TEFb-Aktivitäten, eventuell auf indirektem Weg über Inhibition der CDK 9. Dies führt zu einer geringen transkriptionalen Elongation von mRNA Arten mit kurzen Halbwertszeiten, was folgende Transkriptionsprodukte beeinflusst. Diese Reduktion von P-TEFb ist in Zusammenhang zu bringen mit der Verminderung von Cyclin 9 und der Expression verschiedener antiapoptotischer Proteine (Lü et al., 2004). Dieser Mechanismus scheint teilweise durch Interaktionen mit den kompetitiven Proteinen Bcl-2 und Bax assoziiert zu sein (Li et al., 2000).

Als Antagonist der CDK1 hemmt es kompetitiv ATP, was wiederum den Zellzyklus noch vor dem Eintritt in die S- oder M-Phase hemmt. Durch Veränderung der CDK1 wird der Übergang von der G2- in die M-Phase gestört und bewirkt einen verzögerten Eintritt in die S-Phase (Aklilu et al., 2003).

Durch Bindung von Cyclin an die CDK-4 erfolgt eine Aktivierung des Komplexes. Cyclin 1 wird für die Transformation von erb-B2 benötigt. Erb-B2 wird u.a. in Ovarialkarzinomzellen überexprimiert, so daß ein Zusammenhang zwischen erb-B2 und Regulation des Cyclin D1-CDK-Komplexes vermutet werden kann. Flavopiridol hemmt CDK-Aktivitäten, senkt Cyclin 1-Protein-Level und erb-B2-Rezeptor-Level. Im Tierversuch zeigen sich Mäuse, denen Cyclin D1 fehlt, resistent gegenüber erb-B2 vermittelter Tumorentstehung. Insbesondere CDK4/6 Aktivität spielt eine Rolle bei durch erb-B2 vermittelter Transformation und führt reziprok zu einer Verminderung von erb-B2-Rezeptor-Leveln (Nahta et al., 2002).

1.4.3 Antiproliferativer Effekt

Flavopiridol hemmt nicht nur Cyclin-anhängige Kinasen, sondern auch eine Vielzahl von Genprodukten, die mit der Suppression von Apoptose und mit Tumorwachstum

assoziiert werden (Takada et al., 2008).

So hemmt es u.a. die durch TNF (tumor necrosis factor) vermittelte NF- κ B-Aktivierung (Takada et al., 2008). Die Suppression von NF- κ B kann wiederum Tumorzellen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung sensibilisieren (Garg et al., 2005). Darüberhinaus unterdrückt Flavopiridol die AP-1-Aktivierung, die durch eine Vielzahl von Karzinogenen und inflammatorischen Reizen induziert wird, desweiteren supprimiert es die Expression einer Vielzahl antiapoptotischer Proteine (IAP-1, IAP-2, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL und TRAF-1) (Takada et al., 2008) und die TNF-induzierte Akt-Aktivierung (Takada et al., 2004).

P-Akt wiederum wird durch Phosphorylierung aktiviert und ist an Zellprozessen wie Proliferation, Apoptose und Migration beteiligt, so dass beispielsweise hohe Konzentrationen dieses Proteins mit dem Überleben von Zellen assoziiert sind (Newcomb, 2004). Diese Mechanismen führen letztendlich zu einer Unterdrückung von antiapoptotischen Vorgängen und einer Apoptoseverstärkung (Takada et al., 2008).

1.5 Synergismus

1.5.1 Polychemotherapie

Derzeit besteht die Standardbehandlung des Ovarialkarzinoms in einer kombinierten Chemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel (s.o.). Eine Phase-III-Studie, bei welcher Topotecan additiv zu o.g. Substanzen gegeben wurde, zeigte keinen Erfolg in Bezug auf Effizienzverbesserung der Standardtherapie (untersuchte Parameter waren hierbei u.a. Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit und progressionsfreier Abschnitte); es fanden sich im Gegenzug sogar eine Verstärkung der hämatologisch-toxischen Nebenwirkungen sowie erhöhte Infektionsraten (Pfisterer et al., 2006).

1.5.2 Synergismus bei Chemotherapie und Biologicals

Bei rezidivierendem Ovarialkarzinom ist der Therapieerfolg insbesondere von der Empfindlichkeit gegenüber platinhaltigen Substanzen abhängig; Patientinnen, die unter platinrefraktären Tumoren leiden, haben dementsprechend eine deutlich reduzierte Prognose. Umso bedeutsamer ist es, die Ursachen ausfindig zu machen, die die Mechanismen dieser verminderten Ansprechbarkeit begründen, um darauf basierend alternative Möglichkeiten (z.B. Targeting-Therapy) zu finden.

Ein Ansatzpunkt der molekularen Therapie liegt hierbei in der PI3K/Akt-Kaskade: als Signal-Transduktions-Kaskade ist sie am Zellwachstum beteiligt. Bei Akt-Inaktivierung kommt es bei humanen Ovarialkarzinomzellen in vitro zu einer Cisplatin-Sensibilierung (Ohta et al., 2006).

Wortmannin, ein PI3K-Inhibitor, blockiert bei Ovarialkarzinomzell-in-vivo-Modellen (Aszites von athymen Nacktmäusen, denen eine humane Ovarialkarzinomzelllinie inokuliert wurde) die Akt-Phosphorylierung und Downstream-Targets der PI3K/Akt-Kaskade (BAD und NFκB) (Ohta et al., 2006). Die Kombination von Cisplatin mit Wortmannin führt zu einer deutlicheren Reduktion der Aszitesproduktion als die alleinige Behandlung mit den jeweiligen Substanzen; ebenso wird in vivo die Tumorimplantation in Leber und Peritoneum effizienter gehemmt und die Anteil der apoptotischen Zellen vergrößert (Ohta et al., 2006).

1.5.3 Kombination von Lonafarnib mit anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen

Kombinationen des FTI Lonafarnib mit Cylyophosphamiden, 5-Fluorouracil, Vincristin, Cisplatin und Taxanen zeigen in präklinischen Studien eine Steigerung des antiproliferativen Effekts (Lee et al., 2004). Der Synergismus von Taxanen und Lonafarnib beruht vermutlich auf einer Interaktion von Mikrotubuli und dem eigentlichen Wirkmechanismus des FTI, denn durch den FTI wird u.a. die normale mikrotubuläre Spindelformation gehemmt und die entsprechend behandelten Zellen zeigen unabhängig von p53- und Ras-Status einen Arrest in der frühen Mitosephase (Marcus et al., 2005).

Desweiteren verstärkt Lofarnib den antiproliferativen Effekt von Paclitaxel bei Behandlung von Ovarialkarzinomzellen durch Potenzierung des durch Paclitaxel-bedingten mitotischen Arrest und der Apoptose (Taylor et al., 2008).

Bei gleichzeitiger Behandlung von Multiplen-Myelomzellen mit FTI und dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib läßt sich unter experimentellen Bedingungen ein dosisabhängiger Synergismus der beiden Substanzen ausmachen (die Dosierungen im Bereich zwischen 3 bis 5µM liegen hierbei weit über den in dieser Studie benutzten). Dabei kommt es zu einer schnelleren und frühzeitigeren Kaspase-Aktivierung als bei alleiniger Behandlung mit den Einzelsubstanzen; konkordant zum raschen Zelltod auch

zu einer frühzeitigen Reduktion von p-AKT. Die Downregulierung von p-AKT ist darüber hinaus mit einer Downregulierung verschiedener anderer Downstreamtargets verbunden, wie zum Beispiel GSK $\alpha\beta$, jedoch kommt es gleichzeitig mit Downregulierung von p-AKT zu einer Hochregulierung der Inhibition des gesamten PI3K-Weges, was Auswirkung auf das Überleben maligner T-Zellen haben kann (Ebenezer, et al., 2005).

In vitro lassen sich bei Behandlung einiger humaner Zelllinien mit der Kombination von Paclitaxel und dem Farnesyltransferaseinhibitor synergistische Effekte nachweisen, ebenso vermag Lonafarnib in vivo die zytostatische Wirkung von Paclitaxel zu steigern. Dieser Synergismus ist möglicherweise durch die Verstärkung der Tubulin-Acetylation bedingt. Paclitaxel und Lonafarnib, das bei der Elimination primär ein Substrat des Enzyms CYP3A4 ist, beeinflussen sich nicht gegenseitig in ihrem jeweiligen Metabolismus (Ready et al., 2007).

Synergistische Effekte lassen sich also bei der Kombination von Lonafarnib mit solchen Substanzen vermuten, deren Wirkmechanismus auf Beeinflussung eines anderen Weges beruht oder solchen Substanzen, die die von Lonafarnib induzierten antiproliferativen Vorgänge maximieren.

1.5.4 Kombination von Flavopiridol mit anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen

Studien weisen darauf hin, daß Flavopiridol nicht nur selbst als Substanz zytotoxische Eigenschaften besitzt, sondern die Zytotoxizität anderer Medikamente zu steigern vermag (Bible et al., 2005).

Der Anti-erbB2 monoclonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der mittlerweile bei der Therapie von erb B2 (her-2/neu) expremierenden Mammakarzinonen zum Einsatz kommt, interagiert mit Flavopiridol insofern, als daß bei erbB2-überexpremierenden Zelllinien ein C.I. Wert von <1.0 erzielt werden kann (Nahta et al., 2002).

Das Gen erbB2 kodiert ein Glykoprotein, welches zur EGFR -Familie der Tyrosin-Rezeptor-Kinasen zählt, die wiederrum am Prozess der lateralen Signaltransduktion und damit an Mitogenese, Apoptose, Angiogenese und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Trastuzumab greift als monoklonaler Antikörper an der extrazellulären Domäne des

erbB2-Tyrosin-Kinase-Rezeptors an.

Die Beobachtung, daß Cyclin-D1-defiziente Mäuse resistent gegenüber erbB2-vermittelter Tumorgenese sind, läßt vermuten, daß Therapien, die Cyclin D1 als Ansatzpunkt haben, ebenso erbB2 beeinflussen. Demnach müssten sich also die antiproliferativen Eigenschaften von Trastuzumab und Flavopiridol, das als CDK-Inhibitor unter anderem an der CDK4 ansetzt, welche wiederum mit Cyclin 4 interagiert, ergänzen; so vermag Trastuzumab Cyclin D1 mRNA und Proteinlevel im gleichen Sinne zu reduzieren wie Flavopiridol erbB2-Rezeptor-Level minimiert. Offensichtlich liegt also hier eine möglicherweise synergistische Interaktion der beiden Substanzen vor (Nahta et al., 2003).

1.5.5 Interaktionsmodell

Anhand des Interaktionsmodells von Chou und Talalay lässt sich der Medikamenten-Kombination-Index-Wert (drug combination index value, C.I.) abschätzen: Ein C.I. kleiner als 1.0 spricht für Synergismus; also einem Wert, bei dem per definitionem die Kombination beider untersuchter Substanzen einen höheren therapeutischen Effekt erzielt als die reine Addition der Effekte der Einzelsubstanzen (Nahta et al., 2002).

Verhalten sich zwei Substanzen synergistisch so heißt dies, daß die erforderliche Einzeldosis jeder einzelnen Substanz zum Erreichen eines bestimmten Effektes niedriger ist, als in der Kombination. Eine solche superadditive (oder synergistische) Wirkung ist klinisch bedeutsam. Es lassen sich außerdem Informationen zu Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen gewinnen (Tallarida et al., 1999).

1.5.6 Berechnung der Interaktionsindizes (nach Tallarida)

$$a/A + b/B = \gamma$$

A = Dosis der Einzelsubstanz A, welche den spezifischen Effekt erzielt

B = Dosis der Einzelsubstanz B, welche den spezifischen Effekt erzielt

a und b = Kombinationsdosis, welche den spezifischen Effekt erzielt

Bei $\gamma < 1$ liegt eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen vor, bei $\gamma = 1$ addieren sich die Wirkungen der beiden Medikamente und bei $\gamma > 1$ ist nicht von Synergismus der Substanzen auszugehen (Tallarida, 2002).

1.6 Zielsetzung

Aufgrund des bei Diagnosestellung oftmals fortgeschrittenen Tumorbefundes benötigen die meisten Patienten nach chirurgischer Intervention zusätzliche Therapie. Über 70% dieser Patienten sprechen zwar primär auf eine Chemotherapie an, doch entwickelt die Großzahl letztendlich Resistenzen. Insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenem Befund unter 30% (Stakleff et al., 2012).

Trotz sich in den letzten Jahren verbessernder Prognose stirbt somit immer noch der überwiegende Anteil der Frauen, die an einem Ovarialkarzinom erkranken.

Gerade bei fortgeschrittenen malignen Ovarialtumoren sind die Möglichkeiten der Chemotherapie begrenzt. Umso bedeutsamer ist die Erforschung neuer Therapieoptionen. Gerade die Möglichkeiten der Targeted-Therapy bei Ovarialkarzinomen sind bislang noch nicht ausreichend untersucht; die Studienlage diesbezüglich ist unzureichend. Ziel der Forschung muß sein, effizientere Therapien zu entwickeln.

Die hier untersuchten Substanzen Flavopiridol und Lonafarnib gelten als vielversprechende antiproliferativ wirksame Medikamente; beide sind gegenwärtig Gegenstand zahlreicher Studien. Bislang fehlen jedoch Untersuchungen zu möglichen synergistischen Effekten von Flavopiridol und Lonafarnib bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen.

Die vorliegende Studie untersucht erstmals die Kombination der beiden Substanzen in Hinblick auf synergistische antiproliferative Effekte und Veränderungen von Zellzyklus sowie Apoptose- und Nekroseinduktion bei humanen Ovarialkarzinomzellen in vitro.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Charakterisierung der Zelllinien:

2.1.1.1.1 SKOV-3-Zellen

Die SKOV-3-Zelllinie ist eine humane Ovarialkarzinomzelllinie. Es handelt sich um Adenokarzinomzellen, die zwar östrogenrezeptorpositiv, aber östrogeninsensitiv sind und sich durch adhärentes Wachstum auszeichnen.

2.1.1.1.2 BG-1-Zellen

Die BG-1-Zelllinie ist ebenfalls eine humane Ovarialkarzinomzelllinie.

Adenokarzinomzellen sind östrogenrezeptorpositiv und –sensitiv und wachsen adhärent.

Die Zelllinie ist ein Geschenk der Universität Bonn.

2.1.1.2 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze	
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
FCS	Biokrom AG	Berlin, GER		
Na-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU		
Einfriermedium				10% DMSO
			+	90% FCS
DMSO	Sigma	Steinheim, GER		
Zellkultur-Färbelösung zur Zellvitalitätsprüfung				54% PBS
			+	36 Trypanblau 0,4%
			+	10% Zellsuspension

PBS	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AU	
Trypanblau	Sigma	Steinheim, GER	
Ampuva	Braun	Melsungen, GER	

2.1.1.3 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
Zellbank Hera safe	Heraeus	Hanau, GER
Zentrifuge	Heraeus	Hanau, GER
Wasserbad	GFL	Burgwedel, GER
	Heraeus	Hanau, GER
Brutschrank Hera cell	Heraeus	Hanau, GER
Mikroskop ID03	Zeiss	Jena, GER
Zählkammer Neubauer improved	planoptik	Jena, GER
Pipetten Pipetman 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Pipetboy	Integra Biosciences	Ferwald, GER
Fireboy plus	Integra Biosciences	Ferwald, GER
Stickstofftank Locator junior plus	Barnstead	Dubuque, USA

2.1.1.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Ort
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, GER
Zellschaber mittel, groß	Sarstedt	Newton, USA
PP-Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Gewebekulturflasche 250ml, 550ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Pipetten 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Cyo-Tube	Nunc	Roskilde, DK

2.1.2 Proliferationsassays

2.1.2.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze
Lonafarnib	Schering Plough	Kenilworth, NJ, USA	
Flavopiridol	Sanofi- Aventis,	Frankfurt, GER	
Glutaraldehyd 25%	Merck	Darmstadt, GER	
Kristallviolett 0,05%			0,5% Kristallviolett
			+ 25% Methanol
			+ 75% Ampuwa
Entfärberlösung			0,1M Natriumcitrat
			+ 50% Ethanol
			+ 50% Ampuwa
Kristallviolett	Sigma	Steinheim, GER	
Methanol	Merck	Darmstadt, GER	
Ethanol	Roth	Karlsruhe, GER	
Natriumcitrat	Roth	Karlsruhe, GER	

2.1.2.2 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
Photometer	Tecan	Grödig, AU
ELISA-Software Magellan	Tecan	Grödig, AU
Schüttler	Heidolph	Schwabach, GER
Multipipette	Eppendorf	Hamburg, GER
Transferpipette	Brand	Wertheim, GER

2.1.2.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Ort
Gewebekulturplatten 96well	Greiner	Frickhausen, GER
Ritips 1,25	Ritter	Schwabmünchen, GER
Ritips 2,5	Ritter	Schwabmünchen, GER

Ritips 5	Ritter	Schwabmünchen, GER
Ritips 12,5	Ritter	Schwabmünchen, GER
Gewebekulturschalen 100	Greiner	Frickenhausen, GER

2.1.3 Annexin-V-Versuch

2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze
Propidiumbromid Stammlösung			1 mg/ml H ₂ O
Propidiumbromid	Calbiochem	Darmstadt, GER	
FACS-Clean	BD Biosciences	San Jose, USA	
FACS-Rinse	BD Biosciences	San Jose, USA	
FACS-Flow	BD Biosciences	San Jose, USA	
Annexin-V-FLOUS Staining Kit	Roche	Penzberg, GER	

Produkt	Hersteller	Ort
FACS Calibur	BD Biosciences	San Jose, USA
Vortexer	Heidolph	Schwabach, GER
Auswertungssoftware Cell Quest Pro	BD Biosciences	San Jose, USA

2.1.3.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Ort
FACS-Röhrchen 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Falcon	Franklin Lakes, USA
Gewebekulturplatte 6 well	Greiner	Frickenhausen, GER

2.1.4 Zellzyklusanalyse

2.1.4.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Ort	Ansätze
Waschpuffer			PBS
			+ 0,01% NaN ₃

			+	2% FKS
NaN3	Serva	Heidelberg, GER		
RNase Stammlösung				1 mg/ml H2O, 5 min 100°C
RNase	Serva	Heidelberg, GER		
Propidiumbromid Stammlösung				1 mg/ml H2O,
Propidiumbromid	Calbiochem	Darmstadt, GER		
Fixierlösung				70% Ethanol
			+	30% Ampuwa
FACS-Clean	BD Biosciences	San Jose, USA		
FACS-Rinse	BD Biosciences	San Jose, USA		
FACS-Flow	BD Biosciences	San Jose, USA		

2.1.4.1 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
FACS Calibur	BD Biosciences	San Jose, USA
Vortexer	Heidolph	Schwabach, GER
Auswertungssoftware Cell Quest Pro	BD Biosciences	San Jose, USA

2.1.4.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Ort
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon	Franklin Lakes, USA
Polystyrene Round-Bottom Tube		
Gewebekulturplatte 6 well	Greiner	Frickenhausen, GER

2.1.5 Western Blot

BM Chemiluminescence WB Kit (mouse/rabbit)

2.1.5.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Ort
Acrylamid	Roth	Karlsruhe, GER
APS	Merk	Darmstadt, GER

Bromphenolblau	Serva	Heidelberg, GER
Dry milk	Roth	Karlsruhe, GER
Glycerol	Sigma	Steinheim, GER
Glycin	Serva	Heidelberg, GER
HCl	Merck	Darmstadt, GER
MgCl ₂	Serva	Heidelberg, GER
Methanol	Merck	Darmstadt, GER
NaCl	Merck	Darmstadt, GER
PMSF	Fluka	Neu-Ulm, GER
SDS	Serva	Heidelberg, GER
TEMED	Roth	Karlsruhe, GER
Tris Hcl	Serva	Heidelberg, GER
Triton X-100	Bio Rad	Hercules, USA
Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Serva	Heidelberg, GER
Tween 20	Serva	Heidelberg, GER

2.1.5.2 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
Gel Kammer	Thermo	Bremen, GER
Blotting Kammer	Bio Rad	Hercules, USA
Wärmeblock	Heidolph	Schwabach, GER

2.1.5.3 Ansätze

Ansatz	Material	
Lysispuffer		10mM Tris Hcl pH 8,0
	+	40 mM NaCl
	+	3 mM Mg Cl ₂

	+	1% Triton X-100 pH 8,0
	+	1mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluorid)
Lysispuffer mammalian cells		10mM TrisHCL
	+	140mM NaCl
	+	3mM MgCl ₂
	+	1% Triton x-100
Trenngel, SDS, 12 %ig		3,3 ml H ₂ O
	+	4 ml Acrylamid 30%ig
	+	2,5 ml Tris 1,5M pH 9,2
	+	0,1 ml 10% APS
	+	0,1 ml 10% SDS
	+	TEMED, 0,004 ml
Sammelgel		2,7 ml H ₂ O
	+	0,67 ml 30% Acrylamid
	+	0,5 ml M Tris pH 6,8
	+	0,04 ml 10% SDS
	+	0,04 ml 10% APS
	+	0,004 ml TEMED
1xLämmli-Puffer		15,1 g Tris Base
	+	72 g Glycin
	+	5 g SDS auf 1000 ml H ₂ O
Loading Puffer 4 x SDS reduzierend		2,5 ml 1M Tris pH 6,8
	+	2 ml 40%ig SDS
	+	4 ml Glycerol
	+	0,5 ml H ₂ O
	+	1mg Bromphenolblau zu 90µl Puffer 10µl 2-Mercaptoethanol zusetzen (vor Gebrauch)
Towbin Blot Puffer		3,03 g Tris Base (25 mMol Tris)
	+	14,4 g Glycin (192 mMol Glycin)

	+	1000ml 20%ig Methanol pH 8,3
Blocking Puffer		100 ml PBS
	+	5 g Magermilchpulver
	+	50 µl Tween 20

2.1.5.4 Antikörper

Produkt	Hersteller	Ort
Anti-HDJ-2 (monoklonaler Antikörper gegen HDJ-2)	Calbiochem	Darmstadt, GER
Anti-β-Actin (monoklonaler Antikörper gegen β-Actin)	Sigma	Saint Louis, Missouri, USA
Anti-HIF-1α (monoklonaler Antikörper gegen HIF-1α)	Sigma	Saint Louis, Missouri, USA

2.2 Methoden

Falls nicht anders angegeben wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Das Medium wurde aus RPMI 1640, 10% Fetalem Kälberserum (FKS), 1% Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin hergestellt.

Die beiden Zelllinien SKOV-3 und BG-1 wurden in Medium in 550ml fassenden Gewebekulturflaschen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. (Die Begasung mit 5% CO₂ erfolgte zur Konstanthaltung des pH-Wertes der mit Hydrogencarbonat gepufferten Kulturmedien.) Das sterile Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter Sterilbänken mit vertikalem Luftstrom. Alle Gewebekulturmedien wurden bis zum Verbrauch bei 4°C gelagert und nur vor der Anwendung im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Das Medium, das wöchentlich neu hergestellt wurde, wurde alle 3-4 Tage erneuert. Um Kontamination zu vermeiden stammte das Medium für die beiden Zelllinien aus separaten Mediumflaschen. Erst nach zweimaligen Passagieren wurden die Zellen für Versuche verwendet. Zur Vermeidung von Veränderungen der Zellen durch zunehmende Kulturdauer wurden sie nicht länger als 12 Wochen kultiviert. Um

ausreichend Zellmaterial zur Verfügung zu haben wurden zu Beginn der Arbeit Aliquots von 5×10^6 Zellen in Einfriermedium kryokonserviert.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden umgesetzt, wenn sie 90% konfluentes Wachstum erreicht hatten. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium aus der Gewebekulturflasche entfernt und die Zellen mit 2ml Trypsin bedeckt. Nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 5ml Medium neutralisiert. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenen Pellett wurde abpipettiert und die Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde in eine neue, mit 25ml Medium gefüllte Gewebekulturflasche überführt, oder, je nach Versuch, in Gewebekulturplatten gesetzt.

2.2.1.3 Mediumwechsel

Wenn das Wachstum noch keine 90% erreicht hatte, jedoch das Medium verbraucht war, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Hälfte des Mediums wurde dazu aus der Gewebekulturflasche entnommen und durch das gleiche Volumen frischen Mediums ersetzt.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung über einen längeren Zeitabschnitt wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen mussten vor dem Einfrieren in der logarithmischen Wachstumsphase sein, wurden also frühestens zwei Tage zuvor das letzte Mal passagiert.

Vor der Kryokonservierung wurde mit den Zellen zunächst wie beim Passagieren beschrieben verfahren, jedoch wurde das Zellpellett nach dem Zentrifugieren in gekühltem Einfriermedium resuspendiert. (Zusammensetzung des Einfriermediums: 10% DMSO und 90% FKS; dabei reduziert das lipophile DMSO den Wassergehalt der Zellen und verhindert so die Bildung von Eiskristallen, welche eine Zerstörung der Zellmembran bewirken würden). Für 5×10^6 Zellen wurde dabei 5ml Einfriermedium

verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein 1,8ml Kryoröhrchen überführt und anschließend für 24 Stunden in einem Styroporbehälter bei -80°C gelagert. Daraufhin erfolgte die Umsetzung zur Langzeitlagerung in einen Stickstofftank bei -196°C.

2.2.1.5 Reaktivierung von kryokonservierten Zellen

Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurde aus dem Stickstofftank genommen, für zwei bis drei Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden die Zellen mit 5ml eiskaltem Medium resuspendiert und 10 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen in 25ml Medium überführt.

2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Um bei allen Versuchen die gleichen Bedingungen zu schaffen, ist es notwendig, stets mit der gleichen Zellzahl zu arbeiten. Die Zellzahl in einer Suspension wurde mikroskopisch mithilfe der Neubauer-Kammer ermittelt. Es wurden 10µl Zellsuspension mit 56µl PBS und 36µl 0,4%igem Trypanblau vermischt. Von dieser Mischung wurden 10µl in die Neubauer-Kammer gegeben und die Zellen pro Quadrat ausgezählt. Dabei galt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Da das Volumen in einem Quadrat 0,1µl entspricht, wurde zur Berechnung mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10, so daß die ermittelte Zellzahl pro Kammer mit dem Faktor 10^5 multipliziert wurde, um zur tatsächlichen Zellzahl pro ml zu gelangen.

2.2.2 Proliferationsassays mittels Kristallviolettffärbung

2.2.2.1 Durchführung

Am ersten Tag wurden in 96well Gewebekulturplatten je 1000 Zellen pro well ausgesät, um diese nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank entsprechend der jeweiligen Fragestellung mit unterschiedlichen Substanzen zu behandeln und zu

inkubieren. Diese Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10µl/well 25%igem Glutaraldehyd fixiert, 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert und dann mit je 100µl/well Kristallviolettlösung gefärbt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation auf dem Schüttler wurde die Färbelösung unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proteine der am Boden der wells haftenden Zellen stellten sich violett dar, im Gegensatz zu den ungefärbten Plaques, da abgestorbene Zellen beim Fixieren und anschließendem Waschen entfernt worden waren. Schließlich wurde ins jedes well 100µl Entfärbelösung gegeben und die Platten 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Extinktion bei 560nm im ELISA-Reader.

2.2.2.2 Bestätigung der Abhängigkeit der Extinktion von der Zellzahl

Zur Validierung der Methode wurde zunächst in drei 96well-Mikrotiterplatten aufsteigende Zellzahlen von 1000 bis 20000 Zellen pro well pipettiert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen wie oben beschrieben gefärbt und die Extinktion gemessen. Es zeigte sich hierbei deutlich, daß die Extinktion mit der Zellzahl positiv korreliert. Der Versuch wurde für BG-1 und SKOV-3 je fünfmal voneinander unabhängig durchgeführt.

