

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
Direktor Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Apoptose-Induktion
ausgelöst durch Farnesyltransferase-Inhibitoren
als Therapieoption für gastrointestinale Tumore

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Louise Angela Schubert
Geboren in Kreuztal

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Alexander Gerbes
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Lars Lindner
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Enrico de Toni Dr. med. Sören Eichhorst
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.03.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Verwendete Abkürzungen und Einheiten	4
1. Einleitung	6
1.1. Brisanz der Therapie gastrointestinaler Tumore	6
1.2. Die Apoptose	7
1.2.1. Biologische Bedeutung der Apoptose	7
1.2.2. Apoptose als Auslöser pathogenetischer Prozesse	7
1.2.3. Der morphologische Ablauf der Apoptose	8
1.2.4. Das genetische Modell der Apoptose mit seinen Caspasen	9
1.3. Der CD95-Signalweg	10
1.3.1. Die Todesrezeptoren und ihre Liganden	10
1.3.2. Die Signaltransduktion	11
1.3.3. Der Signalkomplex	12
1.3.4. Formen des CD95-Signalwegs	13
1.3.4.1. Der extrinsische CD95-Signalweg	13
1.3.4.2. Der intrinsische CD95-Signalweg	14
1.4. Folgerungen für Pathomechanismen	16
1.4.1. Krebsentstehung durch Mutagene	16
1.4.2. Das Ras-Gen	17
1.4.2.1. Mutationsfolgen des Ras-Proteins	18
1.4.2.2. Downstream-Mechanismus von Ras	19
1.4.3. Therapeutischer Ansatz durch Farnesyltransferase-Inhibitoren	20
1.5. In unseren Versuchen verwendete Farnesyltransferase-Inhibitoren	22
1.5.1. BMS-214662	22
1.5.2. SCH66336	24
1.6. Zielsetzung	26
2. Material und Methodik	27
2.1. Material	27
2.1.1. Zellkulturmaterialien	27
2.1.2. Zelllinien	27

2.1.3.	Medikamente und deren Vorbereitung	27
2.1.4.	Chemikalien	28
2.1.5.	Antikörper	29
2.1.6.	Geräte und sonstige Materialien	30
2.1.7.	Puffer und Lösungen	31
2.2.	Methodik	34
2.2.1.	Zellkultur	34
2.2.1.1.	Kultivieren der Zellen	34
2.2.1.2.	Einfrieren und Auftauen der Zellen	34
2.2.1.3.	Zellzahlbestimmung	35
2.2.2.	Apoptose-Assay mittels Durchflußzytometer	35
2.2.2.1.	Apoptose Induktionsmethoden	36
2.2.2.2.	Propidiumiodid Färbung	37
2.2.2.3.	Durchflußzytometrie	38
2.2.2.4.	Statistische Auswertung	38
2.2.3.	Western Blot mit anschließendem Immunoblotting	39
2.2.3.1.	Stimulation der Zellen	39
2.2.3.2.	Isolierung der Proteine	40
2.2.3.3.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976) ...	40
2.2.3.4.	Das Gießen der Gele	40
2.2.3.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.2.3.6.	Western Blot	42
2.2.3.7.	Blocken der Membran und anschließendem Immunoblotting ...	42
2.2.3.8.	Detektion der membrangebundenen Proteine	43
2.2.3.9.	Stripping	44
2.2.4.	Die Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	44
2.2.4.1.	Zellbehandlung	44
2.2.4.2.	Zellgewinnung	45
2.2.4.3.	RNA-Isolation	45
2.2.4.4.	RNA-Quantifizierung	46
2.2.4.5.	RT-Reverse Transkriptase	46
2.2.4.6.	RT-PCR	47
2.2.4.7.	Agarose-Gel-Elektrophorese	48