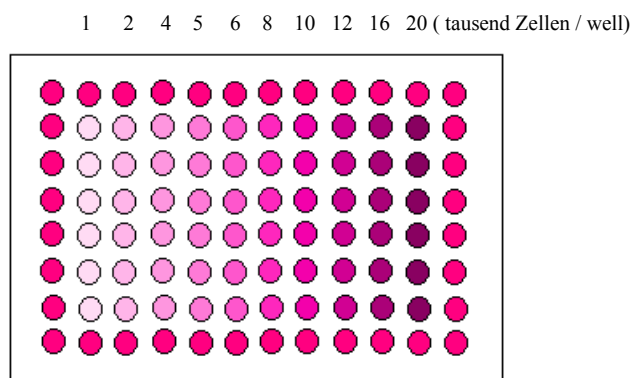


Abb.2.2.1: Pipettierschema Zellzahlabhängigkeit: in jeweils einer senkrechten Reihe wurden die Wells mit der gleichen Zellzahl bestückt; in den an den Rändern der Platten liegenden Wells wurde nur Medium gegeben.

15112005-003 Färbeversuch BG1

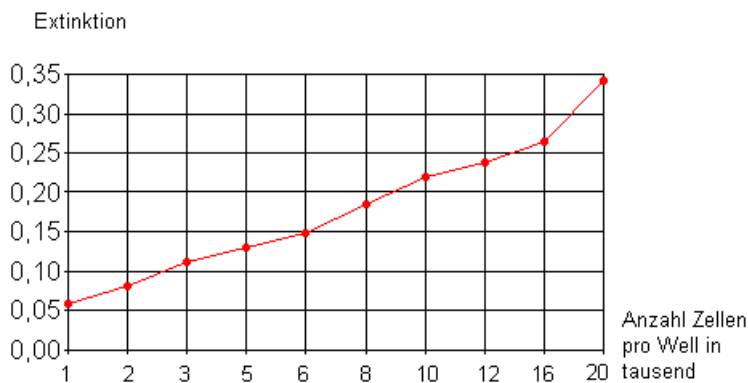


Abb. 2.2.2: Zellzahlabhängigkeit (exemplarische Darstellung der Auswertung eines Versuches): Auf der X-Achse ist die Anzahl der Zellen pro Well in tausend angegeben; auf der y-Achse die Extinktion in nm. Es zeigt sich deutlich, daß die Extinktion abhängig von der Zellzahl ist. Der Versuch wurde fünfmal für jede Zelllinie jeweils unabhängig voneinander durchgeführt.

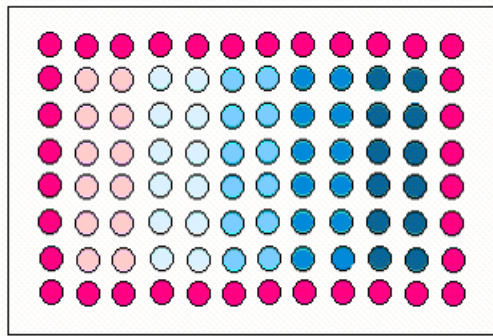
2.2.2.3 Zeitabhängigkeit

Am ersten Tag wurden in 96well-Mikrotiterplatten je 1000 Zellen pro Well pipettiert (jeweils für beide Zelllinien), wobei jedoch nur in die inneren 60 Wells der Platte Zellen gegeben wurden. In die Außenränder, wo die Verdunstung höher ist, wurde nur Medium pipettiert, so daß diese Reihe zur Ermittlung der Leerwert-Extinktion verwendet werden konnten. Die Platten wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit einer sterilen Transferpipette entfernt. Auf je eine Platte wurden dann entweder Lonafarnib oder Flavopiridol in verschiedenen Konzentrationen, gelöst in Medium, auf die Zellen pipettiert.

Die Testkonzentrationen der beiden Medikamente waren:

1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M und 1nM (10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M und 10^{-9} M).

Je zwei Reihen pro Platte wurden mit derselben Konzentration bestückt, zwei weitere Reihen dienten als Kontrolle, denn hier wurde das Medium nur mit dem Lösungsmittel der Medikamente (DMSO in der Konzentration 10^{-6} M) versetzt.



Kontrolle 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6}

Abb. 2.2.3: Pipettierschema Zeitversuche: die äußeren wells der Mikrotiterplatte enthalten je $100\mu\text{l}$ Medium; jeweils zwei innen davon gelegene Reihen enthalten dieselbe Konzentration eines Medikaments; es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Herstellung der verschiedenen Medikamentenkonzentrationen wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe durchgeführt: ausgehend von der höchsten Konzentration der in Medium gelösten Substanz wurden die niedrigeren Konzentrationen durch Verdünnung angesetzt. Nach zwei, vier, sechs und acht Tagen Inkubation im Brutschrank wurden je zwei Platten pro Zelllinie mit Kristallviolett gefärbt und die Extinktion bestimmt (wie oben beschrieben), wobei am vierten Tag bei den noch verbliebenen Platten das Medium abgenommen und durch frisches, wieder mit denselben Konzentrationen der beiden Medikamente angereichertes, Medium ersetzt worden war. Der Versuch wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.2.4 Konzentrationsabhängigkeit

Wie auch bei den Versuchen zur Zeitabhängigkeit wurden am ersten Tag 96-well-Mikrotiterplatten mit 1000 pro Well bestückt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium entfernt und die beiden Medikamente in verschiedenen Konzentrationen, wiederum in Medium gelöst, auf die Zellen gegeben.

Sowohl Lonafarnib als auch Flavopiridol wurden in Konzentrationen von $0,01\text{nM}$ (10^{-11}M), $0,1\text{nM}$ (10^{-10}M), 1nM (10^{-9}M), 5nM ($5 \times 10^{-9}\text{M}$), 10nM (10^{-8}M), 50nM ($5 \times 10^{-8}\text{M}$), $0,5\mu\text{M}$ ($5 \times 10^{-7}\text{M}$), $0,1\mu\text{M}$ (10^{-7}M) und $1\mu\text{M}$ (10^{-6}M) verwendet. Dabei wurde auf jeder Platte neben je einer Reihe (entsprechend sechs wells) pro Konzentration auch eine Kontrollreihe mitgeführt, die $1\mu\text{M}$ DMSO, gelöst in Medium, enthielt. Auch bei

diesem Versuch wurde in die Außenränder der Platte wieder nur Medium pipettiert.

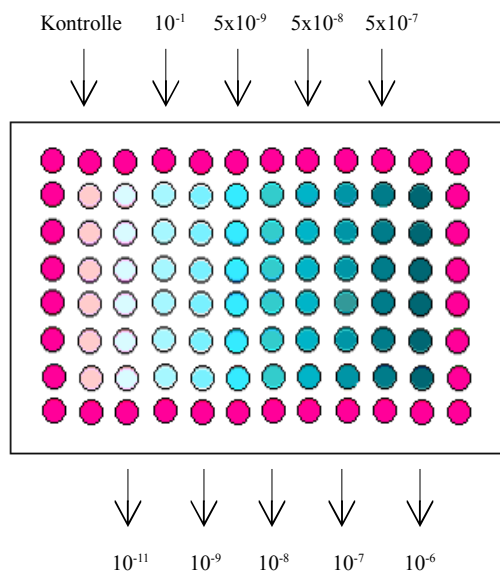


Abb. 2.2.4: Pipettierschema Konzentrationsversuche: die äußeren wells der Mikrotiterplatte enthalten je 100µl Medium; jeweils eine innen davon gelegene Reihe enthält dieselbe Konzentration eines Medikaments; es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die abnehmenden Medikamentenkonzentrationen wurden, wie schon bei den Zeitabhängigkeitsversuchen, mithilfe einer Verdünnungsreihe hergestellt. Nachdem die Substanzen ausplattiert worden waren wurden die Platten 4Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um dann die Färbung mit Kristallviolett und die Auswertung am Photometer vorzunehmen. Die Versuche wurden viermal voneinander unabhängig durchgeführt.

2.2.2.5 Synergismusversuche

Am ersten Tag wurden in 96-well-Mikrotiterplatten je 1000 bzw. 2000 Zellen pro well pipettiert. (Bei Versuch 1 und 2 wurden 1000 Zellen pro well ausplattiert; bei Versuch 3 und 4 2000 Zellen pro well, da so eine Verbesserung der Messgenauigkeit der Extinktionswerte erreicht werden konnte, jedoch wurden diese Versuche bei der Auswertung nicht berücksichtigt eben wegen der veränderten Zellzahl; auch Versuch 5 wurde wegen eines Pipettierfehlers nicht gewertet). Für jeden Versuch wurden acht Platten pro Zelllinie angesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Auf je vier Platten wurde Flavopiridol bzw. Lonafarnib in absteigenden

Konzentrationen gegeben. Zusätzlich wurde bei drei der vier Platten aber noch die jeweils andere Substanz in einer festen Grundkonzentration ausplattiert, so daß bei diesen Platten eine Kombination beider Medikamente erzielt wurde.

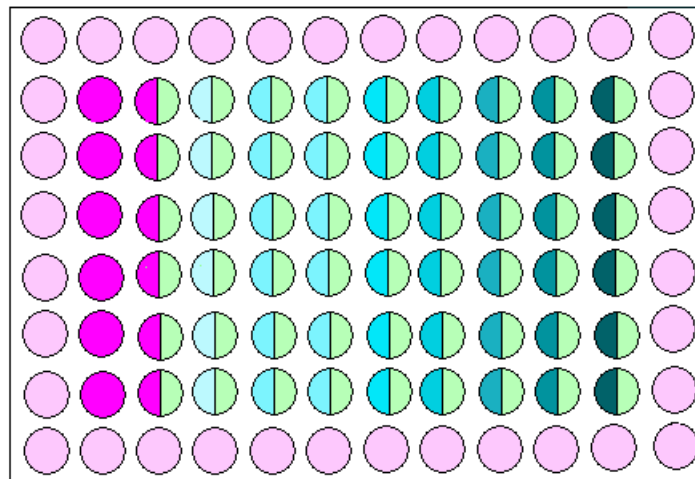
Flavopiridol wurde in folgenden Konzentrationen ausplattiert:

- * 0,01nM (10^{-11} M),
 - * 0,1nM (10^{-10} M),
 - * 1nM (10^{-9} M),
 - * 5nM (5×10^{-9} M),
 - * 0,01 μ M (10^{-8} M),
 - * 0,05 μ M (5×10^{-8} M),
 - * 0,1 μ M (10^{-7} M) und
 - * 0,5 μ M (5×10^{-7} M).
- * Als Grundkonzentration wurde es in 0,01 μ molarer (10^{-8} M), 0,05 μ molarer (5×10^{-8} M) und 0,1 μ molarer (10^{-7} M) Lösung verwendet.

Lonafarnib wurde in folgenden Konzentrationen verwendet:

- * 0,1nM (10^{-10} M)
 - * 1nM (10^{-9} M)
 - * 5nM (5×10^{-9} M)
 - * 0,01 μ M (10^{-8} M)
 - * 0,05 μ M (5×10^{-8} M)
 - * 0,1 μ M (10^{-7} M)
 - * 0,5 μ M (5×10^{-7} M)
 - * 1 μ M (10^{-6} M)
- * Als Grundkonzentration wurde es in 0,01 μ molarer (10^{-8} M), 0,1 μ molarer (10^{-7} M) und in 1 μ molarer (10^{-6} M) Lösung verwendet.

Die Kontrollreihe wurde mit 1 μ M DMSO, in Medium gelöst, angelegt.



Konzentrationen		10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	5×10^{-9}	10^{-8}	5×10^{-8}	10^{-7}	5×10^{-7}
Substanz	Kontrolle	F	F	F	F	F	F	F	F
		+	+	+	+	+	+	+	+
		10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
		L	L	L	L	L	L	L	L

$\mu\text{l/well}$ 100 je 50 je 50 je 50 je 50 je 50 je 50 je 50 je 50 je 50

Abb. 2.2.5: Pipettierschema Synergismusversuche: Beispiel einer Platte, bei der Flavopiridol in absteigenden Konzentrationen ($0,5\mu\text{M}$ bis $0,1\text{nM}$) mit Lonafarnib in einer Grundkonzentration von 10nM kombiniert wurde; jeweils eine Reihe (sechs wells) wurde mit derselben Kombination an Substanzkonzentrationen bestückt. Es wurden vier Versuche unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.3 Annexin-V-Versuch

Zur Bestimmung des Anteils an apoptotischen und nekrotischen Zellen in der mit den beiden Substanzen behandelten Population versus der unbehandelten Population wurden zunächst in 6-well-Platten je 2×10^5 Zellen pro well ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit je zwei verschiedenen Konzentrationen von Lonafarnib und Flavopiridol sowie jeweils zwei Kombinationen beider Medikamente versehen.

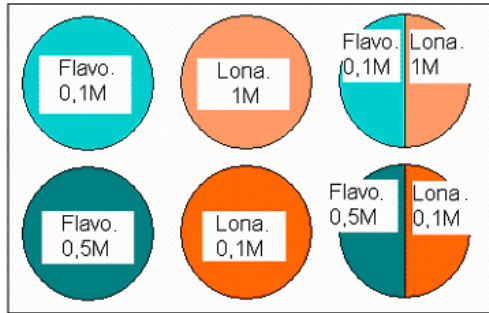


Abb. 2.2.6: Pipettierenschema Annexin-V-Versuch: Auf einer 6-well-Platte wurden je zwei Wells mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Flavopiridol (0,1M und 0,5M) und Lonafarnib (1M und 0,1M) versehen. Zwei weitere Wells wurden mit der Kombination der beiden Substanzen in je zwei verschiedenen Konzentrationen versehen. Auf einer weiteren Platte wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt, in der die Zellen nur mit in Medium gelöstem DMSO (Konzentration 10^{-6} M) bedeckt waren. Es wurden je vier Versuche pro Zelllinie jeweils unabhängig voneinander durchgeführt.

Auf einer zusätzlichen Platte wurden die Zellen eines Wells nur mit in Medium gelöstem DMSO in einer Konzentration von $1\mu\text{molar}$ versehen, um als unbehandelte Kontrollgruppe zu dienen.

Zellen der Linie SKOV-3 wurden 4 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert; BG-1-Zellen wurden zwei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden trypsiniert und 20 Minuten (BG-1) bzw. 25 Minuten (SKOV-3) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde mikroskopisch überprüft, ob die durch Trypsin induzierte Ablösung der Zellen vom Boden ausreichte, um dann die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Medium zu neutralisieren. Die Suspension wurde dem vorher abgenommenem Medium zugeführt und dann zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde dem Zellpellet Medium zugefügt, die Probe kurz aufgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde den Zellen Inkubationspuffer, Annexin-V-Lösung und Propidiumbromid zugefügt. Nach 15 Minuten lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals Inkubationspuffer zugegeben. Im direkten Anschluss erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

2.2.4 Zellzyklusanalyse: Färbung mit Propidiumiodid

In 6-well-Platten wurden je 2×10^5 Zellen/Well pipettiert, um diese dann für 24 Stunden im Brutschrank zu inkubieren. Am darauf folgenden Tag wurden nach Abnahme des Mediums entsprechend dem Pipettierschema des Annexin-V-Versuchs dieselben

Substanzkonzentrationen und ein Kontrollwell ausplattiert.

Nach zwei (BG-1) bzw. vier (SKOV-3) Tagen erfolgte die Analyse mithilfe des FACS-Gerätes. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und bis zur weiteren Verwendung aufgehoben. Die Zellen wurden trypsinisiert, um nach zwei Minuten Inkubation die Trypsinwirkung durch Zugabe von Medium zu neutralisieren. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden gelöst, um die Suspension dann zum vorher abgenommenen Medium zu geben und zu zentrifugieren. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit Waschpuffer versetzt, gevortext und zentrifugiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen unter ständigem Vortexen durch tropfenweise Zugabe von 3ml 70%igem eiskaltem Ethanol fixiert. Nach Ablauf der mindestens einstündigen Inkubationszeit bei 4°C wurde erneut zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die fixierten Zellen wurden mit Waschpuffer gewaschen, gevortext und zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde RNase-Stammlösung zugefügt und gevortext. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C im Wasserbad erfolgte die Färbung mit Propidiumiodid. Die Zellen wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert, um dann die Analyse am FACS-Gerät durchzuführen.

2.2.4.1 Methodik der Durchflußzytometrie

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA, die je nach Zellzyklusphase einer Zelle variiert, interkaliert. Nach entsprechender Anfärbung kann die Zellzyklusanalyse am FACS-Gerät (Fluorescence activated cell sorting) erfolgen, bei der durch eine quantitative DNA-Analyse letztendlich eine Zuordnung zu einer bestimmten Zellzyklusphase erfolgen kann.

2.2.5 Western-Blot

2.2.5.1 Prinzip der Methode

Mithilfe des Western-Blots lassen sich Proteine analysieren. Dazu werden die Proteine zunächst entsprechend ihrer Größe durch Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.5.2 Herstellung der Zellpellets

Die Zellen wurden zunächst geerntet, wobei das verbrauchte Medium aus der

Kulturflasche entfernt wurde, um den Zellrasen dann mit 2ml Trypsin zu bedecken. Nach 2 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Neutralisierung der Trypsinwirkung durch Zugabe von 5ml Medium. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Gewebekulturflasche gelöst.

Die Suspension wurde 10 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, dann der Überstand über dem Zellpellet abpipettiert und mit 5ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1ml PBS resuspendiert, wobei 10µml für die Zellzählung entnommen wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5ml fassendes Eppendorf-Cap überführt und für 5 Minuten bei 250g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet bis zur Lyse bei 20°C gelagert.

2.2.5.3 Lysieren des Zellpellets

Für den Lysispuffer wurden die Ansätze jeweils frisch hergestellt. Vor Verwendung des Puffers wurde dieser zunächst auf Eis vorgekühlt. Die bei 20°C gelagerten Zellpellets wurden nach kurzem Antauen vollständig in Lysispuffer resuspendiert, wobei pro 1×10^6 Zellen 100µml Puffer verwendet wurde. Die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cap überführt, erneut für 10 Minuten bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der nun entnommene Überstand wurde aliquotiert, um ihn anschließend als Lysat verwenden zu können.

2.2.5.4 Antikörper

Anti-HDJ-2 ist ein monoklonaler Antikörper. Er eignet sich zum Nachweis von HDJ-2, einem Protein, welches sich im Zytoplasma und in der nuklearen Membran vieler verschiedener Zelltypen befindet. Es ist bei der Proteinfaltung und der Translokation von Proteinen in den Golgi-Komplex und den Nukleus von Bedeutung. HDJ-2 zählt zu den Hitzeschockproteinen, die an einer Reihe von Zellfunktionen beteiligt sind.

Eingesetzt beim Western Blotting kann Anti-HDJ-2 das 44kDa Protein in humanen sowie in einer Anzahl tierischer Zellen detektieren. Als weiterer Antikörper wurde HIF1 (Hypoxie-induzierbare Faktor 1) verwendet. Dieser ist als Transkriptionsfaktor über die pO_2 -abhängige Expression seiner Untereinheit HIF-1 α an der Steuerung verschiedener Hypoxie-abhängiger Genen beteiligt. Vor allem bei Adaptations-,

Progressions- und Metastasierungsvorgängen von Tumoren spielt er eine Rolle (Saeger et al., 2006). Mit Nachweis des „housekeeping-gene“ β -Aktin wurde eine gleiche Ladung sichergestellt.

2.2.5.5 SDS-Page/Western Blot Mini Gele

Zunächst wurden die Gele gegossen. Das Trenngel wurde als erstes hergestellt, dann in die Gelkammer gegossen bis ungefähr 1,5cm unter den oberen Rand der Kammer und anschließend mit Ethanol behandelt, um bei Raumtemperatur eine halbe Stunde zu polymerisieren. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das vorbereitete Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Kammerbildung entsprechend eingebracht. Die so gebildeten Kammern dienen als Startpunkt für die Proteinwanderung.

Weitere dreißig Minuten später wurde das Gel in die Elektrophoresekammer verbracht, deren Taschen mit Lämmli-Puffer bestückt waren. Für die SDS-Elektrophorese lief dann das Gel bei 110V bis die Front 0,5cm vom Boden des Gels entfernt war. Dieser Vorgang dauerte bei einem maximalen Auftragsvolumen von 15 μ l Lysat, versetzt mit 4 x SDS-Puffer, ca. 1 Stunde.

2.2.5.6 Vorbereitung für das Blotting

Zur Vorbereitung des Blottings wurden für ein Mini-Gel (10 Lanes) vier Hybond Blotting Papers entsprechend der Gelgröße auf 6,4 x 8,2cm zugeschnitten. Das gelaufene Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen und die Glasplatten voneinander getrennt. Die Slots wurden mit einem Skalpell entfernt.

Die Glasplatten wurden vorsichtig mit destilliertem Wasser unterspült. Das Gel und die Membran wurden in Semi-Dry-Blot-Puffer (Towbin-Puffer) 15 Minuten lang äquilibriert. Je zwei Blotting Paper wurden in Blot Puffer eingeweicht und übereinander auf die Anode des Blotters (Trans-Blot SD) gelegt. Das Gel wurde auf die Membran überführt, dann wurden nochmals zwei Blotting Paper eingeweicht, um sie über das Gel zu legen. Mit einer Glaspipette wurde über das Blot-Sandwich gerollt, um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem fusselreifen Papiertuch aufgesaugt, der Kathoden-Deckel aufgesetzt und der Blotter angeschlossen.

2.2.5.7 Blotting

Der Transfer wurde mit 10 Volt konstant bei 290 mA für 4 Minuten durchgeführt.

Unmittelbar nach dem Blotten wurde die Membran aus der Apparatur genommen und der Proteintransfer mit Hilfe einer Ponceou-Rot-Färbung überprüft. Die Membran wurde für 5 bis 10 Minuten mit der Färbung inkubiert, danach die Farbe entfernt und mit destilliertem Wasser nachgespült, wobei sich jetzt die Proteine rot gefärbt zeigten. Nochmals wurde nachgespült und die Membran in die Block Substanz (5% dry milk in PBS) für mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 4°C gelegt. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimalig je 5 Minuten lang in PBS, versetzt mit 0,05% Tween, gewaschen.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in 5ml fünfprozentigem dry milk in PBS für entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über 20 Stunden bei 4°C. Die Membran wurde wiederum dreimalig je 5 Minuten lang in PBS, versetzt mit 0,05% Tween, gewaschen. Je nach verwendetem Ladder (Biotinylated Protein Ladder) wurde 15 Minuten vor Zugabe des zweiten Antikörpers (anti mouse/rabbit IgG POD 1:5000 5% dry milk in PBS versetzt mit 0,05% Tween) anti biotin HRP linked antibody 1:1000 dazugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde mit dem zweiten Antikörper wurde erneut dreimalig je 5 Minuten lang in PBS, versetzt mit 0,05% Tween 20, gewaschen. Nach einem kurzen Waschdurchgang mit PBS erfolgte die Detektion der Substrate mit dem BM Chemiluminescence WB Kit (mouse/rabbit) für eine Minute in Dunkelheit.

Je nach verwendetem Antikörper betrug die Entwicklungszeit zwischen 1 und 20 Minuten.

3. ERGEBNISSE

Zur statistischen Analyse der Versuchsergebnisse wurden die Programme Excel, Microsoft Works und PRISM verwendet. Zur Untersuchung von synergistischen oder antagonistischen Effekten bei der Kombination von Medikamenten läßt sich mithilfe des Interaktionsindex (nach Tallarida) das Ausmaß des Synergismus bzw. Antagonismus abschätzen.

Bei der im folgenden beschriebenen Methode wird von einem spezifischen, als relevant angenommenen Effekt ausgegangen, um dann experimentell die jeweils dazu notwendige Dosis der Einzelsubstanzen und der Kombination beider Substanzen zu bestimmen. Dosierungen, die den gleichen Effekt erzielen, werden isobol genannt; die damit verbundene Analysenmethode ist also eine isobole Methode.

Das Maß des Synergismus kann anhand des Wertes des Interaktionsindex abgelesen werden.

Der Index γ ist definiert durch das isobole Verhältnis:

$$a/A + b/B = \gamma$$

dabei gilt:

A = Dosis der Einzelsubstanz A, welche den spezifischen Effekt erzielt

B = Dosis der Einzelsubstanz B, welche den spezifischen Effekt erzielt

a und b = Kombinationsdosis, welche den spezifischen Effekt erzielt

Bei $\gamma < 1$ liegt eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen vor, bei $\gamma = 1$ addieren sich die Wirkungen der beiden Medikamente und bei $\gamma > 1$ ist nicht von Synergismus der Substanzen auszugehen (Tallarida, 2002).

3.1 Proliferationsassays

3.1.1 Zeitabhängigkeit

Zur Analyse der durchgeführten Versuche zur Zeitabhängigkeit wurden die in den Einzelversuchen gemessenen Extinktionswerte zusammengefaßt und die entsprechenden Mittelwerte sowie die Standardabweichungen ermittelt.

Wie im Kapitel „Methoden“ erläutert erfolgte die Messung nach 48, 96, 144 und 196 Stunden.

Zur Vereinheitlichung wird bei Angaben zu verwendeten Konzentrationen durchgängig die Einheit „ μM “ verwendet.

Dabei gilt:

0,01nM	0,00001 μM
0,1nM	0,0001 μM
1,0nM	0,001 μM
5,0nM	0,005 μM
0,01 μM	0,01 μM
0,05 μM	0,05 μM
0,1 μM	0,1 μM
0,5 μM	0,5 μM
1 μM	1 μM

3.1.1.1 SKOV3

SKOV3 und Flavopiridol

Vergleich der Inkubationszeiten bei der Behandlung von SKOV3-Zellen mit Flavopiridol

Die ausgeprägteste antiproliferative Wirkung auf SKOV3-Zellen durch Flavopiridol zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden (Reduktion auf 10,45% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bei Inkubation mit der maximalen Wirkstoffkonzentration; auch im niedermolaren Bereich im Vergleich zu den anderen Inkubationszeiten größere Wachstumshemmung).

Darstellung der Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

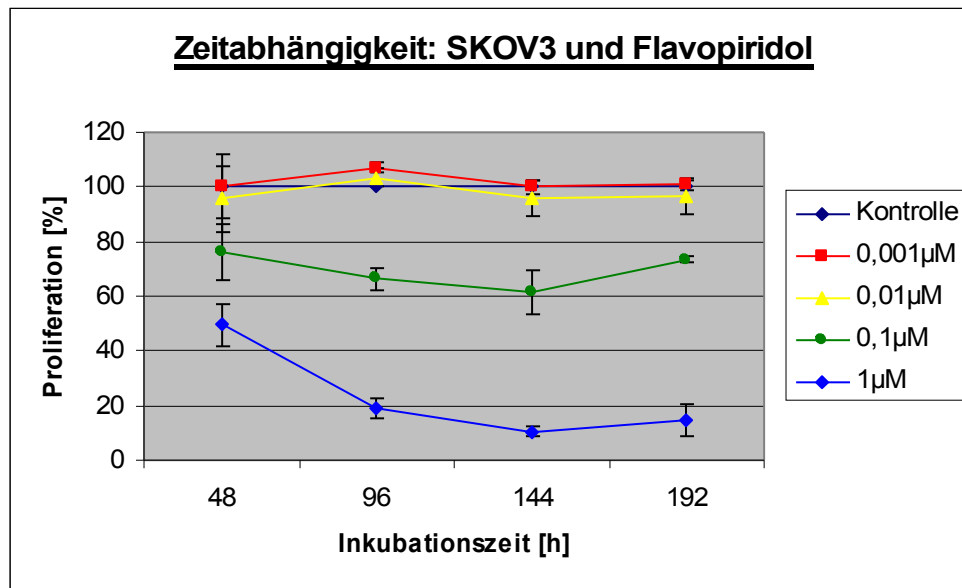


Abb. 3.1.1: Zeitabhängigkeit von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit Flavopiridol im Vergleich: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Inkubationszeit je nach Medikamentkonzentration; Auswertung nach 48, 96, 144 und 192 Stunden Inkubation: dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen und als y-Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen; Standardabweichungen dabei < 12%; Auswertung mit PRISM: T-Test und mit Excel

SKOV3 und Lonafarnib

Vergleich der Inkubationszeiten bei der Behandlung von SKOV3-Zellen mit Lonafarnib

Die ausgeprägteste antiproliferative Wirkung auf SKOV3-Zellen durch Lonafarnib zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden (Reduktion auf 78,90% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bei Inkubation mit der maximalen Wirkstoffkonzentration; auch im niedermolaren Bereich im Vergleich zu den anderen Inkubationszeiten größere Wachstumshemmung). Insgesamt läßt sich aber keine statistisch signifikante Wachstumsreduktion im getesteten Konzentrations- und Inkubationszeitbereich ausmachen. Es kommt im Verlauf teilweise sogar zu einer leichten Proliferationssteigerung (z.B. nach 192h Inkubation mit 0,01µmolarem Lonafarnib Steigerung des Wachstums um 12,57% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe).

Darstellung der Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

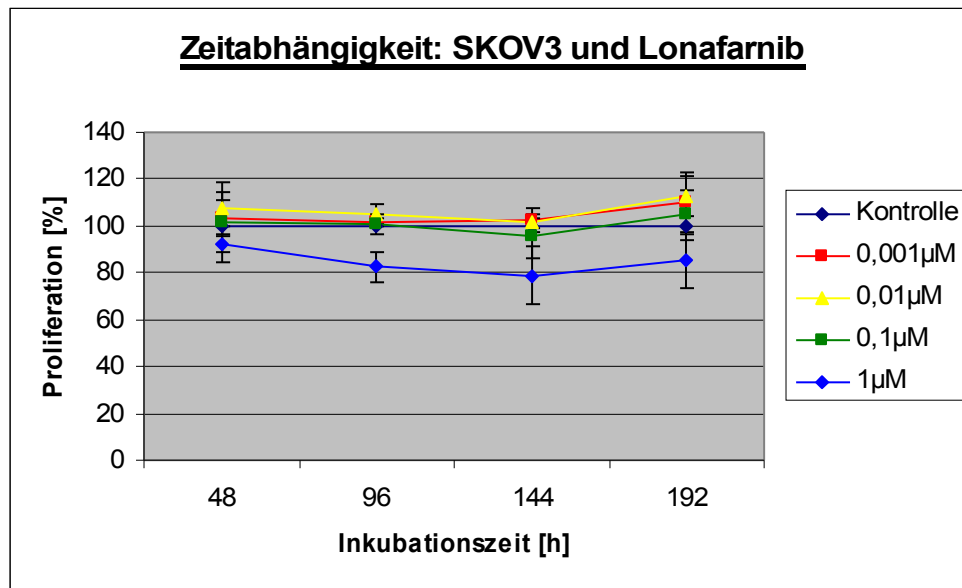


Abb. 3.1.2: Zeitabhängigkeit von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit Lonafarnib im Vergleich: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Inkubationszeit je nach Medikamentkonzentration; Auswertung nach 48, 96, 144 und 192 Stunden Inkubation: dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen und als y-Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen; Standardabweichungen dabei < 13%; Auswertung mit PRISM: T-Test und mit Excel

3.1.1.2 BG1

BG1 und Flavopiridol

Vergleich der Inkubationszeiten bei der Behandlung von BG1-Zellen mit Flavopiridol

Wie bei den vorangegangenen Versuchen bei SKOV3-Zellen zeichnet sich auch bei BG1-Zellen die ausgeprägteste Wachstumshemmung durch Flavopiridol nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden ab (Reduktion auf 8,13% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bei Inkubation mit der maximalen Wirkstoffkonzentration; auch im niedermolaren Bereich im Vergleich zu den anderen Inkubationszeiten größere Wachstumshemmung). Initial kommt es zu einer leichten Proliferationssteigerung im niedermolaren Konzentrationsbereich (z.B. 115,15% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bei 0,001µmolarem Flavopiridol), welche dann aber im zeitlichen Verlauf abnimmt (bis auf 90,27% nach 144 Stunden Inkubation), um nach 192 Stunden Inkubation wieder deutlicher zu werden (102,73%).

Darstellung der Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

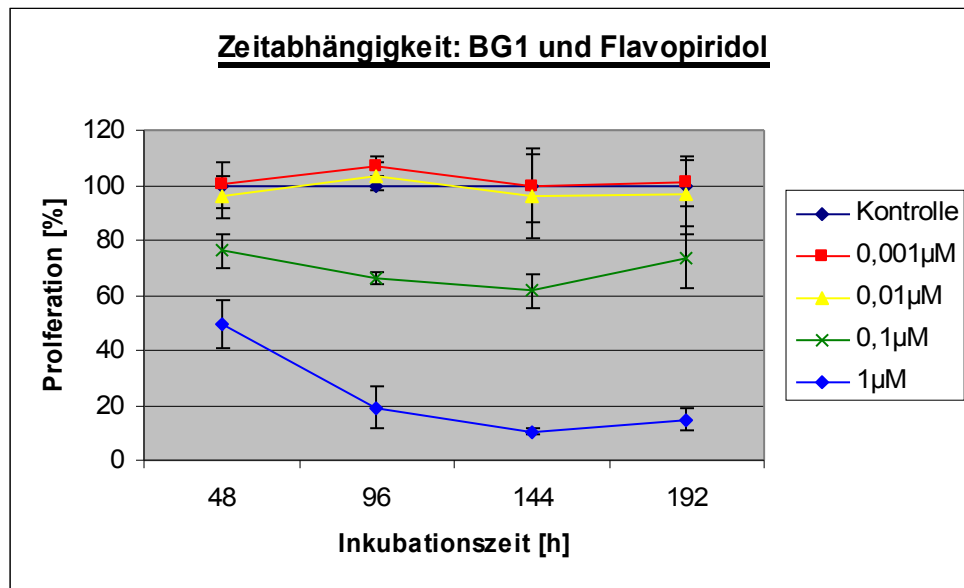


Abb. 3.1.3: Zeitabhängigkeit von Bg1 bei Behandlung mit Flavopiridol im Vergleich: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Inkubationszeit je nach Medikamentkonzentration; Auswertung nach 48, 96, 144 und 192 Stunden Inkubation: dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen und als y-Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen; Standardabweichungen dabei < 16%; Auswertung mit PRISM: T-Test und mit Excel

BG1 und Lonafarnib

Vergleich der Inkubationszeiten bei der Behandlung von BG1 mit Lonafarnib

Bei der Inkubation von BG1-Zellen scheint sich die größte antiproliferative Wirkung von Lonafarnib in 0,1 und 1μmolaren Konzentrationsbereich nach einer Inkubationszeit von 192 Stunden abzuzeichnen (Hemmung auf 39,25% bzw. 10,06% gegenüber der Kontrollgruppe).

Im niedermolaren Wirkstoffbereich läßt sich hingegen kein eindeutiger Trend festmachen.

Darstellung der Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

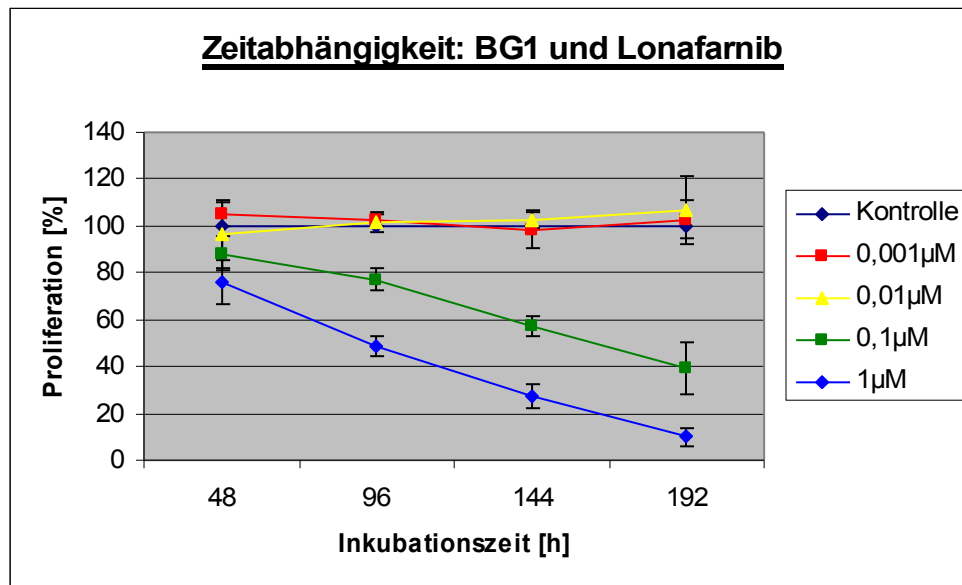


Abb. 3.1.4: Zeitabhängigkeit von Bg1 bei Behandlung mit Lonafarnib im Vergleich: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Inkubationszeit je nach Medikamentkonzentration; Auswertung nach 48, 96, 144 und 192 Stunden Inkubation: dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen und als y-Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen; Standardabweichungen dabei < 15%; Auswertung mit PRISM: T-Test und mit Excel

3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit

Zur Analyse der durchgeführten Versuche zur Konzentrationsabhängigkeit wurden die in den Einzelversuchen gemessenen Extinktionswerte zusammengefaßt und die entsprechenden Mittelwerte sowie die Standardabweichungen ermittelt. Wie im Kapitel „Methoden“ erläutert erfolgte die Messung nach 4 Tagen Inkubation. Die Versuche wurden viermal voneinander unabhängig durchgeführt.

3.1.2.1 SKOV3

SKOV3 und Flavopiridol

Bei Behandlung von SKOV3-Zellen mit Flavopiridol in einer absteigenden Konzentrationsreihe und Inkubation über einen Zeitraum von vier Tagen zeigt sich ein dosisabhängiger antiproliferativer Effekt: Je höher konzentriert die Substanz ist desto ausgeprägter ist die Wachstumshemmung (bei 0,00001 µmolaren Flavopiridol sinkt das Wachstum auf 95,98% gegenüber der Kontrollgruppe, bei 1 µmolaren Flavopiridol sogar auf 19,17%).

Bei Auftragung der Mittelwerte in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergibt sich folgende Trendlinie:

$$y = -81,79x + 85,742$$

Der IC50 beträgt 0,43699719, der IC30 0,19246852.

Konzentrationsabhängigkeit SKOV3 und Flavopiridol

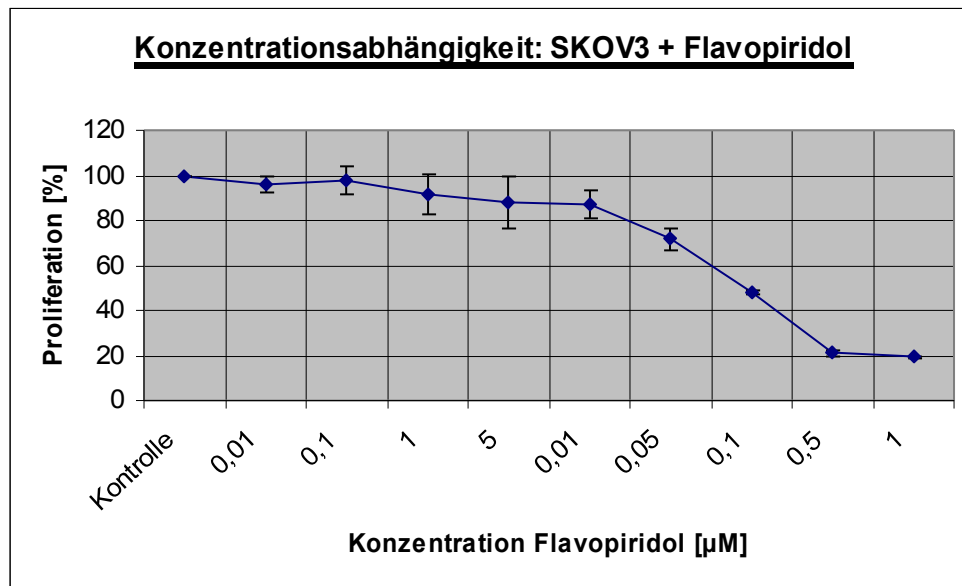


Abb. 3.1.5: Konzentrationsabhängigkeit von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit Flavopiridol: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; signifikante Proliferationshemmung ab einer Konzentration von 0,01 µM Flavopiridol; dargestellt ist die Auswertung von insgesamt vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; als y-Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen eingetragen; Standardabweichungen < 12%

SKOV3 und Lonafarnib

Bei Behandlung von SKOV3-Zellen mit Lonafarnib in einer absteigenden Konzentrationsreihe und Inkubation über einen Zeitraum von vier Tagen zeigt sich ein schwacher dosisabhängiger antiproliferativer Effekt: bei Konzentrationen bis 0,1µmolaren Lonafarnib zeigt sich gegenüber der Kontrollgruppe kein eindeutig antiproliferativer Effekt; erst bei Behandlung mit bei 0,5µmolaren Lonafarnib kommt es zu eindeutigeren Wachstumsreduktion, welche nur in der höchsten untersuchten Dosierung signifikant ist (Reduktion auf 82,65% gegenüber der Kontrollgruppe). Bei Auftragung der Mittelwerte in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergibt sich folgende Trendlinie:

$$y = -18,492x + 99,227$$

IC50: 2,66207008

IC30: 1,58052131

Konzentrationsabhängigkeit SKOV3 und Lonafarnib

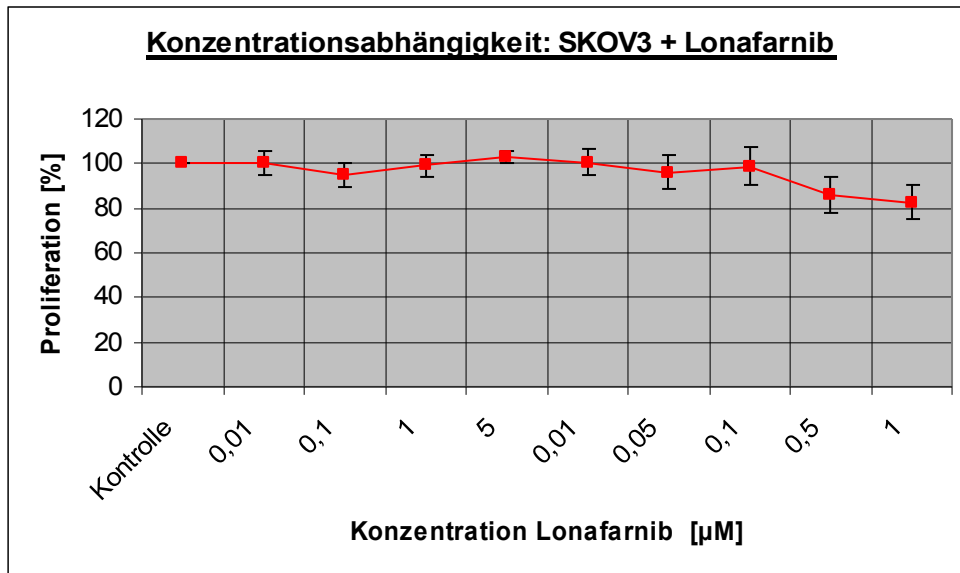


Abb. 3.1.6: Konzentrationsabhängigkeit von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit Lonafarnib: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; signifikante Proliferationshemmung nur in einer Konzentration von 1 μM Lonafarnib; dargestellt ist die Auswertung von insgesamt vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; als y-Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen eingetragen; Standardabweichungen < 9%

Vergleich: Proliferationshemmung durch Flavopiridol und Lonafarnib auf SKOV3-Zellen

Beim Vergleich der Konzentrationsabhängigkeiten bei Behandlung von SKOV3-Zellen mit den beiden Substanzen fällt die größere antiproliferative Potenz von Flavopiridol im untersuchten Dosisbereich auf. Einerseits führen geringere Konzentrationen zu einem eindeutigen Effekt auf das Zellwachstum, andererseits ist das Ausmaß der Wirkung dem des Lonafarnib überlegen, d.h. die Wachstumshemmung ist wesentlich ausgeprägter (Bsp: 1 $\mu\text{molares}$ Lonafarnib senkt das Zellwachstum auf lediglich 82,65%, während äquimolares Flavopiridol eine Hemmung bis auf 19,17% bewirkt).

Vergleich der IC50- und IC30-Werte von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung von SKOV3-Zellen

SKOV3	IC50	IC30
Flavopiridol	0,43699719	0,19246852
Lonafarnib	2,66207008	1,58052131

Vergleich antiproliferative Effekte von Flavopiridol und Lonafarnib auf SKOV3

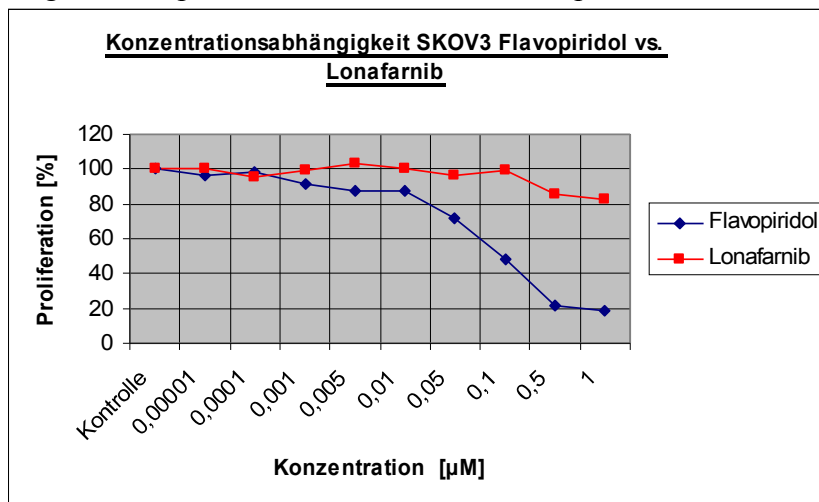


Abb. 3.1.7: Vergleich der Konzentrationabhängigkeit von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung von SKOV3-Zelllinien; deutlich wird hier die stärkere antiproliferative Wirkung von Flavopiridol auf SKOV3-Zellen gegenüber Lonafarnib im untersuchten Dosisbereich; Flavopiridol zeigt einen ausgeprägteren antiproliferativen Effekt auf SKOV3-Zellen als Lonafarnib; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

3.1.2.2 BG1

BG1 und Flavopiridol

Bei Behandlung von BG1-Zellen mit Flavopiridol in einer absteigenden Konzentrationsreihe und Inkubation über einen Zeitraum von vier Tagen zeigt sich ein dosisabhängiger antiproliferativer Effekt: Je höher konzentriert die Substanz ist desto ausgeprägter ist die Wachstumshemmung (bei 0,001 µmolaren Flavopiridol sinkt das Wachstum auf 96,97% gegenüber der Kontrollgruppe, bei 1 µmolaren Flavopiridol sogar auf 20,61%).

Bei Auftragung der Mittelwerte in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergibt sich folgende Trendlinie:

$$y = -83,792x + 87,203$$

IC50: 0,44399227

IC30: 0,205306

Konzentrationsabhängigkeit BG1 und Flavopiridol

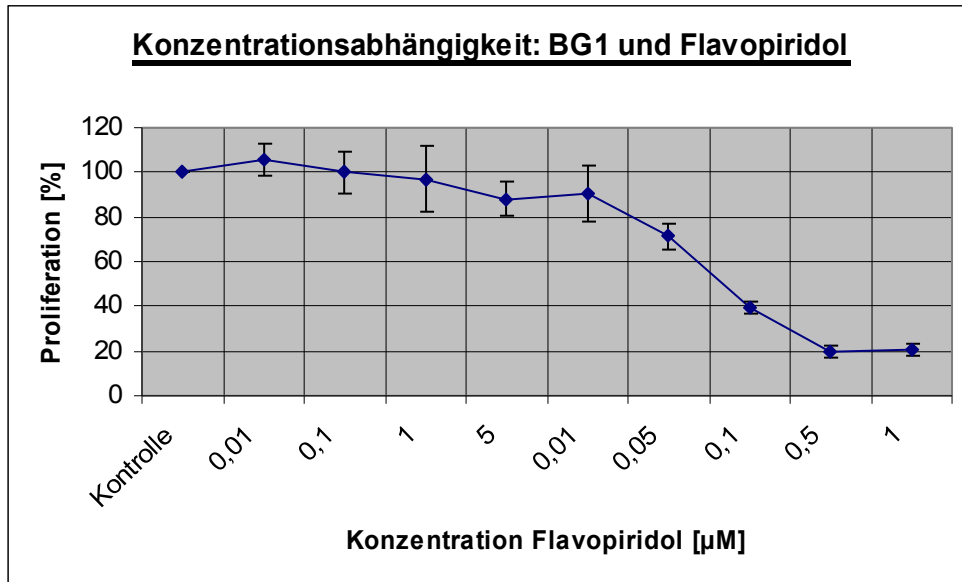


Abb. 3.1.8: Konzentrationsabhängigkeit von BG1-Zellen bei Behandlung mit Flavopiridol: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; signifikante Proliferationshemmung ab einer Konzentration von 0,05 µM Flavopiridol; dargestellt ist die Auswertung von vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; als y-Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen eingetragen; Standardabweichungen < 15%

BG1 und Lonafarnib

Bei Behandlung von BG1-Zellen mit Lonafarnib in einer absteigenden Konzentrationsreihe und Inkubation über einen Zeitraum von vier Tagen zeigt sich im niedrig dosierten Bereich kein Effekt bzw. sogar eine leichte Proliferationssteigerung bis auf 112,02%. Ab 0,01µmolaren Lonafarnib zeigt sich jedoch ein dosisabhängiger antiproliferativer Effekt: Je höher konzentriert die Substanz ist desto ausgeprägter ist die Wachstumshemmung (bei 0,01 µmolaren Flavopiridol sinkt das Wachstum auf 92,08% gegenüber der Kontrollgruppe, bei 1 µmolaren Flavopiridol sogar auf 39,59%).

Bei Auftragung der Mittelwerte in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergibt sich folgende Trendlinie:

$$y = -68,57x + 96,857$$

IC50: 0,68334549

IC30: 0,39167274

Konzentrationsabhängigkeit BG1 und Lonafarnib

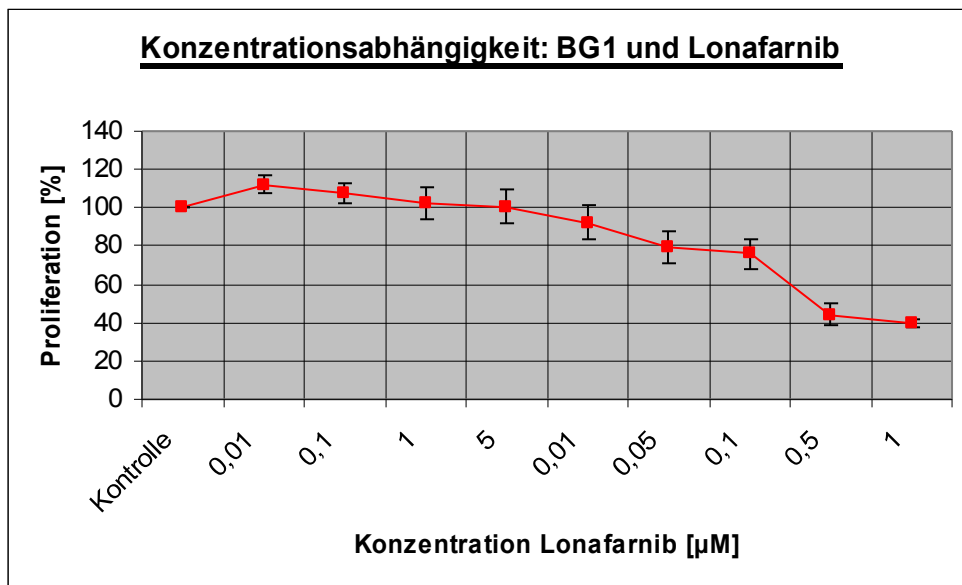


Abb. 3.1.9: Konzentrationsabhängigkeit von BG1-Zellen bei Behandlung mit Lonafarnib: Auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; signifikante Proliferationshemmung ab einer Konzentration von 0,05 µM Lonafarnib; dargestellt ist die Auswertung von vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; als y-Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen eingetragen; Standardabweichungen < 9%

Vergleich: Proliferationshemmung durch Flavopiridol und Lonafarnib auf BG1-Zellen

Beim Vergleich der Konzentrationsabhängigkeiten bei Behandlung von BG1-Zellen mit den beiden Substanzen fällt die größere antiproliferative Potenz von Flavopiridol im untersuchten Dosisbereich auf. Das Ausmaß der Wirkung ist dem des Lonafarnib überlegen, d.h. die Wachstumshemmung ist ausgeprägter (Bsp: 1µmolares Lonafarnib senkt das Zellwachstum auf 39,59%, während äquimolares Flavopiridol eine Hemmung bis auf 20,61% bewirkt).

Vergleich der IC50- und IC30-Werte von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung von BG1-Zellen

<u>BG1</u>	<u>IC50</u>	<u>IC30</u>
Flavopiridol	0,44399227	0,205306
Lonafarnib	0,68334549	0,39167274

Vergleich antiproliferative Effekte von Flavopiridol und Lonafarnib auf BG1

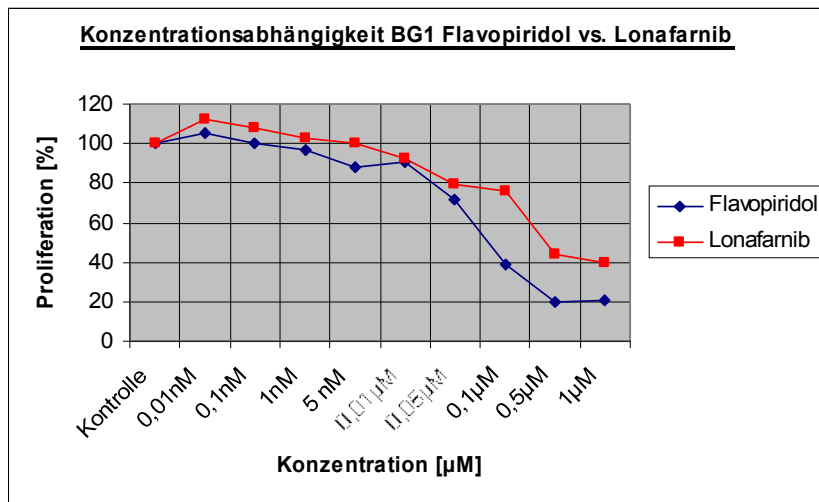


Abb. 3.1.10: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung von BG1-Zelllinien; deutlich wird hier die stärkere antiproliferative Wirkung von Flavopiridol auf BG1-Zellen gegenüber Lonafarnib im untersuchten Dosisbereich; Flavopiridol zeigt einen ausgeprägteren antiproliferativen Effekt auf BG1-Zellen als Lonafarnib; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

3.1.2.3 Vergleich beider Zelllinien in Bezug auf Wachstumshemmung durch die Substanzen

Beim Vergleich der Wirkung von Flavopiridol auf SKOV3 und BG1 zeigen sich keine deutlichen Unterschiede. Zwar führt bereits 0,01µmolaren Flavopiridol zu signifikanter Wachstumshemmung, jedoch sind sich die Effekte der höheren Konzentrationen sehr ähnlich. Maximal wird eine Wachstumsreduktionen auf 19,17% (SKOV3) bzw. auf 20,61% (BG1) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe erzielt.