3.	Ergebnisse	49
3.1.	Ft-Is induzieren Apoptose in Hepatom- bzw. Kolonkarzinom-Zellen	49
3.1.1	Die Induktion der Apoptose durch Ft-Is ist dosisabhängig	50
3.1.2.	Ft-Is beeinflussen den CD95-Signalweg	51
3.1.3.	Eine geringe Zell-Sensibilisierung durch BMS-214662 ist nachweisbar ...	54
3.1.4.	BMS-214662 ruft eine Aktivierung der Caspase 3 hervor	56
3.1.5.	Die Inkubation mit BMS-214662 induziert einen Anstieg der Caspase 8 ...	57
3.2.	Die Caspase 8 Aktivierung erfolgt nicht über eine Erhöhung des D95-Rezeptors bzw. dessen Liganden	58
4.	Diskussion	60
4.1.	Ft-Is üben einen dosisabhängigen antitumorösen Effekt durch Induktion der Apoptose aus	60
4.1.1.	Die Ft-Is weisen ein unterschiedliches Aktivierungspotential auf	61
4.1.2.	Vergleiche zwischen unseren in vitro Versuchen mit klinischen Studien ...	61
4.2.	Die Farnesyltransferase-Inhibitoren wirken Ras-unabhängig	62
4.3.	Die Apoptose ist am wahrscheinlichsten durch eine gesteigerte Aktivierung der Caspase 8 und einen geringen Synergismus mit anti-APO1 induziert	63
4.3.1.	Die erhöhte Rekrutierung der Caspase 8 dargestellt an Hand der gesteigerten Aktivierung der Caspase	63
4.3.2.	BMS-214662 ruft einen geringen synergistischen Effekt mit anti-APO1 hervor	64
4.4.	Der Anstieg der Caspase 8 wird nicht über einen Anstieg der CD95-Rezeptoren bzw. CD95-Liganden Transkription ausgelöst	65
4.5.	Für die Zukunft bestehen noch weitere Perspektiven und Forschungsgebiete	65
4.6.	Schlussfolgerung	67
	Zusammenfassung	68
	Literaturverzeichnis	70
	Lebenslauf	94

Verwendete Abkürzungen und Einheiten

ATP	Adenosintriphosphat
Acr	Acrylamid
Bis	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid
Bp	Basenpaare
c	Zenti-
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre DNA
Cys	Cystein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometer)
FCS	fetales Kälberserum
Ft-I	Farnesyltransferase-Inhibitor
g	Gramm
G ₁ -Phase	Ruhephase im Zellzyklus nach der Mitose
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
k	Kilo
kd	Kilo-Dalton
l	Liter
m	Milli-
M	Molar (= mol/l)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
m-RNA	messenger RNA
μ	Mikro-

Verwendete Abkürzungen und Einheiten

n	Nano-
Nr	Nummer
NTP	Nukleosidtriphosphat
p	Symbol für Proton, Formelzeichen für Druck
PBS	Phosphate-buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT-PCR	Reverse Transkriptase – PCR
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthesephase
U	Umdrehung
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. Einleitung

1.1. Brisanz der Therapie gastrointestinaler Tumore

Laut der letzten veröffentlichten Auswertung des Statistischen Bundesamtes verstarben im Jahre 2007 alleine 211.765 Menschen an einem Karzinom. Mit 25,6 % ist dies die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Bei Männern und Frauen dominierten die bösartigen Neubildungen des Gastrointestinaltraktes mit 36.312 verstorbenen Männern und 31.880 Frauen (Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr. 303 vom 22.08.2008). Hierbei gilt das kolorektale Karzinom als eine der häufigsten malignen Erkrankungen in Mitteleuropa und ist für etwa 15 % aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt (Geschlechtsverhältnis Mann:Frau 60:40). Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren. Das Risiko für einen Deutschen, in seinem Leben an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt etwa 6 %, daran zu versterben etwa 2,5–3 %. Hierbei ist die Prognose von dem Ausmaß der Infiltration sowie dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen abhängig. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Mittel bei etwa 40 bis 60 %.