Vergleich antiproliferative Effekte von Flavopiridol auf SKOV3 und BG1

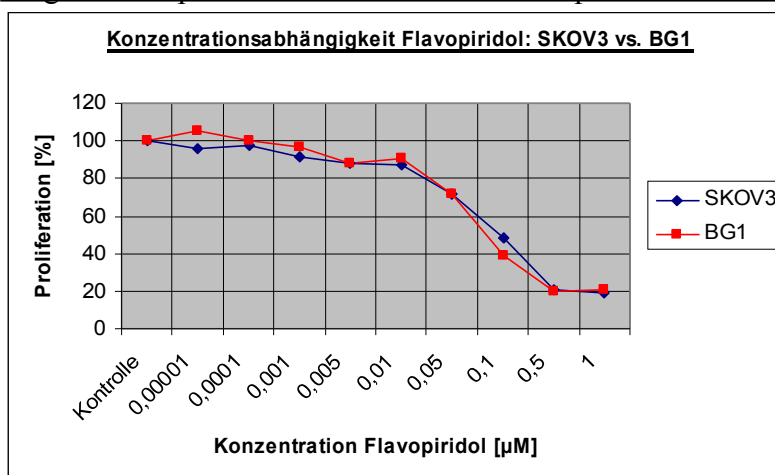


Abb. 3.1.11: Vergleich Konzentrationsabhängigkeit Flavopiridol SKOV3- vs. BG1-Zellen: auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrollgruppe

aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; dargestellt ist die Auswertung der Mittelwerte vierer, voneinander unabhängig durchgeführter Versuche

Vergleich antiproliferative Effekte von Lonafarnib auf SKOV3 und BG1

Der Vergleich der beiden Zelllinien in Bezug zur prozentualen Proliferationshemmung durch Lonafarnib zeigt, daß SKOV3 signifikant erst ab einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ($p = 0,0289$) gehemmt wird, während dies schon ab einer Konzentration von $0,05\mu\text{M}$ ($p = 0,0237$) bei BG1-Zellen der Fall ist. Auch ist der Effekt der Proliferationshemmung durch Lonafarnib auf BG1-Zellen stärker als auf SKOV3; 1molares Lonafarnib reduziert die Proliferation von BG1 Zellen auf 39,59%, während dieselbe Konzentration bei SKOV3 zu 82,65% Wachstum führt.

Vergleich antiproliferative Effekte von Lonafarnib auf SKOV3 und BG1

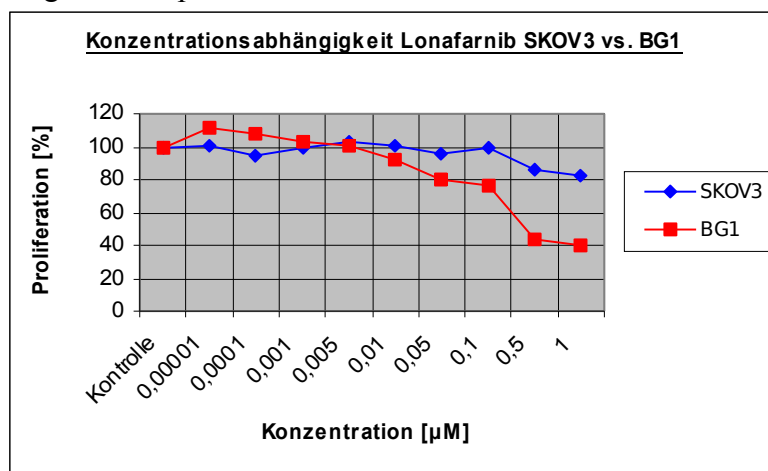


Abb. 3.1.12: Vergleich Konzentrationsabhängigkeit Lonafarnib SKOV3- vs. BG1-Zellen: auf der Y-Achse ist das prozentuale Wachstum der Zellen im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrollgruppe aufgetragen; auf der X-Achse die entsprechende Konzentration des Medikaments; dargestellt ist die Auswertung der Mittelwerte vierer, voneinander unabhängig durchgeführter Versuche

3.1.3 Synergismusversuche

3.1.3.1 SKOV3

Platte 1

Dient als Kontrollplatte, bei der die Zellen lediglich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber zwei unbehandelten Kontrollreihen (zusammengefaßt in u.g. Reihe 1 und 2) inkubiert werden.

Tab. 3.1.1: Synergismusversuch: SKOV3, Platte 1: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <10%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [μM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [μM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	7,45
0,00001	0	100,99 ns (P = 0,6870)	5,05
0,0001	0	102,35 ns (P = 0,4958)	9,32
0,001	0	99,15 ns (P = 0,7342)	5,30
0,005	0	99,97 ns (P = 0,9889)	5,27
0,01	0	98,76 ns (P = 0,6087)	4,90
0,05	0	87,28 *(P = 0,0004)	8,86
0,1	0	71,04 *(P < 0,0001)	6,77
0,5	0	22,46 *(P < 0,0001)	3,05

Platte 2

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 0,01 μM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.2: Synergismusversuch: SKOV3, Platte 2: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0,01 μM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <8%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [μM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [μM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	6,72
0	0,01	98,57 ns (P = 0,5571)	4,29
0,00001	0,01	105,50 ns (P = 0,0642)	6,77
0,0001	0,01	102,92 ns	4,84

		(P = 0,2515)	
0,001	0,01	106,35 *(P = 0,0498)	7,90
0,005	0,01	102,42 ns (P = 0,2973)	3,45
0,01	0,01	101,09 ns (P = 0,7258)	7,65
0,05	0,01	85,05 *(P < 0,0001)	6,10
0,1	0,01	69,77 *(P < 0,0001)	7,82
0,5	0,01	20,61 *(P < 0,0001)	2,16

Platte 3

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 0,1µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.3: SKOV3, Platte 3: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0,1µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <9%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [µM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard-abweichg. [%]
Kontrolle	0	100	6,22
0	0,1	101,53 ns (P = 0,5817)	6,42
0,00001	0,1	100,46 ns (P = 0,8582)	5,49
0,0001	0,1	103,13 ns (P = 0,2993)	7,39
0,001	0,1	100,52 ns (P = 0,8427)	5,62
0,005	0,1	97,73 ns (P = 0,4870)	8,48
0,01	0,1	96,18 ns (P = 0,2164)	7,66
0,05	0,1	79,73 *(P < 0,0001)	8,16
0,1	0,1	68,86 *(P < 0,0001)	8,69
0,5	0,1	19,61 *(P < 0,0001)	2,12

Platte 4

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 1µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen..

Tab. 3.1.4: SKOV3, Platte 4: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 1µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <10%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [µM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard-abweichg. [%]
Kontrolle		100	5,85
0	1	92,93 *(P = 0,0049)	5,28
0,00001	1	94,06 *(P = 0,0237)	5,99
0,0001	1	93,09 *(P = 0,0052)	5,11
0,001	1	94,48 *(P = 0,0479)	6,76
0,005	1	93,11 *(P = 0,0060)	5,28
0,01	1	90,66 *(P = 0,0012)	6,73
0,05	1	77,77 *(P < 0,0001)	9,16
0,1	1	61,00 *(P < 0,0001)	7,43
0,5	1	22,31 *(P < 0,0001)	2,10

Vergleich der vier unterschiedlichen Platten

SKOV3

Der Vergleich der Mittelwerte aller Versuche mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol und einer fixen Konzentration an Lonafarnib zeigt, daß es bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen schon im niedermolaren Wirkstoffbereichen von Lonafarnib zu einer größeren Wachstumsreduktion kommt als bei alleiniger Behandlung mit Flavopiridol. Am

deutlichsten scheint dieser synergistische Effekt bei der Kombination von 1 μM olarem Lonafarnib mit Flavopiridol zu sein.

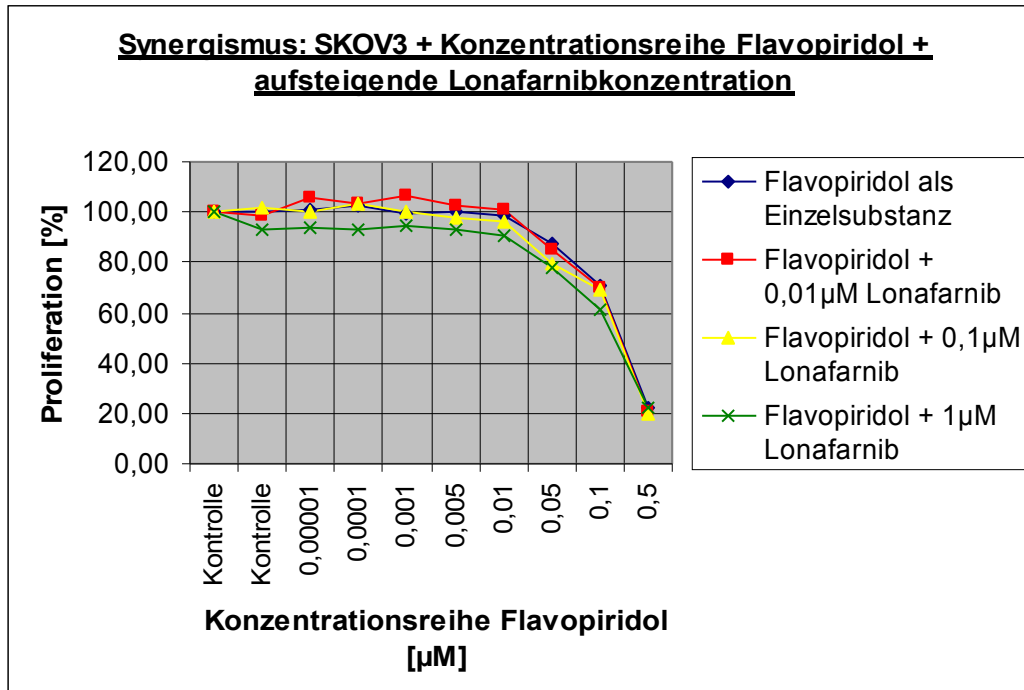


Abb. 3.1.13: Synergismusversuche SKOV3: Vergleich der vier unterschiedlichen Platten; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Platte 5

Dient als Kontrollplatte, bei der die Zellen lediglich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber zwei unbehandelten Kontrollreihen (zusammengefasst in u.g. Reihe 1 und 2) inkubiert werden.

Tab. 3.1.5: SKOV3, Platte 5: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol (hier 0); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <11%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [μM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [μM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	7,04
0,0001	0	102,18 ns (P = 0,3947)	5,88
0,001	0	101,27 ns (P = 0,5716)	4,36
0,005	0	100,97 ns (P = 0,6727)	4,61

0,01	0	101,76 ns (P = 0,6342)	10,57
0,05	0	101,7 ns (P = 0,5255)	6,44
0,1	0	100,23 ns (P = 0,9227)	4,82
0,5	0	91,15 *(P = 0,0012)	6,06
1	0	92,31 *(P = 0,0041)	5,94

Platte 6

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von 0,01µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.6: SKOV3, Platte 6: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol 0,01 µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <12%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [µM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	4,69
0	0,01	93,37 *(P = 0,0388)	9,17
0,0001	0,01	97,36 ns (P = 0,1652)	4,03
0,001	0,01	97,23 ns (P = 0,1670)	4,54
0,005	0,01	100,38 ns (P = 0,8369)	3,77
0,01	0,01	97,41 ns (P = 0,2860)	6,39
0,05	0,01	97,07 ns (P = 0,1553)	4,80
0,1	0,01	94,15 *(P = 0,0388)	7,79
0,5	0,01	88,42 *(P = 0,0030)	11,27
1	0,01	89,09 *(P < 0,0001)	6,87

Platte 7

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von 0,05µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.7: SKOV3, Platte 7: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol 0,05 µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <12%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [µM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	6,70
0	0,05	87,17 *(P < 0,0001)	5,48
0,0001	0,05	87,16 *(P < 0,0001)	3,43
0,001	0,05	89,05 *(P = 0,0011)	7,53
0,005	0,05	91,09 *(P = 0,0064)	7,46
0,01	0,05	86,86 *(P < 0,0001)	5,55
0,05	0,05	88,08 *(P < 0,0001)	5,86
0,1	0,05	87,17 *(P = 0,0001)	7,34
0,5	0,05	83,85 *(P = 0,0003)	11,25
1	0,05	79,64 *(P < 0,0001)	7,55

Platte 8

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von 0,1µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.8: SKOV3, Platte 8: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol 0,1µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <9; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [µM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	4,56
0	0,1	66,28 *(P < 0,0001)	4,38
0,0001	0,1	66,5 *(P < 0,0001)	5,71
0,001	0,1	64,86 *(P < 0,0001)	6,33
0,005	0,1	66,22 *(P < 0,0001)	7,78
0,01	0,1	66,65 *(P < 0,0001)	6,97
0,05	0,1	66,36 *(P < 0,0001)	7,52
0,1	0,1	67,25 *(P < 0,0001)	6,07
0,5	0,1	69,59 *(P < 0,0001)	8,68
1	0,1	65,25 *(P < 0,0001)	5,87

Vergleich der vier unterschiedlichen Platten

SKOV3

Der Vergleich der Mittelwerte aller Versuche mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib und einer fixen Konzentration an Flavopiridol zeigt, daß es bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen schon im niedermolareren Wirkstoffbereichen von Flavopiridol zu einer größeren Wachstumsreduktion kommt als bei alleiniger Behandlung mit Lonafarnib. Am deutlichsten scheint dieser Effekt bei der Kombination von 0,1µmolarem Flavopiridol mit Lonafarnib zu sein. Jedoch scheint dieser antiproliferative Effekt weitestgehend nicht von Lonafarnib abhängig zu sein, sondern bleibt trotz aufsteigender Konzentrationen des FTI weitestgehend stabil: es bleibt fraglich, ob es sich nicht um einen Einzeleffekt von Flavopiridol handelt, da bei gleicher Konzentrationsreihe von Lonafarnib jedoch mit von Platte zu Platte aufsteigender Flavopiridoldosis die absolute Proliferation sinkt.

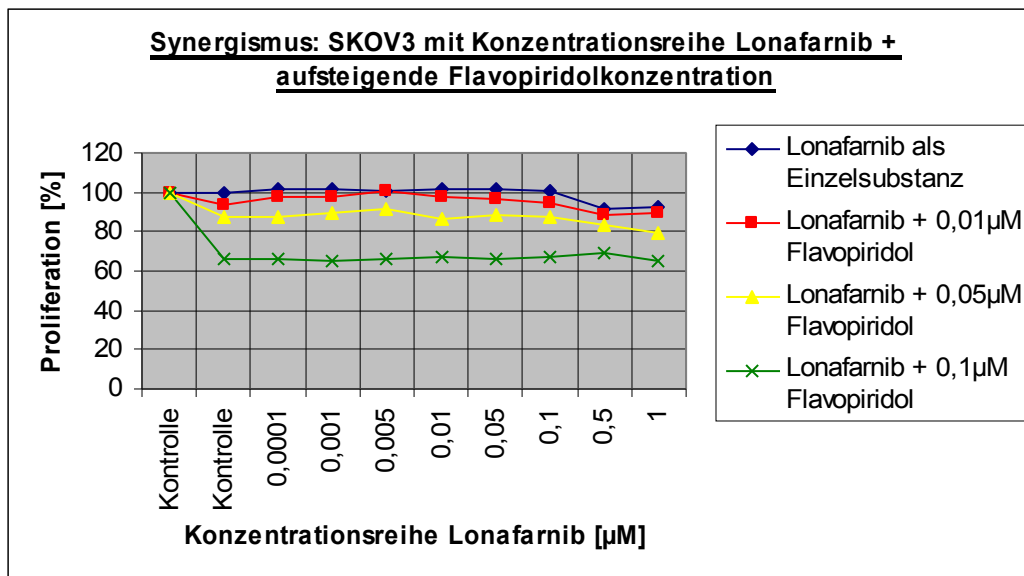


Abb. 3.1.14: Synergismusversuche SKOV3: Vergleich der vier unterschiedlichen Platten; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Bestimmung der Interaktionsindizes

Bei Auftragung der Daten in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergeben sich folgende Trendlinien und IC50- sowie IC30-Werte für die einzelnen Kombinationen:

Tab. 3.1.9: Vergleich der Trendlinien und der IC30/50-Werte der einzelnen Kombinationen; berechnet mit der Methode nach Tallarida

	Platte 1 Konzentrationsreihe Flavopiridol ohne fixe Konzentration Lonafarnib	Platte 2 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 0,01µM	Platte 3 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 0,1µM	Platte 4 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 1µM
Trendlinie	$y = -157,42x + 98,539$	$y = -166,73x + 100,53$	$y = -161,57x + 97,093$	$y = -146,01x + 91,528$
IC50	0,30834074	0,30306484	0,29147119	0,28441888
IC30	0,18129208	0,18311042	0,16768583	0,15
	Platte 5 Konzentrationsreihe Lonafarnib ohne fixe Konzentration Flavopiridol	Platte 6 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,01µM	Platte 7 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,05µM	Platte 8 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,1µM
Trendlinie	$y = -10,923x + 101,09$	$y = -10,75x + 97,668$	$y = -11,188x + 90,171$	$y = -6,2524x + 71,455$
IC50	4,67728646	4,43423256	3,59054344	3,43148231
IC30	2,84628765	2,57376744	1,80291384	0,23271064

Berechnung der Interaktionsindizes (nach Tallarida):

$$a/A + b/B = \gamma$$

A = Dosis der Einzelsubstanz A, welche den spezifischen Effekt erzielt

B = Dosis der Einzelsubstanz B, welche den spezifischen Effekt erzielt

a und b = Kombinationsdosis, welche den spezifischen Effekt erzielt

Bei $\gamma < 1$ liegt eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen vor, bei $\gamma = 1$ addieren sich die Wirkungen der beiden Medikamente und bei $\gamma > 1$ ist nicht von Synergismus der Substanzen auszugehen (Tallarida, 2002).

$$(IC50 \text{ Platte 2} / IC50 \text{ Platte 1}) + (IC50 \text{ Platte 6} / IC50 \text{ Platte 5})$$

$$0,30306484/0,30834074 + 4,43423256/4,67728646 = 1,93092466$$

=> kein Synergismus, da $\gamma > 1$

$$(IC50 \text{ Platte 3} / IC50 \text{ Platte 1}) + (IC50 \text{ Platte 7} / IC50 \text{ Platte 5})$$

$$0,29147119/0,30834074 + 3,59054344/4,67728646 = 1,7129445$$

=> kein Synergismus, da $\gamma > 1$

$$(IC50 \text{ Platte 4} / IC50 \text{ Platte 1}) + (IC50 \text{ Platte 8} / IC50 \text{ Platte 5})$$

$$0,28441888/0,30834074 + 3,43148231/4,67728646 = 1,65606555$$

=> kein Synergismus, da $\gamma > 1$

Die Analyse der Interaktionsindizes zeigt, daß es bei Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib zur Behandlung von SKOV3-Zellen zu keinem synergistischen Effekt der beiden Substanzen kommt, da die γ -Werte durchweg größer als 1 sind.

3.1.3.2 BG1

Platte 1

Dient als Kontrollplatte, bei der die Zellen lediglich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber zwei unbehandelten Kontrollreihen (zusammengefaßt in u.g. Reihe 1 und 2) inkubiert werden.

Tab. 3.1.10: BG1, Platte 1: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <12%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [μM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [μM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichg. [%]
Kontrolle	0	100	5,20
0,00001	0	95,16 ns (P = 0,5157)	6,33
0,0001	0	100,35 ns (P = 0,9555)	4,05
0,001	0	101,44 ns (P = 0,8190)	3,06
0,005	0	103,14 ns (P = 0,6511)	11,09
0,01	0	101,06 ns (P = 0,8698)	4,94
0,05	0	81,16 *(P = 0,0070)	7,10
0,1	0	51,5 *(P < 0,0001)	3,72
0,5	0	12,33 *(P < 0,0001)	1,46

Platte 2

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 0,01 μM inkubiert. Reihe A diene als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.11: BG1, Platte 2: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0,01 μM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <13%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [μM]	Fixe Konzentration	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
---	-----------------------	----------------------------------	-----------------------------

	Lonafarnib [μM]		
Kontrolle		100	12,33
0	0,01	96,36 ns (P = 0,4794)	10,33
0,00001	0,01	90,57 ns (P = 0,0735)	10,55
0,0001	0,01	93,55 ns (P = 0,2279)	11,17
0,001	0,01	89,09 *(P = 0,0378)	10,32
0,005	0,01	94,3 ns (P = 0,2857)	11,16
0,01	0,01	89,94 ns (P = 0,0529)	10,14
0,05	0,01	75,29 *(P < 0,0001)	6,53
0,1	0,01	47,25 *(P < 0,0001)	6,95
0,5	0,01	11,1 *(P < 0,0001)	0,96

Platte 3

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 0,1 μM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.12: BG1, Platte 3: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 0,1 μM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <13%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe	Fixe Konzentration	Mittelwerte	Standard-
Flavopiridol [μM]	Lonafarnib [μM]	Proliferation [%]	abweichg. [%]
Kontrolle		100	12,84
0	0,1	67,17 *(P < 0,0001)	10,47
0,00001	0,1	62,47 *(P < 0,0001)	7,54
0,0001	0,1	61,56 *(P < 0,0001)	9,92
0,001	0,1	65,48 *(P < 0,0001)	11,42
0,005	0,1	65,23 *(P < 0,0001)	7,10
0,01	0,1	66,62	7,82

		*(P < 0,0001)	
0,05	0,1	65,14 *(P < 0,0001)	8,82
0,1	0,1	37,6 *(P < 0,0001)	5,95
0,5	0,1	12,24 *(P < 0,0001)	0,95

Platte 4

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Lonafarnib von 1µM inkubiert. Reihe A diene als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Lonafarnib behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.13: BG1, Platte 4: Konzentrationsreihe Flavopiridol + fixe Konzentration Lonafarnib (hier 1µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <21%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Flavopiridol [µM]	Fixe Konzentration Lonafarnib [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard-abweichg. [%]
Kontrolle		100	10,93
0	1	58,48 *(P < 0,0001)	19,43
0,00001	1	56,13 *(P < 0,0001)	17,21
0,0001	1	57,47 *(P < 0,0001)	19,37
0,001	1	56,25 *(P < 0,0001)	20,24
0,005	1	61,8 *(P < 0,0001)	20,69
0,01	1	60,13 *(P < 0,0001)	20,48
0,05	1	56,34 *(P < 0,0001)	11,78
0,1	1	33,18 *(P < 0,0001)	6,85
0,5	1	12,63 *(P < 0,0001)	2,26

Vergleich der vier unterschiedlichen Platten

BG1

Der Vergleich der Mittelwerte aller Versuche mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Flavopiridol und einer fixen Konzentration an Lonafarnib zeigt, daß es bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen schon im niedermolareren Wirkstoffbereichen von Lonafarnib zu einer größeren Wachstumsreduktion kommt als bei alleiniger Behandlung mit Flavopiridol. Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass bei Auswertung von Platte 4 hohe Standardabweichungen eine Interpretation der Ergebnisse erschweren.

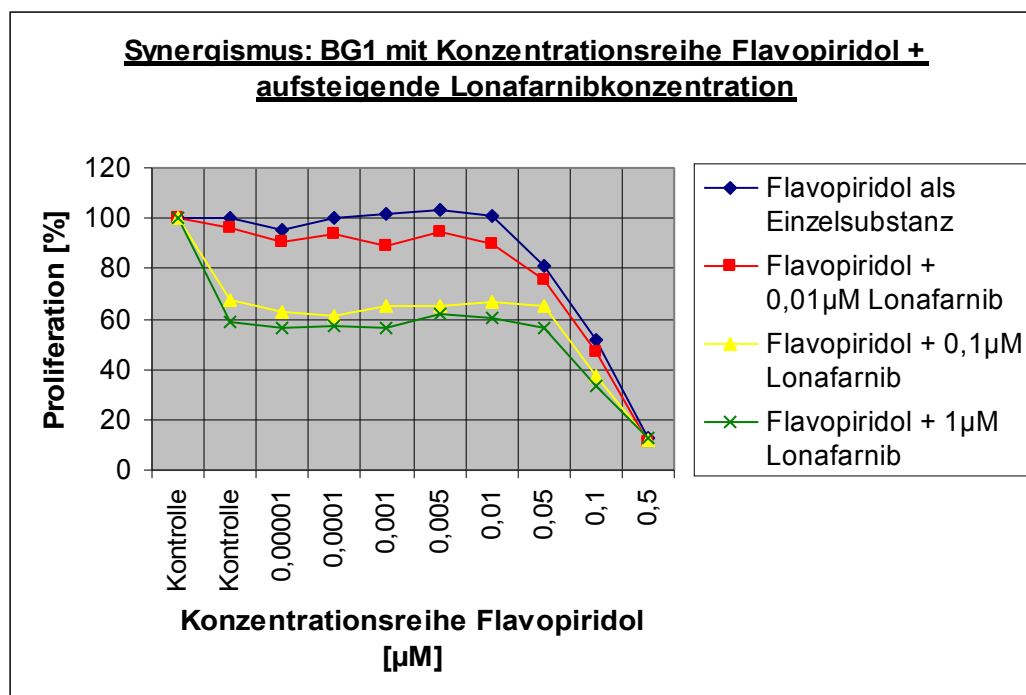


Abb. 3.1.15: Synergismusversuche BG1: Vergleich der vier unterschiedlichen Platten; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Platte 5

Dient als Kontrollplatte, bei der die Zellen lediglich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber zwei unbehandelten Kontrollreihen (zusammengefaßt in u.g. Reihe 1 und 2) inkubiert werden.