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit das 5. häufigste Karzinom mit 626.000 Neuerkrankungen im Jahr 2002. Der geringe Unterschied in der Anzahl der jährlichen Sterberate (598.000) bestätigt die immer noch schlechte Prognose dieser Erkrankung. Unbehandelt sterben praktisch alle Patienten innerhalb von 2 Jahren. Dies liegt nicht allein an der oft späten Diagnosestellung, auch kleine zufällig festgestellte Tumore zeigen einen aggressiven Verlauf mit einer Mortalitätsrate von bis zu 50 %. Damit steht das hepatozelluläre Karzinom an 3. Stelle der weltweiten Krebsmortalität. Geografisch gesehen, lässt sich eine deutliche Häufung der Erkrankung in den so genannten „developing countries“ feststellen. Die höchsten Inzidenzen werden in West- und Zentralafrika, Ost- und Südostasien (35/100.000 in China) gezählt. In den westlichen Nationen ist die Erkrankung generell selten, in Deutschland liegt die Inzidenz bei etwa 5-10/100.000. Hierbei basiert die Entstehung des Karzinoms zu 90 % auf einer Leberzirrhose. Die Geschlechtsverteilung ist klar zu Ungunsten der Männer verschoben (etwa 70:30 %), wobei der Großteil der Patienten jenseits des 65. Lebensjahres erkrankt (El-Serag et al, 2003, Parkin et al., 2005).

Allein anhand dieser Daten ist die Brisanz einer adäquaten Therapie der Tumorerkrankungen zu erkennen. Als eine mögliche Therapieergänzung wird hierbei die Induktion der Apoptose angesehen.

1.2. Die Apoptose

Die Apoptose stellt den programmierten Zelltod dar, gewissermaßen ein „Selbstmordprogramm“ einzelner biologischer Zellen. Der Begriff entstammt dem Griechischen (*απόπτωσης* von *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“) und beschreibt das Herabfallen der Blätter von den Bäumen. Dieser Mechanismus kann von außen angeregt werden (etwa durch Immunzellen) oder aufgrund von zellinternen Prozessen ausgelöst werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation) (Kerr et al., 1972).

Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt. Es ist ein Teil des Zellstoffwechsels. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle. Das zugrundegehen der Zelle findet ohne Schädigung von Nachbargewebe statt.

1.2.1. Biologische Bedeutung der Apoptose

Eine entscheidende Rolle der Apoptose liegt in der Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichts. Sie kontrolliert auf diese Weise die Zellzahl und die Größe eines Gewebes. Zudem werden durch virale Infektionen bzw. durch Mutation geschädigte Zellen beseitigt (Thompson, 1995). Im Immunsystem ist die Apoptose der entscheidende Vorgang in der Beseitigung von potentiell autoreaktiven oder nutzlosen Immunzellen. Auf diese Weise findet z.B. im Thymus eine Selektion der T-Zellen statt. Über die Apoptose werden T-Zellen beseitigt, welche mit Komplexen aus körpereigenen Peptiden und MHC reagieren, und somit als potenziell autoreaktiv einzustufen sind (Boehmer, 1994, Jenkins et al., 1989; Nossal, 1994). Des Weiteren ist die Apoptose essentiell an der Embryogenese, der Differenzierung der Organe und der Ausbildung einzelner Strukturen, wie z.B. Finger und Zehen, beteiligt (Barclay et al., 1944; Vaux and Korsmeyer, 1999; Vogt, 1842).

1.2.2. Apoptose als Auslöser pathogenetischer Prozesse

Auch in gesunden Leber- und Kolonkarzinomzellen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der Zellregulierung (Chinnaiyan et Dixit, 1996). Eine Dysregulation erweist sich als eine der Hauptrollen in der Pathogenese vieler Krankheitsbilder (Eichhorst et al., 2001; Eichhorst

et al., 2005; Jaeschke et Lemasters, 2003). Ein Zuviel an Apoptose, dargestellt an der Leber, spielt somit eine entscheidende Rolle in der Auslösung der chronischen Hepatitis bzw. des akuten Leberversagens. Im Gegensatz dazu erkannte man in dem Fehlen der Apoptoseinduktion einen entscheidenden Schritt in der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (Higaki et al., 1996; Leithauser et al., 1993). Hierbei beeinflusst ein Vorhandensein des Apoptose-Rezeptors, der CD95-Rezeptor, die Prognose. Ein Fehlen bzw. eine geringere Expressierung des Rezeptors führt zu einer Entdifferenzierung des Karzinoms. Ebenso ließ sich eine vergrößerte Tumorausdehnung, eine schlechtere Prognose und z.T. Zytostatika-Resistenz ableiten (Okano et al., 2003; Ito et al., 2000; Shin, et al., 2001; van Noesel et al., 2002; Ozören et El Deiry, 2003). Interventionen, welche eine Sensibilisierung bzw. ein Auslösen der Apoptose in Tumorzellen bewirken, sind aus diesem Grund eine vielversprechende Therapiemöglichkeit (Schuchmann et Galle, 2004).