Tab. 3.1.14: BG1, Platte 5: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol (hier 0); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <12%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [μM]	Fixe	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
	Konzentration Flavopiridol [μM]		
Kontrolle	0	100	11,34
0,0001	0	101,09 ns (P = 0,7835)	10,72
0,001	0	100,41 ns (P = 0,9008)	8,08
0,005	0	98,27 ns (P = 0,6580)	10,47
0,01	0	97,19 ns (P = 0,4983)	11,44
0,05	0	83,25 *(P = 0,0002)	11,65
0,1	0	68,69 *(P < 0,0001)	11,97
0,5	0	41,1 *(P < 0,0001)	8,30
1	0	37,32 *(P < 0,0001)	7,80

Platte 6

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von $0,01\mu\text{M}$ inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.15: BG1, Platte 6: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol $0,01\mu\text{M}$); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <12%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [μM]	Fixe	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
	Konzentration Flavopiridol [μM]		
Kontrolle	0	100	11,71
0	0,01	102,90 ns (P = 0,5411)	10,08
0,0001	0,01	99,8 ns (P = 0,9670)	10,49
0,001	0,01	105,64 ns (P = 0,2825)	12,36
0,005	0,01	99,91 ns (P = 0,9875)	13,92
0,01	0,01	98,07 ns (P = 0,6859)	10,23

0,05	0,01	85,24 *(P =0,0047)	11,32
0,1	0,01	75,59 *(P < 0,0001)	10,86
0,5	0,01	50,58 *(P < 0,0001)	7,48
1	0,01	42,48 *(P < 0,0001)	8,41

Platte 7

Die Zellen wurden mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von 0,05µM inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.16: BG1, Platte 7: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol 0,05 µM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <10%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [µM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [µM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	9,98
0	0,05	84,99 *(P = 0,0006)	8,11
0,0001	0,05	82,97 *(P = 0,0003)	9,09
0,001	0,05	82,99 *(P = 0,0004)	9,85
0,005	0,05	83,45 *(P < 0,0001)	6,79
0,01	0,05	79,72 *(P < 0,0001)	6,31
0,05	0,05	75,1 *(P < 0,0001)	9,92
0,1	0,05	70,18 *(P < 0,0001)	5,21
0,5	0,05	52,79 *(P < 0,0001)	5,95
1	0,05	47,77 *(P < 0,0001)	3,80

Platte 8

Die Zellen wurde mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib gegenüber und zusätzlich mit einer festen Konzentration von Flavopiridol von 0,05µM

inkubiert. Reihe A diente als unbehandelte Kontrollreihe, Reihe B wurde nur mit der entsprechenden Konzentration von Flavopiridol behandelt, alle anderen Reihen dann jeweils mit der Kombination der beiden Substanzen.

Tab. 3.1.17: BG1, Platte 8: Konzentrationsreihe Lonafarnib + fixe Konzentration Flavopiridol 0,05 μM); dargestellt sind die Mittelwerte (grau hinterlegt) aus je vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichung <10%; (* = signifikante Proliferationshemmung; ns = nicht signifikant; in Klammern P-Wert); statistische Analyse mit Microsoft Excel und PRISM

Konzentrationsreihe Lonafarnib [μM]	Fixe Konzentration Flavopiridol [μM]	Mittelwerte Proliferation [%]	Standard- abweichung [%]
Kontrolle	0	100	9,15
0	0,1	48,82 *(P < 0,0001)	6,46
0,0001	0,1	51,31 *(P < 0,0001)	7,51
0,001	0,1	50,09 *(P < 0,0001)	5,26
0,005	0,1	47,21 *(P < 0,0001)	4,71
0,01	0,1	44,99 *(P < 0,0001)	8,02
0,05	0,1	40,95 *(P < 0,0001)	7,83
0,1	0,1	39,81 *(P < 0,0001)	5,55
0,5	0,1	30,25 *(P < 0,0001)	4,48
1	0,1	31,41 *(P < 0,0001)	4,86

Vergleich der vier unterschiedlichen Platten

BG1

Der Vergleich der Mittelwerte aller Versuche mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib und einer fixen Konzentration an Flavopiridol zeigt, daß es bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen schon im Wirkstoffbereich von Flavopiridol von 0,05 μM zu einer deutlicheren Wachstumsreduktion insbesondere im niedermolaren Lonafarnibbereich kommt als bei alleiniger Behandlung mit dem FTI; ein Effekt, der bei Kombination mit 0,1 $\mu\text{molarem}$ Flavopiridol noch deutlich stärker hervortritt.

Bei Behandlung der Zellen mit der aufsteigenden Konzentrationsreihe von Lonafarnib und 0,01 $\mu\text{molaren}$ Flavopiridol kommt es entgegengesetzt dazu zu einer leichten (nicht

signifikanten) Wachstumssteigerung im Bereich des 0,001µmolaren Lonafarnibs; allerdings sind im beschriebenen Konzentrationsbereich auch die Standardabweichung im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen verhältnismäßig hoch.

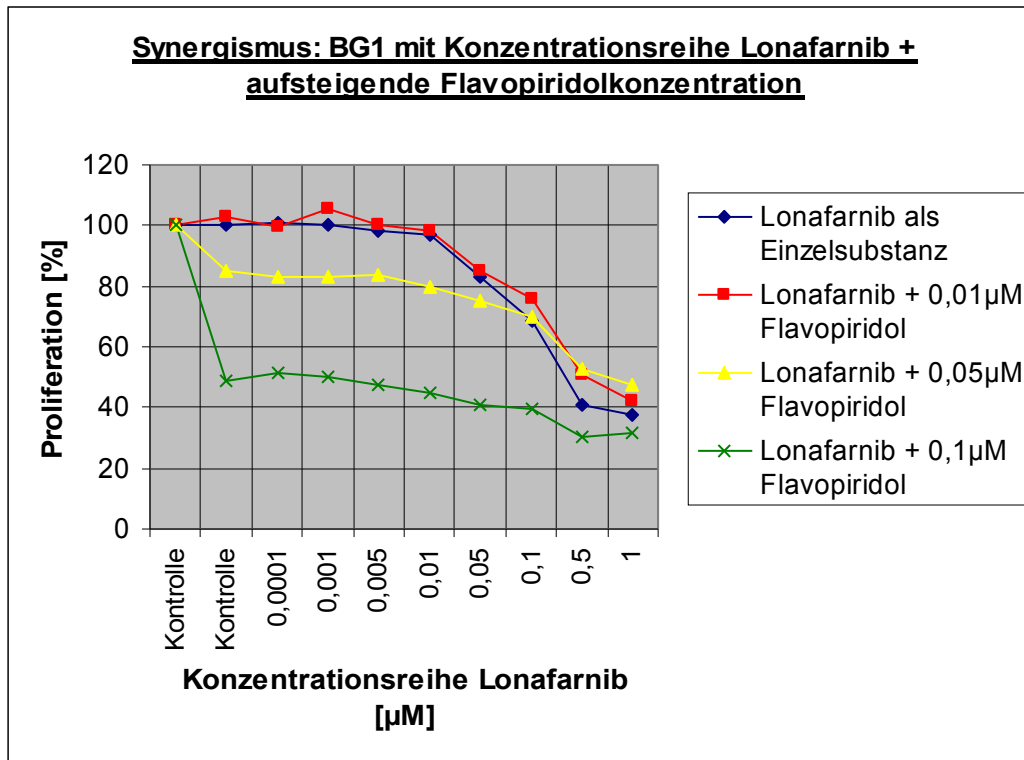


Abb. 3.1.16: Synergismusversuche BG1: Vergleich der vier unterschiedlichen Platten; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Bestimmung der Interaktionsindizes BG1

Bei Auftragung der Daten in ein Diagramm mit nicht logarithmischer X-Achse ergeben sich folgende Trendlinien und IC50- sowie IC30-Werte für die einzelnen Kombinationen:

Tab. 3.1.18: Vergleich der Trendlinien und der IC30/50-Werte der einzelnen Kombinationen bei BG1; berechnet mit der Methode nach Tallarida

	Platte 1 Konzentrationsreihe Flavopiridol ohne fixe Konzentration Lonafarnib	Platte 2 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 0,01µM	Platte 3 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 0,1µM	Platte 4 Konzentrationsreihe Flavopiridol mit fixer Konzentration Lonafarnib 1µM
Trendlinie	$y = -179,12x + 96,162$	$y = -167,07x + 89,153$	$y = -119,51x + 68,438$	$y = -108,44x + 62,907$
IC50	0,2577155	0,23435087	0,15427998	0,11902435

IC30	0,14605851	0,11464057	-0,01307004	-0,06540852
	Platte 5 Konzentrationsreihe Lonafarnib ohne fixe Konzentration Flavopiridol	Platte 6 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,01µM	Platte 7 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,05µM	Platte 8 Konzentrationsreihe Lonafarnib mit fixer Konzentration Flavopiridol 0,1µM
Trendlinie	$y = -67,248x + 93,262$	$y = -61,841x + 95,594$	$y = -40,566x + 82,506$	$y = -28,728x + 53,765$
IC50	0,64332025	0,73727786	0,80150902	0,13105681
IC30	0,34591363	0,41386782	0,30828773	-0,5651281

Berechnung der Interaktionsindizes (nach Tallarida):

Der Index γ ist definiert durch das isobole Verhältnis:

$$a/A + b/B = \gamma$$

dabei gilt:

A = Dosis der Einzelsubstanz A, welche den spezifischen Effekt erzielt

B = Dosis der Einzelsubstanz B, welche den spezifischen Effekt erzielt

a und b = Kombinationsdosis, welche den spezifischen Effekt erzielt

Bei $\gamma < 1$ liegt eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen vor, bei $\gamma = 1$ addieren sich die Wirkungen der beiden Medikamente und bei $\gamma > 1$ ist nicht von Synergismus der Substanzen auszugehen (Tallarida, 2002).

(IC50 Platte 2/ IC50 Platte 1) + (IC50 Platte 6/ IC50 Platte 5)

$$(0,23435087/0,2577155) + (0,73727786/0,64332025) = 2,05539051$$

=> kein Synergismus, da $\gamma > 1$

(IC50 Platte 3/ IC50 Platte 1) + (IC50 Platte 7/ IC50 Platte 5)

$$(0,15427998/0,2577155) + (0,80150902/0,64332025) = 1,84453883$$

=> kein Synergismus, da $\gamma > 1$

(IC50 Platte 4/ IC50 Platte 1) + (IC50 Platte 8/ IC50 Platte 5)

$$(0,11902435/0,2577155) + (0,13105681/0,64332025) = 0,66556336$$

=> Synergismus, da $\gamma < 1$

Bei Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib zur Behandlung von BG1-Zellen zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse: Im Konzentrationsbereich von 0,01µmolaren

Lonafarnib, 0,01µmolaren und 0,1µmolarem Flavopiridol kommt es im Vergleich zur Einzelgabe der Substanzen zu keiner synergistischen antiproliferativen Wirkung. Bei Kombination von 1µmolaren Lonafarnib und 0,1µmolarem Flavopiridol finden sich jedoch synergistische Effekte.

3.2 Annexin-V-Versuch

3.2.1 Methodik

Bei der Apoptose von Zellen kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellen auf die Außenseite. Phosphatidylserin läßt sich mit Hilfe von Annexin V in der Durchflußzytometrie nachweisen. Bei Annexin V handelt es sich um ein ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist.

Mit zusätzlicher Färbung mit Propidiumiodid kann Nekrose von Apoptose differenziert werden, da Propidiumiodid nur in Zellen mit permeabler Membran (also nekrotische Zellen) eindringt. Vitale Zellen lassen sich demnach weder mit Annexin V noch mit Propidiumiodid anfärben, apoptotische Zellen sind positiv für Annexin V und nekrotische Zellen nehmen sowohl Annexin V als auch Propidiumiodid auf (http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/ibef_annexin.htm).

In der Durchflußzytometrie zeigen sich die unterschiedlichen Zellstadien wie unten beispielhaft dargestellt.

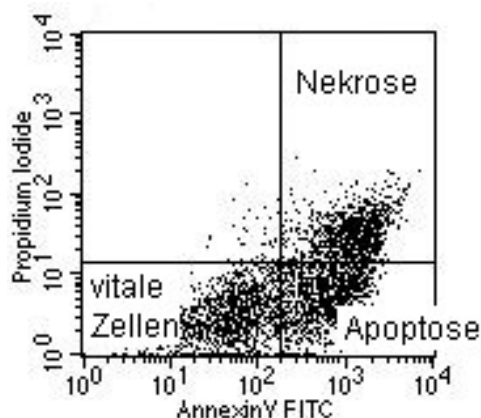


Abb. 3.2.1: beispielhafte FACS-Analyse eines Annexin-V-Versuches: im rechten oberen Quadranten stellen sich die nekrotischen Zellen dar (upper right = UR), im rechten unteren die apoptotischen (low right = LR), im linken unteren Quadranten (low left = LL) werden vitale Zellen abgebildet

Im oberen rechten Teil (UR; upper right) liegt der Anteil der nekrotischen Zellen. Unten links (LL; low left) werden vitale Zellen eingeordnet, während unten rechts (LR; low

right) apoptotische Zellen zur Darstellung kommen.

UR = nekrotische Zellen

LL = vitale Zellen

LR = apoptotische Zellen

3.2.2 SKOV3

Insgesamt wurden je drei, voneinander unabhängige Versuche durchgeführt; deren Mittelwerte und Standardabweichungen unten dargestellt sind.

Tab. 3.2.1: Annexin-V SKOV3: dargestellt sind die Mittelwerte [%] (grau hinterlegt) und die entsprechenden Standardabweichungen [%] aus insgesamt drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichungen < 13%; die jeweiligen Gates sind mit UL=Upper Left, UR=Upper Right, LL=Low Left und LR=Low Right abgekürzt; F=Flavopiridol, L=Lonafarnib

SKOV3	Mittelwerte (grau hinterlegt) und Standardabweichungen der gegateten Events [%]							
	Kontrolle		0,1µM F		0,5µM F		0,1µM L	
UL	2,95	0,27	4,30	2,37	2,79	0,95	3,49	0,48
UR	6,14	4,08	6,38	2,26	12,28	1,32	6,50	3,15
LL	75,55	10,54	75,51	6,46	49,07	10,79	76,89	7,94
LR	15,36	7,25	13,80	4,73	35,86	12,63	13,12	5,53
	1µM L		0,1µM F + 1µM L		0,5µM F + 0,1µM L			
UL	2,45	0,50	3,78	1,80	2,60	0,44		
UR	7,45	2,88	5,98	2,27	12,87	3,25		
LL	73,91	8,80	76,62	6,28	50,40	5,93		
LR	16,19	6,91	13,62	3,81	34,13	8,92		

Annexin-V-Versuch: SKOV3

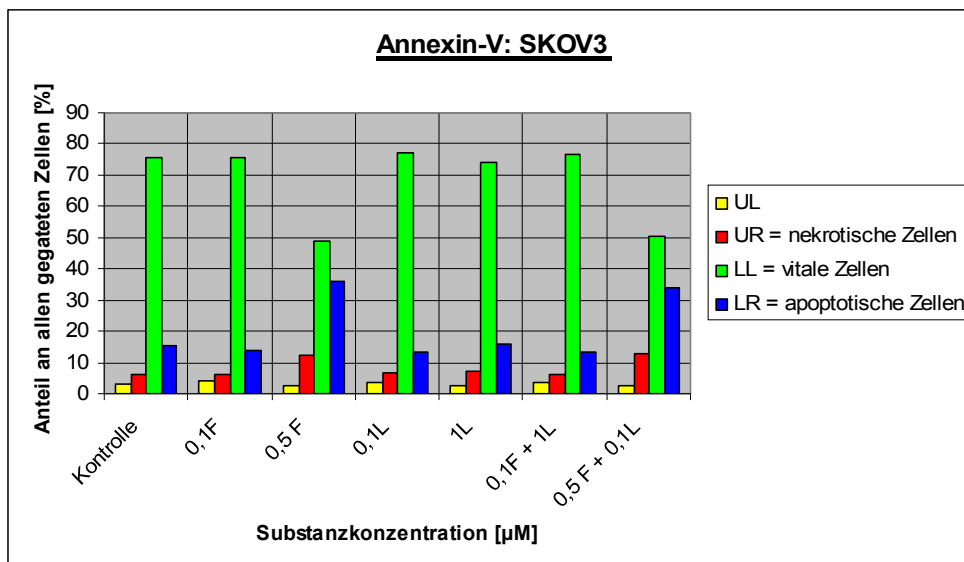


Abb. 3.2.2: Annexin-V-Versuche: SKOV3; dargestellt ist die Auswertung aus drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; UR = Anteil der nekrotischen Zellen, LL = vitale Zellen, LR = apoptotische Zellen [F = Flavopiridol, L = Lonafarnib]; Standardabweichungen < 13%;

Bei der Analyse der Annexin-V-Versuche mit SKOV3-Zellen zeigt sich, daß durchschnittlich 75,55% der Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe vital sind. In den mit den unterschiedlichen Substanzen bzw. deren Kombinationen behandelten Zellen reduziert sich wie oben tabellarisch dargestellt dieser Anteil bei Inkubation mit 0,5µmolarem Flavopiridol auf 49,07%, bei gleichzeitiger Behandlung mit 0,1µmolarem Lonafarnib auf 50,40%.

Bei Betrachtung der Anteile der apoptotischen und nekrotischen Zellen fällt auf, daß insbesondere bei Inkubation mit 0,5µmolarem Flavopiridol der Anteil der apoptotischen Zellen von 15,36%, der nekrotischen von 6,14% in der Kontrollgruppe auf 35,86% (Apoptose) bzw. auf 12,28% (Nekrose) steigt.

Bei Kombination von 0,5µmolarem Flavopiridol und 0,1µmolarem Lonafarnib erhöht er sich auf 34,13% (Apoptose) bzw. auf 12,87% (Nekrose). Die Behandlung mit den anderen Einzelsubstanzen bzw. deren Kombination verändert die Apoptoserate jedoch nicht wesentlich. Bei Inkubation von SKOV3-Zellen führt die Inkubation mit der kombinierten Gabe von höherdosiertem Flavopiridol und niedrigdosiertem Lonafarnib nicht zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate oder Nekroseinduktion. Die Effekte gleichen denen bei alleiniger Applikation von Flavopiridol.

3.2.3 BG1

Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Tab. 3.2.2: Annexin-V BG1: dargestellt sind die Mittelwerte [%] (grau hinterlegt) und die entsprechenden Standardabweichungen [%] aus insgesamt drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; Standardabweichungen < 16%; die jeweiligen Gates sind mit UL=Upper Left, UR=Upper Right, LL=Low Left und LR=Low Right abgekürzt; F=Flavopiridol, L=Lonafarnib

SKOV3	Mittelwerte (grau hinterlegt) und Standardabweichungen der gegateten Events [%]							
	Kontrolle		0,1µM F		0,5µM F		0,1µM L	
UL	1,16	0,18	1,00	0,33	1,40	0,30	1,48	0,14
UR	11,07	4,72	18,93	8,80	15,44	5,05	15,19	7,86
LL	69,22	7,95	40,84	13,97	41,67	9,93	56,51	14,58
LR	18,55	5,28	39,23	8,73	41,49	6,99	26,82	7,86
	1µM L		0,1µM F + 1µM L		0,5µM F + 0,1µM L			
UL	1,68	1,34	2,18	0,84	2,80	0,34		
UR	15,54	6,24	28,42	12,02	20,49	6,95		
LL	45,83	12,71	33,50	15,83	34,85	7,09		
LR	36,95	7,39	35,90	6,85	41,85	4,65		

Annexin-V-Versuch: BG1

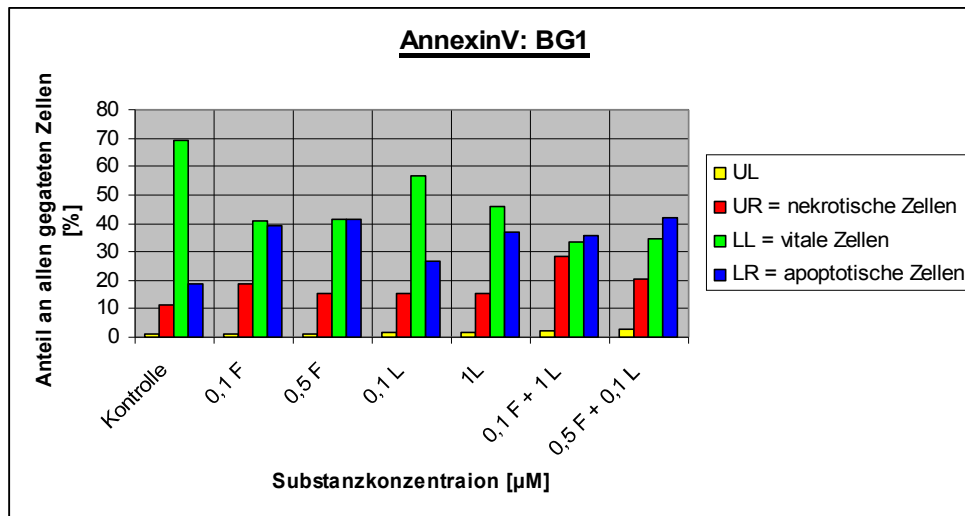


Abb. 3.2.3: Annexin-V-Versuche: BG1; dargestellt ist die Auswertung aus drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; UR = Anteil der nekrotischen Zellen, LL = vitale Zellen, LR = apoptotische Zellen [F = Flavopiridol, L = Lonafarnib]; Standardabweichungen < 16%

Bei der Analyse der Annexin-V-Versuche mit BG1-Zellen zeigt sich, daß durchschnittlich 69,22% der Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe vital sind. In den mit den unterschiedlichen Substanzen bzw. deren Kombinationen behandelten Zellen reduziert sich wie oben tabellarisch dargestellt dieser Anteil bei Inkubation bereits bei Inkubation mit den jeweiligen Einzelsubstanzen deutlich, eine noch ausgeprägtere Reduktion zeigt sich jedoch bei der gemeinsamen Gabe von Flavopiridol und Lonafarnib.

Größten Effekt erreicht die Behandlung mit 0,1 $\mu\text{molarem}$ Flavopiridol und 1 $\mu\text{molarem}$ Lonfarnib, die Population vitaler Zellen sinkt auf 33,50%. Bei Betrachtung der Anteile der apoptotischen Zellen fällt auf, daß der Anteil der apoptotischen Zellen von 18,55% in der Kontrollgruppe zwar in den jeweils behandelten Populationen steigt (insbesondere bei den mit Flavopiridol inkubierten), es lassen sich jedoch nur geringe Unterschiede zwischen den mit den Einzelsubstanzen und den mit der Wirkstoffkombination behandelten Zellen ausmachen (die Einzelgabe von 0,1 $\mu\text{molarem}$ Flavopiridol führt sogar noch zu einer etwas höheren Apoptoserate als die gemeinsame Gabe mit Lonafarnib).

Gegenüber einem Anteil von 11,07% nekrotischer Zellen in der Kontrollgruppe führt die gleichzeitige Inkubation von 0,1 $\mu\text{molarem}$ Flavopiridol und 1 $\mu\text{molarem}$ Lonfarnib zu einer Steigerung auf 28,42% (die jeweiligen Einzelsubstanzen steigern die

Population auf nur 18,93% (0,1µmolares Flavopiridol) bzw. 15,54% (1µmolares Lonfarnib).

Die Inkubation von BG1-Zellen mit 0,5µmolarem Flavopiridol und 0,1µmolarem Lonfarnib zeigt eine Steigerung der Nekrose auf 20,49% (hier erhöhen die jeweiligen Einzelsubstanzen die Population auf nur 15,44% (0,5µmolares Flavopiridol) bzw. 15,19% (0,1µmolares Lonfarnib).

Die Inkubation von BG1-Zellen mit den entsprechenden Substanzkombinationen führt ebenso wie bei SKOV3 nicht zu gesteigerten Apoptoseraten gegenüber den Einzelgaben, jedoch kommt es hier zu Nekroseinduktion und deutlicher Reduktion der Anteile vitaler Zellen.

3.3 Zellzyklusanalyse

Der Zellzyklus läßt sich in verschiedene Phasen gliedern:

M = Mitose

G1 = Gap 1

G0 = Ruhephase

S = Synthese-Phase

G2 = Gap 2

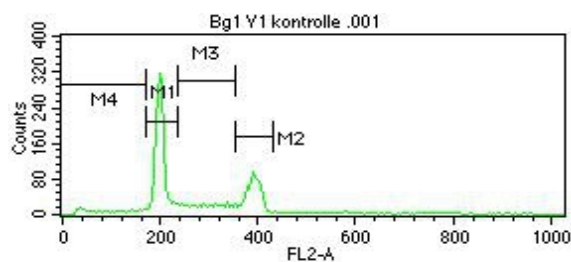


Abb. 3.3.1: Zellzyklusanalyse, beispielhafte Darstellung einer unbehandelten Probe der Zelllinie BG1; in den einzelnen Gates (M1 – M4) stellt sich der jeweilige Anteil der Zellen an der entsprechenden Zellzyklusphase dar

Bei der Interpretation der Zellzyklusanalyse gilt:

M1 = G0/1-Phase,

M2 = G2/M-Phase,

M3 = S-Phase,

M4 = <G1 (subG1 = apoptotische Zellen).

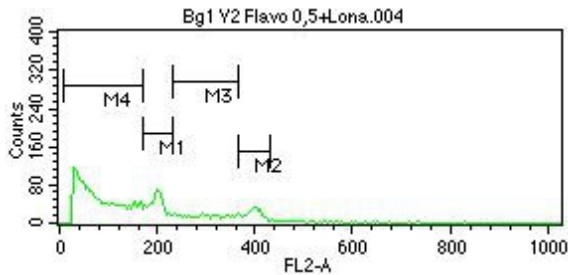


Abb. 3.3.2: beispielhafte Darstellung einer Zellzyklusanalyse bei Behandlung von BG1-Zellen mit 0,5μmolarem Flavopiridol versetzt mit 0,1μmolaren Lonafarnib.

3.3.1 SKOV3

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Mittelwerte und Standardabweichungen

Tab. 3.3.1: Zellzyklusanalyse SKOV3: Mittelwerte [%] (grau hinterlegt) und entsprechende Standardabweichungen [%] nach Gates (M1-M4) sortiert; prozentualer Anteile aller gegateten Zellen an den verschiedenen Gates, Darstellung der Mittelwerte aus fünf, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; * bedeutet signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; Standardabweichung < 9%

SKOV3	Mittelwerte (grau hinterlegt) und Standardabweichungen [%]							
	M1 (G0/1-Phase)		M2 (G2/M-Phase)		M3 (S-Phase)		M4 (<G1 (subG1 = apoptotische Zellen))	
	% Gated							
Kontrolle	69,85	5,45	14,01	1,06	5,69	0,42	7,96	5,66
Flavopiridol 0,5μM	*39,46	6,54	*38,7	8,71	*6,87	0,61	10,27	2,5
Flavopiridol 0,1μM	*61,83	0,99	*17,92	3	*8,64	1,08	7,21	3,56
Lonafarnib 1μM	65,13	4,88	14,01	3,14	7,31	1,64	9,28	6,29
Lonafarnib 0,1μM	70,82	3,88	13,43	2,46	5,29	0,44	7,74	5,86
Flavopiridol 0,5 μM + Lonafarnib 0,1μM	*39,36	8,3	*36,48	8,41	*7,22	1,36	11,64	3,37
Flavopiridol 0,1 μM + Lonafarnib 1μM	*57,98	4,33	*20,19	5,51	*8,51	1,49	8,09	4,16

Statistik

Statistische Analyse

Es wurden der T-Test für unverbundene Stichproben; P-Wert- und KI (Konfidenzintervall)- Bestimmung durchgeführt, um die Einzelsubstanzen sowie die Kombination der beiden Medikamente mit der Kontrollgruppe zu vergleichen.