1.2.3. Der morphologische Ablauf der Apoptose

Seit der Erstbeschreibung des römischen Arztes und Schriftstellers Galenus Galen im 2. Jahrhundert p.c. ist die Bezeichnung Apoptose anhand von morphologischen Veränderungen genau definiert. Zuerst beginnt die Zelle zu schrumpfen. Das Chromatin kondensiert und bildet in der Zellkernperipherie Aggregate. Ebenfalls erfolgt mit Hilfe der Endonukleasen eine Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen, wodurch die charakteristischen DNA-Stücke mit einer Länge von 180 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen auftreten. Diese Veränderungen werden im Englischen mit „boiling“ bezeichnet, da unter dem Mikroskop ein „Brodeln“ innerhalb der Zelle zu sehen ist, das durch Umwälzen von Zellinhalten zustande kommt. Parallel dazu geht die Zellmembranstabilität verloren. Ausstülpungen (Zeiose) und membranumschlossene Säckchen (blebbing) werden gebildet (siehe auch Abbildung 1). Diese Säckchen, auch apoptotische Körperchen genannt, gelten als histologische Merkmale bei verschiedenen Erkrankungen.

Anliegende Zellen, die meist nicht dem phagozytischen Makrophagen-Monozyten-System angehören, erkennen und verschlingen anschließend die apoptotischen Zell-Remnants, ohne eine inflammatorische Kaskade auszulösen. Entscheidend dabei ist, dass zu keiner Zeit zytoplasmatische Inhaltsstoffe in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden.

Mit diesen charakteristischen Merkmalen lässt sich die Apoptose deutlich von der Nekrose, die morphologische Veränderungen nach irreversiblen Ausfall der Zellfunktion (sog. Zelltod)

Einleitung

beschreibt, unterscheiden. Die Nekrose definiert sich durch das Anschwellen der Zelle (Onkose), das ein Platzen der Plasmamembran zur Folge hat. Zytosol und Zellorganelle gelangen in den interzellulären Raum und ziehen eine inflammatorische Reaktion nach sich.



Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen in der apoptotischen Phase mit der Ausbildung membranumschlossener Säckchen.

1.2.4. Das genetische Modell der Apoptose mit seinen Caspasen

Caenorhabditis elegans, eine Nematode, gab die ersten Hinweise auf die genetische Grundlage der Apoptose. Während der Embryogenese erfolgt die Eliminierung einer spezifischen Anzahl von Zellen anhand eines zeitlich und räumlich genau festgelegten Programms. Da immer Zellen der gleichen Entwicklungslinie und nie verschiedene Zellen sterben, musste ein genau festgelegtes Programm für diesen Signalweg existieren (Ellis et al., 1991; Ellis et Horvitz, 1986; Horvitz et al., 1983; Horvitz, 1999; Spector et al., 1997). Durch Mutationsanalyse gelang die Identifikation von spezifischen Genen, anhand derer die Entscheidung zwischen Leben und Tod des Fadenwurms gefällt wird (Ellis et Horvitz, 1991; Conrad et Horvitz, 1998; Cicala et al., 1999; Hengartner et Horvitz, 1994 a und b).

Dieses Apoptosemodell des Fadenwurms stellte sich als Basis für die weitere Forschung nach Analogien in Säugetierzellen dar. Identifiziert wurden hierbei die Caspasen, Protein spaltende Enzyme (Yuan et al., 1993). Der Name Caspase entwickelte sich aus zwei Charaktereigenschaften. Zum Einem befindet sich im aktiven Zentrum der Proteasen ein Cystein, zum Anderem spaltet die Caspase spezifisch nach einem Aspartat („cystein aspartat protease“, kurz Caspase) (Alnemri et al., 1996). Synthetisiert werden Caspasen als Zymogene, inaktive Enzymvorstufen. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung, wodurch eine große (20 kDa) und eine kleine Untereinheit (10 kDa) freigesetzt wird. Letztendlich ist das aktive Enzym in Form eines $\alpha_2\beta_2$ – Heterotetramers aufgebaut (s. Abb. 2) (Walker et al., 1994).