Tab. 3.3.2: Zellzyklusanalyse bei SKOV3-Zellen: Vergleich der mit den jeweiligen Substanzen bzw. der Substanzkombination behandelten Zellen versus unbehandelter Kontrollgruppe; statistische Analyse mittels t-Test für unverbundene Stichproben; als signifikanter Unterschied gilt ein P-Wert <0,05; * bedeutet signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

	Gate			
	M1 (G0/1-Phase)	M2 (G2/M-Phase)	M3 (S-Phase)	M4 (<G1 (subG1 = apoptotische Zellen))
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,5	P-Wert: < 0,0001 * KI: 21,60 to 39,16	P-Wert: 0,0002 * KI: -33,75 to -15,65	P-Wert: 0,0072 * KI: -1,950 to -0,4220	P-Wert: 0,4288 ns KI: -8,680 to 4,072
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,1µM	P-Wert: 0,0119 * KI: 2,305 to 13,73	P-Wert: 0,0253 * KI: -7,195 to -0,6254	P-Wert: 0,0005 * KI: -4,149 to -1,759	P-Wert: 0,8061 ns KI: -6,130 to 7,646
Kontrolle vs. Lonafarnib 1µM	P-Wert: 0,1871 ns KI: -2,824 to 12,26	P-Wert: 0,9979 ns KI: -3,410 to 3,418	P-Wert: 0,0655 ns KI: -3,363 to 0,1314	P-Wert: 0,7376 ns KI: -10,03 to 7,409
Kontrolle vs. Lonafarnib 0,1µM	P-Wert: 0,7530 ns KI: -7,870 to 5,922	P-Wert: 0,6396 ns KI: -2,176 to 3,340	P-Wert: 0,1814 ns KI: -0,2278 to 1,020	P-Wert: 0,9516 ns KI: -8,168 to 8,624
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,5µM + Lonafarnib 0,1µM	P-Wert: 0,0001 * KI: 20,25 to 40,72	P-Wert: 0,0004 * KI: -31,22 to -13,72	P-Wert: 0,0432 * KI: -3,000 to -0,05977	P-Wert: 0,2471 ns KI: -10,47 to 3,113
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,1µM + Lonafarnib 1µM	P-Wert: 0,0051 * KI: 4,687 to 19,04	P-Wert: 0,0393 * KI: -11,97 to -0,3869	P-Wert: 0,0036 * KI: -4,418 to -1,226	P-Wert: 0,9690 ns KI: -7,368 to 7,116

Bei Analyse der Versuche zum Zellzyklus von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit sowohl den Einzelsubstanzen als auch den Kombinationen der beiden Medikamente zeigt sich eine deutliche Veränderung des Zellzyklus durch die Medikamente.

Schon die alleinige Gabe von Flavopiridol führt durchgängig zu signifikanten Verschiebungen innerhalb des Zellzyklus in den Gates M1-M3; ausgenommen die sub-G1-Phase (Gate M4; apoptotischen Fraktion). Insgesamt hat 0,5µmolares Flavopiridol einen wesentlich ausgeprägteren Effekt als das geringer konzentrierte Medikament. So sinkt die Zellzahl der mit 0,5µmolarem Flavopiridol behandelten Population in Gate M1 von 69,85% (Kontrollgruppe) beinahe auf die Hälfte (39,46%).

Der Anteil der Zellen in Gate M2 steigt von 12,64% bei den unbehandelten Zellen auf 32,47%; 0,1µmolares Flavopiridol hat noch weniger deutliche Effekte.

Alleine Behandlung mit Lonafarnib führt zu keinerlei signifikanten Verschiebungen im

Zellzyklus.

Die Effekte bei kombinierter Gabe beider Substanzen ähneln im Ausprägungsgrad deutlich den Einzeleffekten von Flavopiridol bzw. imitieren sich. Eine Summation der Einzeleffekte zeichnet sich bei statistischer Analyse nicht ab.

Zellzyklusanalyse: SKOV3

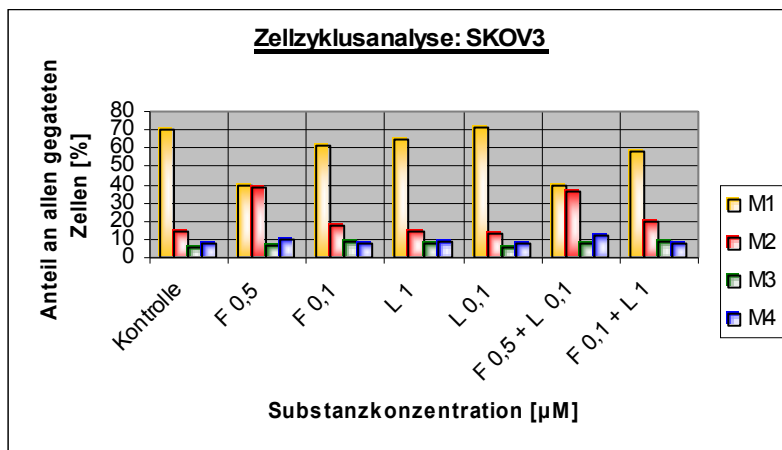


Abb. 3.3.3: Zellzyklusanalyse von SKOV3-Zellen; dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus fünf, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

3.3.2 BG1

Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen

Mittelwerte und Standardabweichungen

Tab. 3.3.3: Zellzyklusanalyse BG1: Mittelwerte [%] (grau hinterlegt) und entsprechende Standardabweichungen [%] nach Gates (M1-M4) sortiert; prozentualer Anteile aller gegateten Zellen an den verschiedenen Gates, Darstellung der Mittelwerte aus vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen; * bedeutet signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; Standardabweichung < 9%

BG1	Mittelwerte (grau hinterlegt) und Standardabweichungen [%]							
	M1 (G0/1-Phase)		M2 (G2/M-Phase)		M3 (S-Phase)		M4 (<G1 (subG1 = apoptotische Zellen))	
	% Gated							
Kontrolle	47,37	1,7	23,7	0,84	18,48	1,73	7,44	1,7
Flavopiridol 0,5µM	*21,34	1,79	*13,87	2,8	*14,66	1,79	*49,82	3,2
Flavopiridol 0,1µM	*35,84	2,34	24,17	3,78	18,35	1,15	*19,45	2,08
Lonafarnib 1µM	*34,4	2,14	23,19	3,39	16,06	0,62	*23,63	5,1
Lonafarnib 0,1µM	43,23	2,88	21,89	3,44	17,43	0,56	*15,19	5,02
Flavopiridol 0,5 µM + Lonafarnib 0,1µM	*20,5	2,62	*12,93	4,25	*12,41	0,89	*52,46	4,44

Flavopiridol 0,1 µM + Lonafarnib 1µM	36,64	7,65	22,24	1,77	*15,33	0,64	*23,19	8,08
---	-------	------	-------	------	--------	------	--------	------

Statistik

Statistische Analyse

Es wurden der T-Test für unverbundene Stichproben; P-Wert- und KI (Konfidenzintervall) Bestimmung durchgeführt, um die Einzelsubstanzen sowie die Kombination der beiden Medikamente mit der Kontrollgruppe zu vergleichen.

Tab. 3.3.4: Zellzyklusanalyse bei BG1-Zellen: Vergleich der mit den jeweiligen Substanzen bzw. der Substanzenkombination behandelten Zellen versus unbehandelter Kontrollgruppe; statistische Analyse mittels t-Test für unverbundene Stichproben; als signifikanter Unterschied gilt ein P-Wert <0,05; * bedeutet signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

	Gate			
	M1 (G0/1-Phase)	M2 (G2/M-Phase)	M3 (S-Phase)	M4 (<G1 (subG1 = apoptotische Zellen))
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,5	P-Wert: <0.0001 * KI: 22.53 to 29.52	P-Wert: 0,0011 * KI: 5.711 to 13.96	P-Wert: 0,0381 * KI: 0.2909 to 7.329	P-Wert: <0.0001 * KI: -47.50 to -37.25
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,1µM	P-Wert: 0,0005 * KI: 7.443 to 15.61	P-Wert: 0,8406 ns KI: -5.945 to 5.005	P-Wert: 0,9171 ns KI: -2.801 to 3.061	P-Wert: 0,0002 * KI: -15.80 to -8.214
Kontrolle vs. Lonafarnib 1µM	P-Wert: 0,0002 * KI: 9.108 to 16.82	P-Wert: 0,8104 ns KI: -4.424 to 5.434	P-Wert: 0,0630 ns KI: -0.1791 to 5.004	P-Wert: 0,0020 * KI: -23.79 to -8.589
Kontrolle vs. Lonafarnib 0,1µM	P-Wert: 0,0755 ns KI: -0.5806 to 8.861	P-Wert: 0,4096 ns KI: -3.187 to 6.807	P-Wert: 0,3560 ns KI: -1.516 to 3.611	P-Wert: 0,0444 * KI: -15.23 to -0.2668
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,5µM + Lonafarnib 0,1µM	P-Wert: <0.0001 * KI: 22.46 to 31.28	P-Wert: 0,0051 * KI: 4.636 to 16.89	P-Wert: 0,0016 * KI: 3.325 to 8.815	P-Wert: <0.0001 * KI: -51.74 to -38.30
Kontrolle vs. Flavopiridol 0,1µM + Lonafarnib 1µM	P-Wert: 0,0553 ns KI: -0.3342 to 21.79	P-Wert: 0,2433 ns KI: -1.306 to 4.236	P-Wert: 0,0252 * KI: 0.5471 to 5.753	P-Wert: 0,0163 * KI: -27.41 to -4.081

Bei Analyse der Versuche zum Zellzyklus von BG1-Zellen bei Behandlung mit sowohl den Einzelsubstanzen als auch den Kombinationen der beiden Medikamente zeigt sich eine noch deutlichere Veränderung des Zellzyklus durch die Medikamente als bei den

SKOV-3-Zellen.

Schon die alleinige Gabe von 0,5µmolarem Flavopiridol führt durchgängig zu signifikanten Verschiebungen innerhalb des Zellzyklus. Um mehr als die Hälfte sinkt die Zahl der Zellen in Gate M1 von 47,37% in der Kontrollgruppe auf 21,34% in der behandelten Population. Der Anteil der apoptotischen Fraktion in Gate M4 steigt von 7,44% um das siebenfache (auf 49,82%) bei Inkubation mit dem Kinaseinhibitoren. Bei den beiden anderen Gates zeigen sich diskretere Verschiebungen; ebenso ist die Wirkung durch niedermolares Flavopiridol insgesamt weniger stark ausgeprägt, jedoch deutlich signifikant in Gate M1 und M4.

1µmolares Lonafarnib führt zu ähnlichen Resultaten wie 0,1µM Flavopiridol; in der niedrigeren 0,1µmolaren Konzentration bewirkt es nur noch eine Verdoppelung der apoptotischen Zellen.

Durch Behandlung mit den Kombinationen beider Substanzen zeigen sich zwar teils signifikante Änderungen des Zellzyklus, jedoch ist der Grad der Ausprägung den jeweiligen Effekten der Einzelgabe von Flavopiridol sehr ähnlich (bei Betrachtung der reinen Mittelwerte unter Vernachlässigung der Standardabweichungen). Es bleibt also fraglich, inwiefern diese Verschiebung als Einzeleffekt von Flavopiridol zu interpretieren ist.

Zellzyklusanalyse: BG1

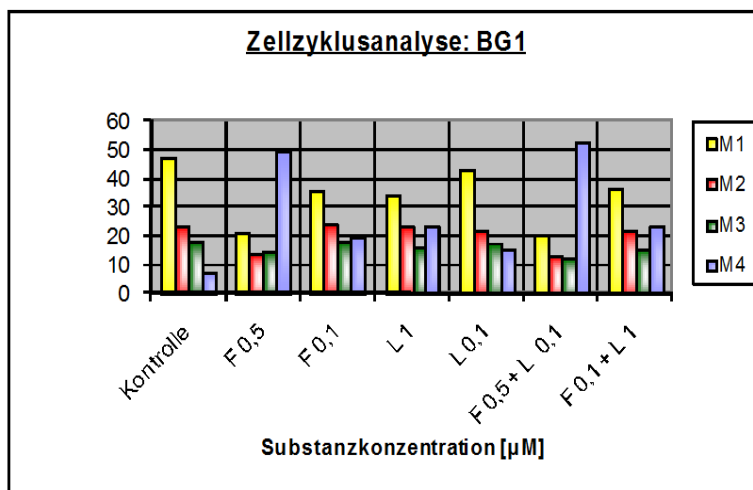


Abb. 3.3.4: Zellzyklusanalyse BG1: dargestellt sind die Mittelwerte aus je vier, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen, F = Flavopiridol, L = Lonafarnib

3.4 Western Blotting

Wie bei den Versuchen zu Zellzyklus und Annexin-V wurden auch bei den Western Blots beide Zelllinien mit Flavopiridol in 0,5 μ molaren und 0,1 μ molaren, mit Lonafarnib in 1 μ molaren und 0,1 μ molaren Konzentrationen sowie je Kombinationen der beiden Medikamente inkubiert. Als Antikörper wurden HDJ-2, HIF1 sowie anti- β -Aktin als housekeeping-gene verwendet. Anti- β -Aktin dient hierbei als sogenannte Ladekontrolle, da dieses Protein im vorliegenden Zellgewebe weitestgehend konstant und stabil exprimiert wird. Dargestellt ist pro Zelllinie und untersuchtem Protein je ein repräsentativer Blot.

Bei den Abbildungen gilt:

- 1 = Kontrolle
- 2 = Flavopiridol 0,5 μ M
- 3 = Flavopiridol 0,1 μ M
- 4 = Lonafarnib 0,1 μ M
- 5 = Lonafarnib 1 μ M
- 6 = Flavopiridol 0,5 μ M + Lonafarnib 0,1 μ M
- 7 = Flavopiridol 0,1 μ M + Lonafarnib 1 μ M

3.4.1 Aktin

3.4.1.1 SKOV3 und 3.4.1.2 BG1

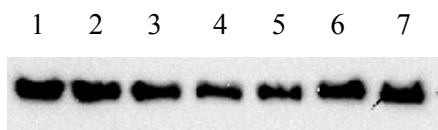


Abb. 3.4.1: SKOV3 Aktin

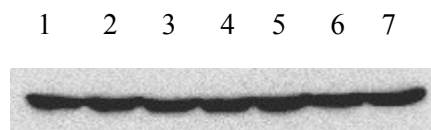


Abb. 3.4.2: BG1 Aktin 20min

Ladekontrolle mit Anti- β -Aktin-Antikörper bei SKOV3- (links) sowie BG1-Zellen (rechts)

Anti- β -Aktin-Antikörper dienen als sogenanntes Housekeeping-Gene-coded-Protein bei der Western-Blot-Analyse. Bei beiden Zelllinien zeigen sich gleiche Kammerladungen und gleichmäßige Blots.

3.4.2 HDJ2

3.4.2.1 SKOV3

1 2 3 4 5 6 7

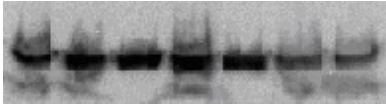


Abb. 3.4.3: SKOV3 HDJ2 30sec

Nach 30 Sekunden deutet sich eine etwas stärkere Bandenbreite insbesondere bei den Proben 4 und 5 an, die deutlichste Hochregulierung von HDJ2 lässt sich also hier bei Inkubation mit der Einzelsubstanz Lonafarnib vermuten. Eher zu einer Downregulierung kommt es bei Kombination der zwei Substanzen.

1 2 3 4 5 6 7

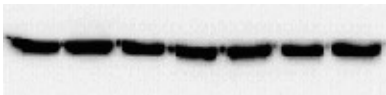


Abb. 3.4.4: SKOV3 HDJ2 2min

Nach 2 Minuten lässt sich kein eindeutiger Unterschied in der Breite der Banden der sieben Proben ausmachen; eine leichte Hochregulierung von HDJ2 könnte sich bei den Proben 2 und 7 andeuten.

1 2 3 4 5 6 7

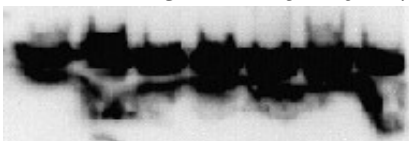


Abb. 3.4.5: SKOV3 HDJ2 20min: Versuch so nicht verwertbar (zu viel Protein aufgetragen)

3.4.2.2 BG1

1 2 3 4 5 6 7

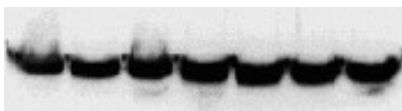


Abb. 3.4.6: BG1 HDJ2 1 Min: BG1-Zellen inkubiert mit je zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Lonafarnib und Flavopiridol sowie zwei Kombinationen der beiden Substanzen versus unbehandelter Kontrollgruppe; verwendeter Antikörper: HDJ2

Stärkere Banden finden sich bei den Proben 4 und 5, bei den nur mit den Einzelkonzentration von Lonafarnib behandelten Zellen, sowie auch bei den Kombinationen beider Substanzen. Es kommt zu einer diskreten Hochregulierung von HDJ2 durch Behandlung der Zellen, wobei Lonafarnib dafür verantwortlich zu sein scheint. Bei Kombination mit Flavopiridol findet sich keine weitere Hochregulierung, die Proteinexpression entspricht ungefähr der bei Einzelgabe des FTI.

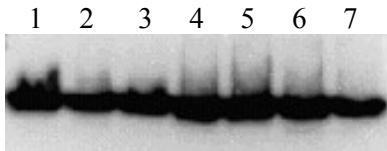


Abb. 3.4.7: BG1 HDJ2 20min

Nach 20 Minuten zeigen sich die Banden bei den oben beschriebenen Proben noch ausgeprägter. Jedoch läßt sich auch hier keine eindeutige Aussage zu einer erhöhten Konzentration des Proteins HDJ2 machen. Wie auch nach 1Minute deutet sich eher durch Einzelgabe von Lonafarnib eine dezente Hochregulierung von HDJ2 an; keinesfalls jedoch ein deutlicher Effekt durch Kombination beider Medikamente.

3.4.3 HIF

3.4.3.1 SKOV3

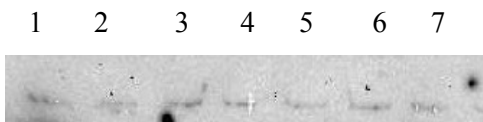


Abb. 3.4.8: SKOV3 HIF 30min

Es läßt sich keine Aussage treffen, da eine Proteinexpression kaum nachweisbar ist.

3.4.3.2 BG1

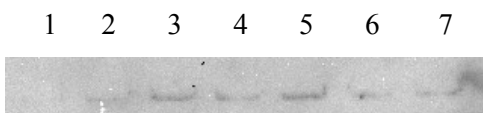


Abb. 3.4.9: BG1 HIF 20min

Auch bei BG1 ist eine Aussage nicht möglich; es kommt zu keiner interpretierbaren

Proteinexpression. Sowohl bei SKOV3 als auch bei BG1-Zellen ist die HIF1a Bande > 120kD (ca. 200kD).

4.DISKUSSION

4.1 Ziel der Studie

Der überwiegende Anteil der Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom erkranken, stirbt auch heutzutage noch immer trotz vielfältiger neuer Therapieansätze.

Ziel dieser Studie war es, mögliche synergistische Effekte von Lonafarnib und Flavopiridol auf Proliferation und Zellzyklus von humanen Ovarialkarzinomzellen in vitro aufzudecken.

Im Folgenden werden hierzu die Ergebnisse der Studie vor dem Hintergrund der Fragestellung erläuternd reflektiert.

4.2 Antiproliferative Eigenschaften der Einzelsubstanzen (Proliferationsversuche)

Bei SKOV3 zeigt sich die ausgeprägteste antiproliferative Wirkung durch Lonafarnib und Flavopiridol nach Inkubation über 144 Stunden, bei Behandlung von BG1-Zellen führt Flavopiridol nach 144 und Lonafarnib nach 192 Stunden zu größter Proliferationshemmung. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Inkubationszeiten für die nachfolgenden Versuchsreihen gewählt.

Die Proliferationshemmung durch Flavopiridol ist im untersuchten Dosisbereich auf beide Zelllinien deutlich ausgeprägter als die des Farnesyltransferaseinhibitors Lonafarnib, ein Effekt der besonders deutlich bei SKOV3-Zellen hervortritt. Flavopiridol bewirkt bei beiden Zelllinien eine ähnlich stark ausgeprägte Proliferationshemmung, während SKOV3-Zellen auf Lonafarnib deutlich weniger sensibel reagieren als BG1-Zellen.

Dementsprechend unterscheiden sich die jeweiligen IC50- und IC30-Werte (s.u.).

Vergleich der IC50- und IC30-Werte von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung von SKOV3-Zellen:

Tab. 4.1.1: Vergleich der jeweiligen IC-Werte der beiden untersuchten Substanzen bei Inkubation von SKOV3-Zellen

SKOV3	IC50	IC30
Flavopiridol	0,43699719	0,19246852
Lonafarnib	2,66207008	1,58052131

Vergleich der IC50- und IC30-Werte von Flavopiridol und Lonafarnib bei Behandlung

von BG1-Zellen:

Tab. 4.1.2: Vergleich der jeweiligen IC-Werte der beiden untersuchten Substanzen bei Inkubation von BG1-Zellen

BG1	IC50	IC30
Flavopiridol	0,44399227	0,205306
Lonafarnib	0,68334549	0,39167274

4.2.1 Synergismus bei BG1-Zellen, jedoch nicht bei SKOV3

Die Analyse der Interaktionsindizes zeigt, daß es bei Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib zur Behandlung von SKOV3-Zellen zu keinem synergistischen Effekt der beiden Substanzen kommt, da die γ -Werte durchweg größer als 1 sind.

Bei Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib zur Behandlung von BG1-Zellen stellt sich ein anderes Ergebnis dar: bei gleichzeitiger Inkubation von 0,01 μ molaren Lonafarnib und 0,01 μ molaren Flavopiridol kommt es im Vergleich zur Einzelgabe der Substanzen zu keiner synergistischen antiproliferativen Wirkung.

Bei höher dosierten Wirkstoffkonzentrationen zeigen sich jedoch synergistische Effekte, d.h. bei Verwendung von 1 μ molaren Lonafarnib und 0,1 μ molarem Flavopiridol. Damit von einer synergistischen Interaktion zwischen zwei Substanzen gesprochen werden kann, muß die Dosis jedes einzelnen Medikamentes in der Kombination niedriger sein, um einen bestimmten Effekt zu erreichen, als bei Verwendung der Einzelsubstanz. Bei Vorliegen eines synergistischen Effektes lassen sich auch Rückschlüsse über die Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen ziehen (Tallarida et al., 1999).

4.3 Apoptose- und Nekroseinduktion und Reduktion vitaler Zellen bei kombinierter Substanzapplikation

Mithilfe der Annexin-V-Methode lassen sich Zellpopulationen in vitale, apoptotische und nekrotische Fraktionen differenzieren. Apoptosevorgänge können bereits in einem frühen Stadium identifiziert werden.

Bei Inkubation von SKOV3-Zellen führt die Behandlung mit der kombinierten Gabe von Flavopiridol und Lonafarnib zu keiner Veränderung der Apoptoserate oder einer Nekroseinduktion. Die Effekte gleichen denen bei alleiniger Applikation von

Flavopiridol.

Bei BG1 zeigen sich durch Kombination mit 0,1µmolarem Flavopiridol und 1µmolaren Lonafarnib jedoch ausgeprägte Effekte, die sich von denen der Einzelsubstanzen unterscheiden: Der Anteil der nekrotischen Zellen steigt deutlich an; ein Effekt, der bei den jeweiligen Einzelsubstanzen zwar ebenso auszumachen ist, aber bei kombinierter Gabe kommt es zu einer 2,5fachen Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen. Auch ist die Reduktion vitaler Zellen deutlich ausgeprägter bei gemeinsamer Gabe beider Medikamente. Die Anzahl an apoptotischen Zellen zeigt hingegen im Vergleich zur Einzelgabe keine bedeutsamen Unterschiede. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 0,5µmolarem Flavopiridol und 0,1µmolaren Lonafarnib kommt es ebenso zu einer deutlichen Nekroseinduktion; der Anteil der vitalen Zellen reduziert sich im Vergleich zur Einzelgabe, jedoch zeigt sich keine gesteigerte Apoptoserate bei kombinierter Gabe.

Diese Ergebnisse lassen sich mit den Resultaten aus den Proliferationsassays in Einklang bringen: Die Effekte bei Behandlung von SKOV3-Zellen sind bei den Proliferationsversuchen, bei denen nur die absolute Zellzahl berücksichtigt werden kann, insgesamt weniger deutlich; darüber hinaus liefert die Untersuchung von Nekrose- und Apoptosevorgängen keine Anhalte, daß bei SKOV3-Zellen die kombinierte Gabe von Flavopiridol und Lonafarnib zu Veränderungen der Zellsubstanz führt – bei der Interpretation sollte jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß sich signifikante synergistische Effekte vielleicht in einem anderen Konzentrationsbereich als dem hier untersuchten ausmachen lassen. Inkubation von BG1-Zellen mit den beiden Substanzen in den Proliferationsassays führt zu stärker ausgeprägten und synergistischen Effekten; eine mögliche Erklärung hierfür könnten oben erläuterte Ergebnisse aus den AnnexinV-Versuchen anbieten.

4.4. Veränderung des Zellzyklus

Insgesamt ist der Effekt von Flavopiridol wesentlich ausgeprägter auf BG1-Zellen als auf SKOV3-Zellen.

4.4.1 SKOV3

Bei Analyse der Versuche zum Zellzyklus von SKOV3-Zellen bei Behandlung mit

sowohl den Einzelsubstanzen als auch den Kombinationen der beiden Medikamente zeigt sich eine deutliche Veränderung des Zellzyklus durch die Medikamente: Flavopiridol führt bei alleiniger Gabe sowie in Kombination mit Lonafarnib zu signifikanten Umverteilungen der Zellzyklusphasen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auffällig sind insbesondere bei 0,5µmolarem Flavopiridol der im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Anteil gegateter Zellen der G2/M-Phase, ein Effekt der sich so auch bei Kombination von 0,5µmolarem Flavopiridol und 0,1µmolarem Lonafarnib findet.

Ebenso zeigen sich in der G0/1-Phase sowohl bei 0,5 als auch bei 0,1µmolarem Flavopiridol als Einzelsubstanz sowie bei Kombination von 0,5µmolarem Flavopiridol und 0,1µmolarem Lonafarnib bzw. 0,1µmolarem Flavopiridol und 1µmolarem Lonafarnib eine signifikante Reduktion gegateter Zellen. Bei alleiniger Gabe von Lonafarnib kommt es zu keinen signifikanten Umverteilungen innerhalb des Zellzyklus.

Es bleibt fraglich, inwiefern die beschriebenen Verschiebungen bei der Zellzyklusanalyse von SKOV-3-Zellen als Einzeleffekte von Flavopiridol zu interpretieren ist, denn bei Kombination mit Lonafarnib scheinen sich weder das Ausmaß noch die Art der Umverteilung wesentlich von denen der Flavopiridoleinzelgabe zu unterscheiden. Auch die statistische Analyse der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, dass das jeweilige Ausmaß einer signifikanten Hemmung durch die Einzelsubstanz Flavopiridol dem der mit Lonafarnib kombinierten gleicht; es läßt sich bei der Zellzyklusanalyse also vielmehr vermuten, daß die antiproliferativen Effekte durch Flavopiridol zu den jeweiligen Umverteilungen innerhalb des Zellzyklus durch die Substanz Flavopiridol bedingt sind und nicht auf einem synergistischen Effekt mit Lonafarnib beruhen. Dies entspricht den Ergebnissen aus Proliferationsassays und Annexin-V-Versuchen.

4.4.2 BG1

Bei Analyse der Versuche zum Zellzyklus von BG1-Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei SKOV3-Zellen: bei Behandlung mit sowohl den Einzelsubstanzen als auch den Kombinationen der beiden Medikamente zeigt sich eine deutliche Veränderung des Zellzyklus durch die Medikamente.

Flavopiridol führt auch hier schon bei alleiniger Gabe sowie in Kombination mit

Lonafarnib zu einer signifikanten Umverteilung der Zellzyklusphasen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auffällig sind insbesondere bei 0,5 und 0,1µmolarem Flavopiridol der im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere Anteil gegateter Zellen der G0/1-Phase, ein Effekt, der sich in sehr ähnlichen Ausmaß so auch bei der entsprechenden Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib findet und der Kombination von 0,1µmolarem Flavopiridol und 1µmolarem Lonafarnib. Auch in der G2/M-Phase zeigt sich eine deutlich signifikante Reduktion durch 0,5µmolarem Flavopiridol als Einzelsubstanz wie auch in Kombination mit 0,1µmolarem Lonafarnib (jedoch nicht bei Einzelgabe von 0,1µmolarem Flavopiridol und seiner Kombination mit Lonafarnib).

Besonders eindrücklich ist der fast siebenfach höhere Anteil an apoptotischen Zellen in der mit 0,5µmolarem Flavopiridol inkubierten Fraktion gegenüber der Kontrollpopulation. Flavopiridol führt zu einem Zellzyklusarrest in der subG1-Fraktion. Etwas deutlicher ist dieser Effekt noch bei zusätzlicher Behandlung mit 1µmolarem Lonafarnib. Die niedriger dosierte Behandlung mit Flavopiridol erzielte ähnliche, jedoch nicht so ausgeprägte Effekte.

4.5 Proteinexpression – Western Blots

Bei beiden Zelllinien findet sich eine Hochregulierung von HDJ2; bei Einzelgabe von Lonafarnib bei SKOV3 und darüberhinaus in Kombination mit Flavopiridol bei BG1. HDJ2 ist ein Heat-Chock-Protein, das an der Signaltransduktion und Zelltransformationsvorgängen beteiligt ist und von der Farnesyltransferase modifiziert wird. Es lässt sich also durch gesteigerte Expression zeigen, daß es zu einer Inhibition der Farnesyltransferase durch Behandlung mit Lonafarnib kommt, da es dann als Substrat der FT unfarnesyliert bleibt.

Zu einer veränderten HIF-Expression lassen sich keine Aussagen treffen, da die Western Blots bei beiden Zelllinien kaum messbare Ergebnisse liefern.

4.6 Flavopiridol als Einzelsubstanz

Flavopiridol hemmt neben den CDK1, 2 und 4 bevorzugt die CDK9 über eine Blockierung anderer CDK, wobei insbesondere die CDK9 eine wichtige Angriffsstelle in der Krebstherapie zu sein scheint. Darüberhinaus scheinen die CDK9-Aktivität und

mit der CDK9 interagierende Proteine auch mit anderen Krankheiten (z.B. AIDS oder kardiale Hypertrophie) assoziiert zu sein (Kryštof et al., 2012).

Behandlung von Zellen (z.B. Neutrophilen) mit Flavopiridol erhöht die Apoptoserate und induziert eine Hemmung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 (Wang et al., 2012).

Flavopiridol agiert wie in der Einleitung beschrieben als Inhibitor von Thyrosin- und Serinkinasen (Newcomb, 2004) und verschiedener zyklinabhängiger Kinasen. In hohen Dosen hemmt es auch den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor und Proteinkinasen und führt in vitro zu einem Zellzyklusarrest. Je nach untersuchtem System zeigt sich ein G1/S- oder ein G2/M-Phasen-Arrest. Es kann jedoch auch direkt Apoptose induzieren.

Beide hier untersuchten Zelllinien weisen insbesondere nach höherdosierter Flavopiridolbehandlung in der Zellzyklusanalyse eine deutliche Zellzahlreduktion in der G0/1-Phase auf, ebenso der G2/M-Phase bei BG1. Bei SKOV3-Zellen kommt es jedoch zu einem deutlichen Anstieg der G2/M-Phase. Bei SKOV3-Zellen läßt sich keine signifikante Veränderung der <G1-Fraktion (subG1 = apoptotische Zellen) ausmachen, während BG1-Zellen einen fast siebenfachen Anstieg erfahren. Während sich die Ergebnisse der Behandlung von BG1-Zellen mit den in anderen Studien beschriebenen Zellzyklusarresten vergleichen lassen, finden sich bei Analyse der SKOV3-Ergebnisse widersprüchliche Ergebnisse.

4.6.1 Beeinflussung der CDK

4.6.1.1 CDK1: ATP-Hemmung

Als Antagonist der CDK1 hemmt Flavopiridol kompetitiv ATP, was wiederum den Zellzyklus noch vor dem Eintritt in die S- oder M-Phase beeinflusst. Durch Veränderung der CDK1 wird der Übergang von der G2- in die M-Phase gestört und bewirkt einen verzögerten Eintritt in die S-Phase (Aklilu et al., 2003).

4.6.1.2 CDK-2, CDK-4 und CDK-6: Hypophosphorylierung des Rb-Proteins

Beim Übergang von Zellen am G1-S-checkpoint bilden Cyclin D und E Komplexe mit CDK-2, CDK-4 und CDK-6 (Raju et al., 2003). CDK-2, -4 und -6 sind also an der Kontrolle der G1/S- G1/S-Transition beteiligt (Jaschke et al., 2004).

In der G0/1-Phase ist vorwiegend die CDK4 durch Bindung an Cyclin D an der Kontrolle der G1/S-Transition beteiligt. Insbesondere die CDK4 wird durch Flavopiridol inhibiert: Es kommt zu einem Proliferationsarrest in der G1/S-Phase.

Aus der Hemmung der CDK2, welche in der G1- und S-Phase eine entscheidende Rolle für die Kontrolle der G1/S-Transition sowie die S-Progression spielt, könnte u.a. der reduzierte Anteil der Zellen in der S-Phase resultieren. Allerdings könnte auch, wie oben erläutert, eine Störung des Eintritts in die S-Phase durch CDK1-Antagonismus dafür verantwortlich sein.

Die am G1-S-checkpoint gebildeten Komplexe aus Cyclin D und E Komplexe mit CDK-2, CDK-4 und CDK-6 bedingen Phosphorylierungsvorgänge des Rb-Proteins, welches in phosphoryliertem Zustand vom E2F-Transkriptionsfaktor dissoziiert, um sich mit einem sogenannten Dimerisationsprotein zu verbinden. Dieser Komplex aktiviert Transkriptionsprozesse für die Zellzyklusprogression (Raju et al., 2003).

Flavopiridol bewirkt eine Minderphosphorylierung des Rb-Proteins, während der E2F/Rb-komplex nicht beeinflusst wird; letztendlich resultiert also eine Hemmung der Zellzyklusprogression (Raju et al., 2003).

4.6.1.3 CDK-9/7: Inhibition antiapoptotischer Proteine

Durch Inhibition der CDK-9 und -7 werden zelluläre Transkriptionsvorgänge beeinflusst; insbesondere die Expression von mRNA für antiapoptotische Proteine, Zellzyklusregulatoren und Signaltransduktionsmoleküle innerhalb von p53- und nuclear- factor-kappa- B-(NF-κB) Wegen (Li et al., 2007).

4.6.1.4 CDK-4/6: Verminderung von erb-B2-Rezeptor-Leveln

Durch Bindung von Cyclin an die CDK-4 erfolgt eine Aktivierung des Komplexes.

Cyclin 1 wird für die Transformation von erb-B2 benötigt. Erb-B2 wird u.a. in Ovarialkarzinomzellen überexprimiert, so daß ein Zusammenhang zwischen erb-B2 und Regulation des Cyclin D1-CDK-Komplexes vermutet werden kann. Flavopiridol hemmt CDK-Aktivitäten, senkt Cyclin 1-Protein-Level und erb-B2-Rezeptor-Level.

Im Tierversuch zeigen sich Mäuse, denen Cyclin D1 fehlt, resistent gegenüber erb-B2 vermittelter Tumorentstehung. Insbesondere CDK4/6 Aktivität spielt eine Rolle bei durch erb-B2 vermittelter Transformation und führt reziprok zu einer Verminderung von

erb-B2-Rezeptor-Leveln (Nahta et al., 2002).

4.6.2 Antiapoptotische Wirkung

Durch CDK-Hemmung läßt sich nicht der ausgeprägte Anstieg apoptotischer Zellen erklären: Es kommt zu einer deutlich signifikanten Umverteilung zugunsten der apoptotischen Zellen bei Behandlung mit 0,5µmolarem Flavopiridol.

Flavopiridol vermag proapoptotisch auf nicht-zyklische Zellen wirken, was insbesondere deshalb für die antitumoröse Wirkung von Bedeutung ist, da alle soliden Karzinome immer auch nicht-proliferierende Zellanteile haben.

Flavopiridol vermag im nanomolaren Konzentrationsbereich Apoptose induzieren.; seine proapoptotische Wirkung kann sowohl Kaspase-abhängig als auch Kaspase-unabhängig induziert sein. Eine Apoptosetriggerung erfolgt durch Aktivierung der Kaspasen 2, 3 und 8 oder des AIF (apoptosis inducing factor) durch dessen Freisetzung aus den Mitochondrien (Cimica et al., 2010). Flavopiridol kann, wie Yan Li et al. zeigen, eine zeitabhängige Aktivierung von Kaspase-9, Kaspase-3 und Kaspase-8 bewirken (Li et al., 2007).

Der kaspasevermittelte Weg der Apoptose, welcher über Fas- und TNF- Rezeptoren abläuft (extrinsischer Weg), führt letztendlich zur Aktivierung der Kaspase-8 sowie weiterer Kaspasen. Über den intrinsischen, mitochondrialen Weg erfolgt die Apoptoseinduktion durch einen kaspaseaktivierenden Komplex aus der Kaspase-9 und Apaf-1 (Li et al., 2007).

Als Einzelsubstanz hat Flavopiridol auf beide Zelllinien ähnlichen Effekte in den Proliferationsversuchen, doch bei der Zellzyklusanalyse findet sich ein deutlicher Unterschied: ein fast siebenfach höherer Anteil in <G1 (subG1)-Fraktion zeigt sich bei Inkubation von BG1-Zellen mit 0,5µmolarem Flavopiridol; bei SKOV3 verdoppelt sich dieser Anteil noch nicht einmal. Mitverantwortlich für diese verminderte Apoptose bei SKOV3-Zellen könnte eine Resistenz gegenüber gewissen durch Flavopiridol induzierten Apoptosefaktoren sein.

Flavopiridol führt auch in anderen Studien zu einem Zellzyklusarrest in der subG1-Fraktion (Li et al., 2007). Bei gleichzeitiger oder vorheriger Gabe von TNF vermag Flavopiridol Zellen für TNF-induzierte Apoptose sensibilisieren (Demidenko et al.,

2004).

Apoptose wird durch weitere antiapoptotische Proteine kontrolliert: u.a. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, XIAP und Survivin. Durch Downregulation verringert Flavopiridol die Expression dieser Proteine. Beispielsweise hemmt Flavopiridol die Phosphorylierung von Thr34 auf Survivin und damit die Proteinexpression, was in einer gesteigerten Apoptoseinduktion resultiert (Newcomb, 2004).

4.7 Lonafarnib als Einzelsubstanz

4.7.1 Zellzyklus

Lonafarnib als Einzelsubstanz zeigt im Gegensatz zur Behandlung von SKOV3- bei BG1-Zellen gerade im höheren Konzentrationsbereich zumindest bei Betrachtung der G0/1-Phase sowie der <G1 (subG1 = apoptotische Zellen) einen signifikanten Effekt auf die Proliferation. Es induziert also Apoptose, wenngleich sich kein G2-Arrest nachweisen, wie in anderen Studien beschrieben, nachweisen lässt (Schafer-Hales et al., 2007). Wie in den Annexin-V-Versuchen deutlich wird, induziert es Nekrose- und deutliche Apoptosevorgänge bei BG1-Zellen, bewirkt dies jedoch nicht bei SKOV3-Zellen.

Bislang gibt es kaum Hinweise, über welchen Mechanismus FTI proapoptotisch wirken.

4.7.2 Apoptoseinduktion durch Lonafarnib

Apoptose kann auf zwei Wegen ablaufen: einerseits über eine rezeptorvermittelte Signalkaskade (extrinsischer Weg), andererseits über mitochondriale Signale (intrinsischer Weg). Beide Mechanismen sind an der Aktivierung von Kaspasen beteiligt, welche schließlich über zelluläre Substrate zu Apoptose führen. Der zelloberflächenständige TRAIL- (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) Rezeptor 5 (DR5) zählt zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (Sun et al., 2007). DR5 wird durch Bindung von TRAIL aktiviert bzw. überexprimiert, so daß eine Kaspase-8-vermittelte Aktivierung eine Kaspase-Kaskade auslöst, die zu Apoptose führt (Sun et al., 2007).

FTI hemmen die posttranslationale Farnesylierung von einer Reihe Proteinen, u.a. RAS und RHEB und vermögen die entsprechenden Signalfunktionen zu beeinflussen (Niessner et al., 2010).

Das CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) ist ein im endoplasmatischen Retikulum lokalisierter Transkriptionsfaktor, der an Apoptoseregulationsmechanismen beteiligt ist. CHOP ist direkt an der DR5-Expression beteiligt. Shi-Yong Sun et al. konnten erstmals zeigen, daß FTI, insbesondere Lonafarnib, über eine CHOP-abhängige Hochregulierung der DR5-Expression und eine folgende Kaspase-8-Aktivierung Apoptose induzieren (Sun et al., 2007).

Initial wurde angenommen, Lonafarnib verhindere die Farnesylierung von H-Ras, dessen Verankerung in der Zellmembran und letztendlich die durch H-Ras bedingten Zelltransformationen; dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht bestätigt werden (Schafer-Hales et al., 2007). Es zeigt sich jedoch eine Beeinflussung weiterer Downstreamziele von Ras, wie z.B. von Erk und Akt (Caraglia et al., 2004); vielmehr wird davon ausgegangen, dass die klinische Aktivität von FTI unabhängig vom Ras-Mutationsstatus ist (Marcus et al., 2005).

Wie Niessner et al. in einer Studie von 2010 zeigen konnten hemmte Lonafarnib nicht die Phosphorylierung von ERK oder AKT und beeinflusste nicht RAF-MEF-ERK und PI3K-AKT. Im Gegenzug kam es jedoch zu einer Beeinflussung der mTOR-Signalkette. Ein weiterer Angriffspunkt der FTI scheinen RHEB-Proteine zu sein. RHEB ist eine kleine GTPase und kann zu mTOR-Aktivierung führen, indem es den endogenen Inhibitor FKBP38 antagonisiert. In einigen humanen Karzinomen wird RHEB in hohem Maße expremiert und kann die Apoptose beeinflussen. Lonafarnib hemmt die RHEB-Farnelysierung und die Aktivität, die mTOR-Signalkette und die antiapoptotische Wirkung von RHEB (Niessner et al., 2010).

Geht man von der Vorstellung aus, dass andere farnesylierte Proteine einen oder sogar den Hauptangriffspunkt für FTI darstellen, kommen eben dafür z.B. kleine G-Proteine (z.B. Rho-Proteine) oder zentromer-Binding-Proteine in Betracht (Harousseau, 2007).

Durch Hemmung der Farnesyltransferase wird eine gesteigerte Geranylgeranylation von Proteinen wie Ras (sogenannte alternative Prenylierung) induziert (Peterson et al., 2006).

Die Inhibition der Farnesyltransferase wird in dieser Studie anhand der eingeschränkten elektrophoretischen Mobilität des unfarnesylierten HDJ2 bei den mit Lonafarnib behandelten Zellen deutlich. Dieses Resultat findet sich auch bei Niessner et al: es wird dort

ein von der Konzentration des Lonafarnib abhängiger Effekt auf Melanom-Zelllinien beschrieben. Je höher die Konzentration des Lonafarnib, desto ausgeprägter scheint die Hemmung der Farnesyltransferase sich in einer veränderten HDJ-2-Migration niederzuschlagen (Niessner et al., 2011).

Taylor et al. kommen zu dem Ergebnis, daß Lonafarnib die wachstumshemmenden Eigenschaften von Paclitaxel auf Ovarialkarzinomzellen in vitro und auf Ovarialkarzinom-Xenografts in vivo verstärkt. Als geeignetere Methode zur Erfassung der antiproliferativen Effekte wird hier jedoch die Messung der FTase-Enzym-Aktivitäten und nicht der HDJ-2-Shifts empfohlen, da eine Behandlung mit Paclitaxel selber zu veränderten HDJ-2-Shifts führe, wohingegen die FTase-Enzym-Aktivität sich unverändert zeige (Taylor et al., 2008).

Jiang et al zeigten, dass FTIs den PI3K/Akt-vermittelten Wachstumsfaktor und den Weg, der von Adhäsion abhängig ist, inhibieren, sowie zur Apoptoseinduktion bei den Zellen führen, bei denen eine Akt-Überexpression vorliegt (Lee et al., 2004).

Als weiterer möglicher Angriffspunkt der FTIs gilt das G-Protein rhoB – eine blockierte Farnesylierung dieses Proteins führt vermutlich zu einer Akkumulation an geranylierten rhoB, welches selbst antiproliferativ wirksam zu sein scheint (Adjei et al., 2001).

Lonafarnib in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika

Trotz dieser vielversprechenden präklinischen Ansätze konnten Meier et al. 2012 in einer prospektiven randomisierten Phase II Studie zeigen, daß bei primär fortgeschrittenem Ovarialkarzinom eine zusätzliche Gabe von Lonafarnib zu den etablierten Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel bei vergleichbaren hämatologischen Nebenwirkungen zu einer signifikant höheren Rate an Diarrhoen führt. Diese Toxizität bedingt eine erhöhte Drop-Out-Rate, welche sich ihrerseits möglicherweise in einer Verkürzung des progressionsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit niederschlägt.

Dies widerspricht Ergebnissen aus Phase-I- und II-Studien, in denen die Wirksamkeit der kombinierten Gabe von Taxanen und Lonafarnib in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen werden konnte. (Meier et al., 2012)

4.8 Zelllinien

4.8.1 SKOV3

SKOV3-Zellen wachsen adhären und sind östrogenrezeptorpositiv, aber östrogeninsensitiv.

Bei allen Versuchen zeigten sich Zellen dieser Linie weniger sensibel sowohl auf die Einzelgabe als auch auf kombinierte Applikation der Substanzen. In den Proliferationsassays ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine mögliche synergistische Wirkung der kombinierten Gabe von Lonafarnib und Flavopiridol.

Inwiefern der Östrogenrezeptorstatus für die antiproliferative Therapie mit Lonafarnib und Flavopiridol von Bedeutung ist sollte Ziel weiterer Studien sein. Ein Zusammenhang zwischen dem Rezeptorstatus ist durchaus denkbar, denn BG1-Zellen, welche wie beschrieben wesentlich ausgeprägter auf die antiproliferative Therapie ansprechen, sind östrogensensitiv. SKOV3-Zellen sind eine ER α >ER β -positive Zelllinie, aber östrogen-insensitiv (Yap et al., 2009).

In Betracht zu ziehen ist auch eine (partielle) Resistenz von SKOV3-Zellen gegenüber den hier untersuchten Medikamenten, was eine genaue Untersuchung der dabei ursächlichen Mechanismen fordert. Damit verbunden wäre jedoch auch eine klinisch bedeutsame Anwendungslimitierung bzw. eine entsprechende Selektion und Differenzierung des Karzinomzelltypus vor einer Therapie mit den Substanzen.

4.8.2 BG1

BG1-Zellen sind im Gegensatz zu SKOV3-Zellen sowohl östrogenrezeptorpositiv als auch östrogensensitiv. Auch BG1-Zellen wachsen adhären.

Der Östrogenrezeptorstatus (ER-Status) spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und somit auch bei der Therapie von Ovarialkarzinomen (Schlumbrecht et al., 2011). Auf antiöstrogene Behandlung sprechen Ovarialkarzinome in der Regel nicht bzw. nur schlecht an (Schlumbrecht et al., 2011). Ein ER α -positiver Rezeptorstatus ist offensichtlich als prognostisch ungünstiger Faktor zu werten (Schlumbrecht et al., 2011).

4.9 Interaktionen zwischen Flavopiridol und Lonafarnib

Die Kombination verschiedener Substanzen bei der Therapie von malignen Prozessen

beruht auf der Vorstellung, dass es sich bei der Karzinogenese um ein heterogenes und auf unterschiedlichen Ebenen ablaufendes Geschehen handelt (Dy et al., 2005).

Flavopiridol und Lonafarnib greifen als Einzelsubstanzen auf verschiedenen Ebenen in die Proliferation von Zellen ein. Für eine gesteigerte Apoptoseinduktion kann zum Beispiel eine erhöhte antiapoptotische Aktivität verantwortlich sein (Lee et al., 2004). Die antiproliferative Wirkung der gemeinsamen Gabe beider Medikamente könnte also einerseits durch reine Addition der Einzeleffekte von Lonafarnib und Flavopiridol bedingt sein.

Es gibt jedoch auch Hinweise, dass zumindest einige der antiproliferativen Eigenschaften der beiden Substanzen auf ähnlichen oder sogar gleichen Mechanismen beruhen und dies so zu einer Effektpotenzierung führt: Flavopiridol bewirkt u.a. eine Aktivierung der Kaspase-8; Lonafarnib führt DR5-vermittelt ebenso über die Kaspase-8 zu Induktion der Apoptosekaskade. Denkbar ist also durchaus, dass der kombinierte Einsatz der Substanzen eben über solch gemeinsame Wege zu einer verstärkten Apoptoseinduktion, wie eben in dieser Studie gezeigt, führt.

Diese Studie zeigt, dass synergistische Effekte zwischen den beiden Substanzen bei Behandlung humaner Ovarialkarzinomzellen bestehen; jedoch bedarf es weiterer experimenteller Untersuchungen, um für eine in-vivo-Therapie in Betracht kommende Karzinome genauer zu differenzieren. Die hier gefundenen synergistischen Effekte scheinen unter anderem von der Zelllinie abhängig zu sein; zwar finden sich bei SKOV3-Zellen erhöhte Apoptose- und Nekroserate sowie eine deutliche Abnahme vitaler Zellen, jedoch lässt sich kein Synergismus wie bei BG1-Zellen nachweisen.

Es bedarf also auch einer weiterführenden Typisierung der verschiedenen Karzinomzellarten, welche in ihrer Unterschiedlichkeit auch für die Differenz der synergistischen Effekte auf beide Zelllinien eine Rolle spielen könnte.

Ebenso könnte auch der Einfluß von weiteren Faktoren wie z.B. IL-6, welches im Serum von Ovarialkarzinompatienten erhöht ist, eine Rolle in der Chemosensitivität gegenüber Flavopiridol und Lonafarnib spielen; die Modulation von IL-6-Expression ist derzeit Gegenstand der Forschung (Wang et al., 2010).

Letztendlich benötigt es weitere Studien, um die genauen Mechanismen von synergistischen Effekten zwischen Lonafarnib und Flavopiridol zu untersuchen; wobei auch andere Konzentrationsbereiche sowie die Wirksamkeit der Substanzkombinationen auf unterschiedliche Karzinome evaluiert werden sollten. Desweiteren sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass synergistische Effekte einer veränderten zeitlichen Komponente unterliegen: eine zeitlich versetzte Applikation der Substanzen (also eine Vorbehandlung mit einer Substanz und eine sich anschließende Inkubation mit der Kombination beider Medikamente) könnte andere bzw. weitere Effekte zu Tage bringen.

Zusammenfassung

Einer der am häufigsten zum Tode führenden malignen Tumore der Frau ist das Ovarialkarzinom. Bei der Ersttherapie ist immer noch die radikale chirurgische Resektion maßgeblich; gefolgt von einer Platin-haltigen Kombinationschemotherapie. Trotz guter initialer Therapieerfolge ist die Rezidivrate sehr hoch. Auch wegen einer Chemoresistenz besteht die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen wie zum Beispiel zielgerichteter Therapeutika. Medikamente der targeted therapy wirken selektiv zumeist über entweder eine Hemmung von Rezeptoren und Liganden oder Molekülen in der Signaltransduktion.

Lonafarnib hemmt die Farnesylierung von H-Ras und somit eine Verankerung in der Zellmembran. Daneben scheinen weitere Angriffspunkte andere farnesylierte Proteine wie kleine G-Proteine, RHEB oder zentromer-Binding-Proteine zu sein. Lonafarnib kann außerdem über eine CHOP-abhängige Hochregulierung die DR5-Expression und eine folgende Kaspase-8-Aktivierung Apoptose induzieren.

Es wirkt als oral verfügbarer Farnesyltransferaseinhibitor antitumorös in Ras-abhängigen und Ras-unabhängigen Neoplasien. Bei soliden Tumoren mit einer hohen Ras-Mutations-Inzidenz zeigt sich Lonafarnib bislang wenig effizient; Ursache dafür könnte die alternative Prenylierung sein sowie eben andere Hauptangriffspunkte als Ras sein. In-vitro-Behandlung mit Lonafarnib führt zu einem dosisabhängigen G2-Arrest von Glioblastomzellen, Lungenkarzinom- und Fibrosarkomzellen.

Flavopiridol blockiert die ATP-Bindungsstelle von zyklinabhängigen Kinasen und führt in vitro zu einem G1 – bzw. G2-Zellzyklusarrest; es kann auch eine von p53-unabhängige Apoptose induzieren. Flavopiridol hemmt in diversen Modellen die TNF-vermittelte NF- κ B-Aktivierung sowie die AP-1-Aktivierung, supprimiert die Expression einer Vielzahl antiapoptotischer Proteine und die TNF-induzierte Akt-Aktivierung. Die von Lonafarnib und Flavopiridol beeinflussten Regulationsmechanismen sind relevant in Ovarialkarzinomzellen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese geprüft, ob Flavopiridol und Lonafarnib synergistisch die Proliferation von humanen Ovarialkarzinomzellen in vitro hemmen. Endpunkte sind Proliferation, Zellzyklusverteilung, Induktion von Apoptose und Nekrose. Die humanen Ovarialkarzinomzelllinien SKOV3- und BG1 wurden

verwendet. Als Methoden wurden zunächst Proliferationsassays mit photometrischer Analyse durchgeführt, anschließend erfolgte ein Annexin-V-Nachweis zur Differenzierung von vitalen, nekrotischen und apoptotischen der mit den Substanzen behandelten Zellen. Die Zellzyklusanalyse wurde mittels durchflußzytometrischer Messung durchgeführt. Für das Western Blotting wurden die Antikörper HDJ-2, HIF1 sowie anti- β -Aktin als housekeeping-Gene verwendet.

Die Analyse der Ergebnisse der Proliferationsassays zeigte keinen Synergismus bei Kombination von Flavopiridol und Lonafarnib zur Behandlung von SKOV3-Zellen, jedoch bei BG-1 Zellen. Mithilfe der Annexin-V-Methode ließ sich dieses Ergebnis bestätigen. Bei SKOV-3-Zellen zeigten sich keine synergistischen Effekte; bei BG1-Zellen ergab sich nach kombinierter Medikamentengabe ein Anstieg der Nekroserate und eine Reduktion der vitalen Zellen. Mittels Flowzytometrie ließ sich bei beiden Zelllinien eine deutliche Veränderung des Zellzyklus durch Gabe der Substanzen verzeichnen; die Effekte scheinen jedoch vielmehr als Einzeleffekt von Flavopiridol zu werten zu sein. Bei BG1-Zellen fand sich ein gering gesteigerter Zellzyklusarrest in der subG1-Fraktion bei kombinierter Gabe von Flavopiridol und Lonafarnib in ausgewählten Konzentrationen. Die Western Blots zeigten eine Hochregulierung von HDJ2 bei Einzelgabe von Lonafarnib und in Kombination mit Flavopiridol.

In dem gewählten Modell humaner Ovarialkarzinomzellen *in vitro* sind relevante Effekte von Flavopiridol und Lonafarnib nachweisbar, bei BG-1 Zellen konnten Hinweise auf einen Synergismus von Flavopiridol und Lonafarnib gefunden werden. Diese Untersuchung unterstützt Hinweise in der Literatur auf eine Aktivität dieser Substanzen, weist erstmalig auf einen Synergismus hin und unterstreicht zugleich die unterschiedliche Sensibilität von humanen Ovarialkarzinomzelllinien auf targeted therapeutics *in vitro*.

Abstract

In women ovarian cancer is one of the most frequently cancers leading to death. For the primary therapy a radical surgical resection still remains most relevant; followed by a platin-based combined chemotherapy. Despite initial therapeutic success the rate of relapse stays high. Also because of chemoresistency there is a need for e.g. targeted therapeutics. Drugs of the so-called targeted therapy operate selectively by either inhibiting receptors and ligands or molecules of the signaltransduction.

Lonafarnib inhibits the farnesylation of H-Ras and the attachment of Ras to the cell membrane. Further points of attack seams to be other farnesylated proteins like small G-proteins, RHEB and centromer-binding-proteins. Lonafarnib is also able to induce apoptosis via a CHOP-dependent upregulation of the DR-5-expression and a following caspase-8-activation.

Lonafarnib works as an orally available farnesyltransferase inhibitor against tumor growth in ras-dependent and ras-independent neoplasia. Lonafarnib seems to be less efficient in solid tumors with a high ras-mutation-incidence; one reason for this could be the alternative prenylation and a different point of attack than ras. In-vitro-treatment with Lonafarnib leads to a dose-dependent G2-arrest of glioblastomacells, lungcancer- and fibrosarcomacells.

Flavopiriol blocks the ATP-binding site of cyclin-dependent cinases and leads to a G1- respectively G2-cellcycle arrest in vitro. Furthermore it can induce p53-indepent apoptosis. Diverse models show that Flavopiriol inhibitis the TNF-mediated NF- κ B-activation and the AP-1-activation, suppresses the expression of a multiplicity of antiapoptotic proteins and the TNF-induced AKT-activation.

The mechanisms influenced by Flaoprirol and Lonafarnib are relevant on ovarian cancer cells.

The aim of this study is to investigate potential synergistic effects of Flavopiridol and Lonfarnib inhibiting the proliferation of human ovarian cancer cells in vitro.

End points are proliferation, cell cycle allocation, induction of apoptosis and necrosis.

SKOV-3 and BG1 were used as ovarian cancer cell lines. The following methods were applied: at first proliferation assays with photometric analysis were conducted, then an annexin-V-detection was applied for differentiation of the treated cells in vital, necrotic

and apoptotic groups. Cellcycle-analysis was applied via flow cytometry. Antibodies used for the western blotting as housekeeping genes were HDJ-2, HIF1 and anti- β -Aktin.

Analysing the results of the proliferation assays synergistic effects when combining Flavopiridol and Lonafarnib could not be shown in SKOV3-cells but in BG1-cells. This result was confirmed in the annexin-V-assay. No synergetic effects could be observed in SKOV-3-cells; in BG1-cells combining both drugs led to a rise of necrosis and a reduction of vital cells. Via flow cytometry in both cell lines a clear transformation of cell cycle induced by treatment with the drugs could be demonstrated, but these effects seem to be rather a single effect of flavopiridol. The combined treatment of Flavopiridol and Lonafarnib in BG1-cells showed a slightly increased cell cycle arrest in the subG1-fraction in selected concentrations. The western blots demonstrated an upregulation of HDJ2 by single use of Lonafarnib and combination with Flavopiridol.

Relevant effects of Flavopiridol and Lonafarnib are detectable in the selected model of human ovarian cancer cells in vitro; in BG1-cells evidence for a synergism of Flavopiridol and Lonafarnib was found.

This study supports evidence in literature pointing to a certain activity of these drugs and at the same time emphasizes the different sensibility of human ovarian cancer cell lines to targeted therapeutics in vitro.

Literaturverzeichnis

- Adjei A.A., Davis J.N., Bruzek L.M., Erlichman C., Kaufmann S.H.: Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines; *Clin Cancer Res.* 2001 May;7(5):1438-45
- Adjei A.A., Davis J.N., Erlichman C., Svingen P.A., Kaufmann S.H.: Comparison of potential markers of farnesyltransferase inhibition; *Clin Cancer Res.* 2000 Jun;6(6):2318-25.
- Aklilu M., Kindler H.L., Donehower R.C., Mani S., Vokes E.E.: Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer; *Ann Oncol.* 2003 Aug;14(8):1270-3
- Bardin A., Hoffmann P., Boulle N., Katsaros D., Vignon F., Pujol P., Lazenec G.: Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis; *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5861-9.
- Basso A.D., Mirza A., Liu G., Long B.J., Bishop W.R., Kirschmeier P.: The Farnesyl Transferase Inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb Farnesylation and mTOR Signaling; *J Biol Chem.* 2005 Sep 2;280(35):31101-8. Epub 2005 Jul 8.
- Behbakht K., Qamar L., Aldridge C.S., Coletta R.D., Davidson S.A., Thorburn A., Ford H.L.: Six1 Overexpression in Ovarian Carcinoma Causes Resistance to TRAIL-Mediated Apoptosis and Is Associated with Poor Survival; *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3036-42.
- Berek J., Taylor P., McGuire W., Smith L.M., Schultes B., Nicodemus C.F.: Oregovomab Maintenance Monoimmunotherapy Does Not Improve Outcomes in Advanced Ovarian Cancer; *Journal of Clinical Oncology* 2009, January 20, vol. 27no. 3: 418-425
- Bible K.C., Lensing J.L., Nelson S.A., Lee Y.K., Reid J.M., Ames M.M., Isham C.R., Piens J., Rubin S.L., Rubin J., Kaufmann S.H., Atherton P.J., Sloan J.A., Daiss M.K., Adjei A.A., Erlichman C.: Phase I trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points; *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5935-41.
- Bible K.C., Peethambaram P.P., Oberg A.L., Maples W., Groteluschen D.L., Boente M., Burton J.K., Gomez Dahl L.C., Tibodeau J.D., Isham C.R., Maguire J.L., Shridhar V., Kukla A.K., Voll K.J., Mauer M.J., Colevas A.D., Wright J., Doyle L.A., Erlichman C.; the Mayo Phase 2 Consortium (P2C) and North Central Cancer Treatment Group (NCCTG): A Phase 2 Trial of Flavopiridol (Alvocidib) and Cisplatin in Platin-Resistant Ovarian and Primary Peritoneal Carcinoma: MC0261; *Gynecologic Oncology*, available online 1 June 2012
- Burger R.A., Brady M.F., Bookman M.A., Fleming G.F., Monk B.J., Huang H., Mannel R.S., Homesley H.D., Fowler J., Greer B.E., Boente M., Birrer M.J., Liang S.X.: Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer; *N Engl J Med* 2011;365:2473-83.
- Caraglia M., D'Alessandro A.M., Marra M., Giuberti G., Vitale G., Viscomi C., Colao A., Prete S.D., Tagliaferri P., Tassone P., Budillon A., Venuta S., Abbruzzese A.: The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate; *Oncogene.* 2004 Sep 9;23(41):6900-13.
- Cimica V., Smith M.E., Zhang Z., Mathur D., Mani S., Kalpana G.V.: Potent inhibition of rhabdoid tumor cells by combination of flavopiridol and 4OH-tamoxifen; *BMC Cancer.* 2010; 10: 634, Published online 2010 November 19. doi: 10.1186/1471-2407-10-634
- Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V.: Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor; *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3653-60.

Du Bois A., Pfisterer J.: Future Options for first-line therapy options of advanced ovarian cancer; *Int J Gynecol Cancer*. 2005 May-Jun;15 Suppl 1:42-50.

Dy G.K., Bruzek L.M., Croghan G.A., Mandrekar S., Erlichman C., Peethambaram P., Pitot H.C., Hanson L.J., Reid J.M., Furth A., Cheng S., Martell R.E., Kaufmann S.H., Adjei A.A.: A phase I trial of the novel farnesyl protein transferase inhibitor, BMS-214662, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced cancer; *Clin Cancer Res*. 2005 Mar 1;11(5):1877-83.

Ebenezer D., Sun S.Y., Waller E.K., Chen J., Khuri F.R., Lonial S.: The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT; *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4322-9. Epub 2005 Aug 23.

Fehrmann R.S.N., Li X.-y., van der Zee A.G.J., de Jong S., te Meerman G.J., de Vries E.G.E., Crijns A.P.G.: Profiling Studies in Ovarian Cancer: A Review; *Gynecologic Oncology, The Oncologist*, Vol. 12, No. 8, August 2007, 960-966

Garg A.K., Buchholz T.A., Aggarwal B.B.: Chemosensitization and Radiosensitization of Tumors by Plant Polyphenols, *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* Volume 7, Numbers 11 & 12, 2005

Ghosal A., Chowdhury S.K., Tong W., Hapangama N., Yuan Y., Su A.D., Zbaida S.: Identification of human liver cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of lonafarnib (Sarasar); *Drug Metab Dispos*. 2006 Apr;34(4):628-35. Epub 2006 Jan 27

Glass T.L., Liu T.J., Yung W.K.: Inhibition of cell growth in human glioblastoma cell lines by farnesyltransferase inhibitor SCH66336; *Neuro Oncol*. 2000 Jul;2(3):151-8.

Grant S., Dent P.: Gene profiling and the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol: what's in a name?; *Mol Cancer Ther*. 2004 Jul;3(7):861-72.

Green M.R.: Targeting Targeted Therapy; *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2191-3. Epub 2004 Apr 29.

Harousseau J.L.: Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies; *Blood Rev*. 2007 Jul;21(4):173-82. Epub 2007 Feb 1

<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/>; „Was ist Durchflusszytometrie?“, Homepage der Universität Mainz, FacsLab: FACS und Array Core Facility,

http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_annexin.htm, Dipl.MTA Barbara Kozaas: Apoptosedetektion mittels Annexin V – Markierung; <mailto:100736.427@compuserve.com>

Innocenti F., Stadler W.M., Iyer L., Ramirez J., Vokes E.E., Ratain M.J.: Flavopiridol Metabolism in Cancer Patients Is Associated with the Occurrence of Diarrhea; *Clinical Cancer Research* September 2000 6; 3400

Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe: Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren; Überarbeitete Fassung vom 01.05.07, ©: Dt. Krebsgesellschaft / Dt. Ges. f. Gynäkologie und Geburtshilfe

Jaschke B., Milz S., Vogeser M., Michaelis C., Vorpahl M., Schömig A., Kastrati A., Wessely R.: Local cyclin-dependent kinase inhibition by flavopiridol inhibits coronary artery smooth muscle cell proliferation and migration: Implications for the applicability on drug-eluting stents to prevent neointima formation following vascular injury; *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1285-7. Epub 2004 Jun 4.

Karp J.E., Garrett-Mayer E.L., Estey E.H., Rudek M.A., Smith B.D., Greer J.M., Drye D.M., Mackey K., Dorcy K.S., Gore S.D., Levis M.J., McDevitt M.A., Carraway H.E., Pratz K.W., Gladstone D.E., Showell M.M., Othus M., Doyle L.A., Wright J.J., Pagel J.M.: Randomized phase II study of two schedules of flavopiridol given as timed sequential therapy with cytosine arabinoside and mitoxantrone for adults with newly diagnosed, poor-risk acute myelogenous leukemia; Published online before print June 24, 2012, doi:10.3324/haematol.2012.062539, haematol June 24, 2012haematol.2012.062539

Kim J.C., Saha D., Cao Q., Choy H.: Enhancement of radiation effects by combined docetaxel and flavopiridol treatment in lung cancer cells; *Radiotherapy and Oncology*, Volume 71, Issue 2, 1 May 2004, Pages 213–221

Koza B.(Dipl.MTA): Apoptosedetektion mittels Annexin V – Markierung; mailto:100736.427@compuserve.comhttp://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_annexin.htm

Kryštof V., Baumli S., Fürst R.: Perspective of Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a Drug Target; *Current Pharmaceutical Design*, 2012 July; 18(20): 2883–2890.

Lee H.Y., Moon H., Chun K.H., Chang Y.S., Hassan K., Ji L., Lotan R., Khuri F.R., Hong W.K.: Effects of insulin-like growth factor binding protein-3 and farnesyltransferase inhibitor SCH66336 on Akt expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells; *J Natl Cancer Inst.* 2004 Oct 20;96(20):1536-48.

Li Y., Tanaka K., Li X., Okada T., Nakamura T., Takasaki M., Yamamoto S., Oda Y., Tsuneyoshi M., Iwamoto Y.: Cyclin-dependent kinase inhibitor, flavopiridol, induces apoptosis and inhibits tumor growth in drug-resistant osteosarcoma and Ewing's family tumor cells; *Int J Cancer.* 2007 Sep 15;121(6):1212-8.

Li Y., Bhuiyan M., Alhasan S., Senderowicz A.M., Sarkar F.H.: Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in breast cancer cells by flavopiridol; *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):223-9.

Lü X., Burgan W.E., Cerra M.A., Chuang E.Y., Tsai M.H., Tofilon P.J., Camphausen K.: Transcriptional signature of flavopiridol-induced tumor cell death; *Mol Cancer Ther.* 2004 Jul;3(7):861-72.

Luke J.J., D'Adamo D.R., Dickson M.A., Keohan M.L., Carvajal R.D., Maki R.G., de Stanchina E., Musi E., Singer S., Schwartz G.K.: The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and phase I clinical trial; *Clinical Cancer Research*, Published OnlineFirst February 28, 2012; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3203

Mabuchi S., Altomare D.A., Cheung M., Zhang L., Poulikakos P.I., Hensley H.H., Schilder R.J., Ozols R.F., Testa J.R.: RAD001 Inhibits Human Ovarian Cancer Cell Proliferation, Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis, and Prolongs Survival in an Ovarian Cancer Model; *Clinical Cancer Research* 2007 July 15; 13 (14), 4261-4270 [6, 12]

Marcus A.I., Zhou J., O'Brate A., Hamel E., Wong J., Nivens M., El-Naggar A., Yao T.P., Khuri F.R., Giannakakou P.: The synergistic combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and paclitaxel enhances tubulin acetylation and requires a functional tubulin deacetylase; *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3883-93

Mayer F., Mueller S., Malenke E., Kuczyk M., Hartmann J.T., Bokemeyer C.: Induction of apoptosis by flavopiridol unrelated to cell cycle arrest in germ cell tumour derived cell lines; *Invest New Drugs.* 2005 Jun;23(3):205-11

Meier W., du Bois A., Rau J., Gropp-Meier M., Baumann K., Huober J., Wollschlaeger K., Kreienberg R., Canzler U., Schmalfeldt B., Wimberger P., Richter B., Schröder W., Belau A., Stähle A., Burges A., Sehouli J.: Randomized phase II trial of carboplatin and paclitaxel with or without lonafarnib in first-line treatment of epithelial ovarian cancer stage IIB–IV; *Gynecologic Oncology* 126 (2012, April 30); 236–

Mitsch A.: "Struktur-Wirkungs-Beziehungen thiolefreier Farnesyltransferase-Inhibitoren: 5-Arylacetylaminobenzophenone" ("Structure-activity relationship of non-thiol farnesyltransferase inhibitors: 5-arylacetylaminobenzophenones"); URL: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2003/0482/>; URN: urn:nbn:de:hebis:04-z2003-04827; Erscheinungsjahr: 2003

Nahta R., Iglehart J.D., Kempkes B., Schmidt E.V.: Rate-limiting effects of Cyclin D1 in transformation by ErbB2 predicts synergy between herceptin and flavopiridol; *Cancer Res.* 2002 Apr 15;62(8):2267-71.

Nahta R., Trent S., Yang C., Schmidt E.V.: Epidermal growth factor receptor expression is a candidate target of the synergistic combination of trastuzumab and flavopiridol in breast cancer; *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3626-31

Newcomb E.W.: Flavopiridol: pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity; *Anticancer Drugs.* 2004 Jun;15(5):411-9

Niessner H., Beck D., Sinnberg T., Lasithiotakis K., Maczey E., Gogel J., Venturelli S., Berger A., Mauthe M., Toulany M., Flaherty K., Schaller M., Schadendorf D., Proikas-Cezanne T., Schitteck B., Garbe C., Kulms D., Meier F.: The Farnesyl Transferase Inhibitor Lonafarnib Inhibits mTOR Signaling and Enforces Sorafenib-Induced Apoptosis in Melanoma Cells; *Journal of Investigative Dermatology* (2011) 131, 468–479; doi:10.1038/jid.2010.297; published online 14 October 2010

Ohta T., Ohmichi M., Hayasaka T., Mabuchi S., Saitoh M., Kawagoe J., Takahashi K., Igarashi H., Du B, Doshida M., Mirei I.G., Motoyama T., Tasaka K., Kurachi H.: Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Increases Efficacy of Cisplatin in in Vivo Ovarian Cancer Models", *Endocrinology* April 1, 2006 vol. 147 no. 4 1761-1769

O'Meara S.J., Kinsella B.T.: The effect of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 on isoprenylation and signalling by the prostacyclin receptor; *Biochem J.* 2005 Feb 15;386(Pt 1):177-89.

Omerovic J., Hammond D.E., Clague M.J., Prior I.A.: Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines; *Oncogene.* 2008 Apr 24;27(19):2754-62. Epub 2007 Nov 12.

Ozols R.F.: Treatment goals on ovarian cancer; *International Journal of Gynecological Cancer*, Volume 15, Supplement 1, May 2005 , 3-11

Perren T.J., Swart A.M., Pfisterer J., Ledermann J.A., Pujade-Lauraine E., Kristensen G., Carey M.S., Beale P., Cervantes A., Kurzeder C., du Bois A., Shouli J., Kimmig R., Stähle A., Collinson F., Essapen S., Gourley C., Lortholary A., Selle F., Mirza M.R., Leminen A., Plante M., Stark D., Qian W., Parmar M.K.B., Oza A.M.: A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer; *N Engl J Med* 2011; 365:2484-2496 December 29, 2011 DOI: 10.1056/NEJMoa1103799

Pérez-Roger I., Ivorra C., Diez A., Cortés M.J., Poch E., Sanz-González S.M., Andrés V.: Inhibition of cellular proliferation by drug targeting of cyclin-dependent kinases; *Curr Pharm Biotechnol.* 2000 Jul;1(1):107-16.

Peterson Y.K., Kelly P., Weinbaum C.A., Casey P.J.: A novel protein geranylgeranyltransferase-I inhibitor with high potency, selectivity, and cellular activity; *J Biol Chem.* 2006 May 5;281(18):12445-50. Epub 2006 Mar 3

Pfisterer J., Weber B., Reuss A., Kimmig R., du Bois A., Wagner U., Bourgeois H., Meier W., Costa S., Blohmer J.U., Lortholary A., Olbricht S., Stähle A., Jackisch C., Hardy-Bessard A.C., Möbus V., Quaaas J., Richter B., Schröder W., Geay J.F., Lück H.J., Kuhn W., Meden H., Nitz U., Pujade-Lauraine E.; AGO-OVAR; GINECO: Randomized phase III trial of topotecan following carboplatin and paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a gynecologic cancer intergroup trial of the AGO-OVAR and GINECO; *J Natl Cancer Inst.* 2006 Aug 2;98(15):1036-45

- Rahal R., Amon A.: Mitotic CDKs control the metaphase-anaphase transition and trigger spindle elongation; *Genes Dev.* 2008 Jun 1;22(11):1534-48
- Raju U., Nakata E., Mason K.A., Ang K.K., Milas L.: Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity of ovarian carcinoma cells; *Cancer Res.* 2003 Jun 15;63(12):3263-7
- Ready N.E., Lipton A., Zhu Y., Statkevich P., Frank E., Curtis D., Bukowski R.M.: Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with weekly paclitaxel in patients with solid tumors; *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):576-83
- Saeger H.D., Jauch K.W., Bauer H.: Signaltransduktionswege der Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF)-1 Aktivierung in Pankreaskarzinomzelllinien unter Normoxie und Hypoxie: Kinase-Inhibitoren als Anti-HIF-1 Tumorthherapie beim Pankreaskarzinom; *Chirurgisches Forum 2006, Volume 35, Springer Berlin Heidelberg, 147-9*
- Salzberg M., Thürlimann B., Bonnefois H., Fink D., Rochlitz C., von Moos R., Senn H.: Current Concepts of Treatment Strategies in Advanced or Recurrent Ovarian Cancer; *Oncology* 2005; 68, Vol. 68, No. 4-6, 293-298, (DOI: 10.1159/000086967)
- Schafer-Hales K., Iaconelli J., Snyder J.P., Prussia A., Nettles J.H., El-Naggar A., Khuri F.R., Giannakakou P., Marcus A.I.: Farnesyl transferase inhibitors impair chromosomal maintenance in cell lines and human tumors by compromising CENP-E and CENP-F function; *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr;6(4):1317-28.
- Schlumbrecht M.P., Xie S.S., Shipley G.L., Urbauer D.L., Broaddus R.R.: Molecular Clustering Based on ER α and EIG121 Predicts Survival in High-Grade Serous Carcinoma of the Ovary/Peritoneum; *Mod Pathol.* 2011 March ; 24(3): pages 453–462 [111-113]
- Shah M.A., Smyth E.C., Shibata S., Yong W., Tang L.H., Janjigian Y.Y., Kelsen D.P., Schwartz G.K.: A multicenter random assignment phase II study of irinotecan and flavopiridol versus irinotecan alone for patients with p53 wild-type gastric adenocarcinoma (NCI 8060); *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr e14586)
- Shapiro G.I., Koestner D.A., Matranga C.B., Rollins B.J.: Flavopiridol Induces Cell Cycle Arrest and p53-independent Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines, *Clinical Cancer Research*, October 1999 5; 2925
- Shapiro G.I., Supko J.G., Patterson A., Lynch C., Lucca J., Zaccarola P.F., Muzikansky A., Wright JJ, Lynch TJ Jr, Rollins BJ: A Phase II Trial of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer; *Clinical Cancer Research* June 2001 7; 1590
- Shetty V., Hafner J., Shah P., Nickens Z., Philip R.: Investigation of ovarian cancer associated sialylation changes in N-linked glycopeptides by quantitative proteomics; *Clinical Proteomics* 2012, 9:10 doi:10.1186/1559-0275-9-10
- Stakleff K.S., Sloan T., Blanco D., Marcanthony S., Booth T.D., Bishayee A.: Resveratrol Exerts Differential Effects in Vitro and in Vivo against Ovarian Cancer Cells; *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(4):1333-40
- Sun S.Y., Liu X., Zou W., Yue P., Marcus A.I., Khuri F.R.: 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 Jun 29;282(26):18800-9. Epub 2007 May 9
- Tagliaferri P., Ventura M., Baudi F., Cucinotto I., Arbitrio M. Di Martino MT, Tassone P.: BRCA1/2 genetic background-based therapeutic tailoring of human ovarian cancer: hope or reality?; *J Ovarian Res.*

2009; 2: 14.

Takada Y., Aggarwal B.B.: Flavopiridol Inhibits NF- κ B Activation Induced by Various Carcinogens and Inflammatory Agents through Inhibition of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation ABROGATION OF CYCLIN D1, CYCLOOXYGENASE-2, AND MATRIX METALLOPROTEASE-9; First Published on November 20, 2003, doi:10.1074/jbc.M304546200February 6, 2004 The Journal of Biological Chemistry, 279, 4750-4759

Takada Y., Sethi G., Sung B., Aggarwal B.B.: Flavopiridol Suppresses Tumor Necrosis Factor-Induced Activation of Activator Protein-1, c-Jun N-Terminal Kinase, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), p44/p42 MAPK, and Akt, Inhibits Expression of Antiapoptotic Gene Products, and Enhances Apoptosis through Cytochrome c Release and Caspase Activation in Human Myeloid Cells”, Published online before print February 20, 2008, doi:10.1124/mol.107.041350Molecular PharmacologyMay 2008 vol. 73 no. 51549-1557

Taylor S.A., Marrinan C.H., Liu G., Nale L., Bishop W.R., Kirschmeier P., Liu M., Long B.J.: 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 Apr;109(1):97-106. Epub 2008 Jan 31

Tallarida R.J.: The interaction index: a measure of drug synergism; Pain 98 (2002): 163-168

Tallarida R.J., Stone D.J. Jr., McCary J.D., Raffa R.B.: Response surface analysis of synergism between morphine and clonidine; J Pharmacol Exp Ther. 1999 Apr;289(1):8-13

Wagner U., du Bois A., Pfisterer J., Huober J., Loibl S., Lück H.-J., Sehouli J., Gropp M., Stähle A., Schmalfeldt B., Meier W., Jackisch C.: Gefitinib in combination with tamoxifen in patients with ovariancancer refractory or resistant to platinum–taxane based therapy—A phase II trial of the AGO OvarianCancer Study Group (AGO-OVAR 2.6); Gynecologic Oncology, Volume 105, Issue 1, April 2007: 132–137

Wang K., Hampson P., Hazeldine J., Krystof V., Strnad M., Pechan P., Janet M.: Cyclin-Dependent Kinase 9 Activity Regulates Neutrophil Spontaneous Apoptosis; PLoS One. 2012; 7(1): e30128, Published online 2012 January 19. doi: 10.1371/journal.pone.0030128

Wang Y., Qu Y., Niu Y.L., Wu J., Zhu Y.Q., Sun W.J., Li L. Z.: Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells; Cancer Letters, Volume 295, Issue 1, 1 September 2010: 110–123

Yap O.W.S., Bhat G., Liu L., Tollefsbol T.G.O.: Epigenetic Modifications of the Estrogen Receptor β Gene in Epithelial Ovarian Cancer Cells; Anticancer Res. 2009 January ; 29(1): pages 139–144 [110]

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Becker, Bertalanffy, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Eilers, Effendy, Eisele, Feuser, Geks, Gerdes, Geus, Göke, Görg C., Görg K., Gotzen, Grau, Gress, Griss, Grzeschik, Happle, Hartmann, Hasilik, Herzum, Hofmann, Hoyer, Jackowski-Dohrmann, Jungclas, Kern, Kill, Klenk, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lüers, Mandrek, Mann, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Niessing, Oertel, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Schwarz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Sommer, Steiniger, Stiletto, Studer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wiegandt, Wilhelm, Wulf, Zemlin

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Baumann, für sein Engagement und seine Geduld, sowie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wagner, ohne die diese Arbeit nicht hätte realisiert werden können.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Reinartz, Frau Plaum und Herrn Allmeroth für ihre Unterstützung und ihr immer offenes Ohr in vielen technischen und wissenschaftlichen Fragen.

Bedanken möchte ich mich bei meiner gesamten Familie - für Eure Unterstützung nicht nur während des Studiums, sondern auch in manch anderen schwierigen Augenblicken. Danke, daß Ihr immer für mich da seid. Ohne Euch hätte ich vieles nicht geschafft.

Danke Christian: für Deine Geduld mit mir, danke, daß Du meine Launen und meine Ungeduld erträgst, danke für die neue Festplatte, die auch im Rahmen dieser Promotion notwendig wurde...

Danke für Deine Liebe und - danke für unsere Kinder, die den Aufwand dieser Arbeit relativieren und nichtig erscheinen lassen.

Danke Frieda, danke Oskar - ihr seid die Sonne in meinem Leben.