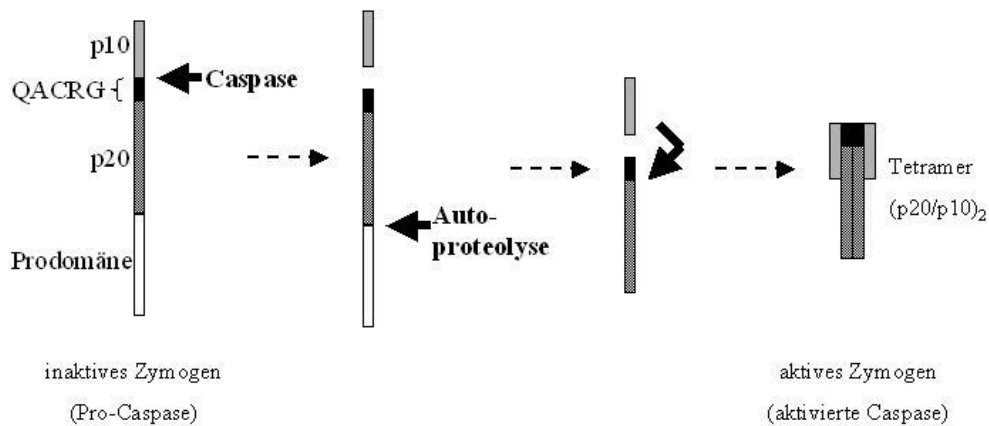


Abbildung 2: Darstellung des Aktivierungsmechanismus der Procaspase. Diese wird durch eine aktivierte Caspase oder einem weiteren Effektor an spezifischer Stelle, in die Untereinheit p10 sowie eine weitere Untereinheit geteilt. Anhand Autokatalyse erfolgt die Aufspaltung der zweiten Untereinheit in die Prodomäne und die Untereinheit p20. Jeweils zwei p10 und p20 Untereinheiten vereinigen sich zum aktiven Enzym (Eichhorst and Kramer, 2001).

1.3. Der CD95 Signalweg

1.3.1 Die Todesrezeptoren und ihre Liganden

Generell betrachtet können eine Vielzahl von Faktoren die Apoptose auslösen. Wir wählten in unserer Arbeit den CD95-Signalweg, da er als einer der wichtigsten Apoptose induzierenden Wege anzusehen ist. Der spezifische CD95-Rezeptor wird in den meisten Säugetierzellen exprimiert (Leithäuser et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992 a und b). Zusätzlich nutzen auch Tumorzellen diesen Apoptosemechanismus durch CD95-Liganden an deren Oberfläche, wodurch tumorinfiltrierende Lymphozyten mit CD95-Rezeptoren über Apoptoseeinleitung ausgeschaltet werden. Dieser Mechanismus wird als „Tumor counterattack“ bezeichnet (Whiteside, 2007).

Der in dieser Arbeit untersuchte CD95-Signalweg definiert sich über spezifische Rezeptoren, lokalisiert an der Zelloberfläche. Eine Aktivierung der Rezeptoren resultiert in der Ausführung des Apoptoseprogramms (Peter et Kramer, 1998). Verantwortlich präsentiert sich hierbei für die Induktion des programmierten Zelltodes eine in etwa 80 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne, auch Todesdomäne (Death Domain, DD) genannt (Itoh et Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Im Jahre 1989 wurde zum ersten Mal ein solcher Rezeptor beschrieben, der CD95-Rezeptor, auch unter APO-1 bzw. Fas bekannt (Itoh et al.,

1991; Oehm et al., 1992; Yonehara et al., 1989). Neben der Transmembranform liegt CD95 auch als Splice-Variante in löslicher Form vor.

Die Aktivierung der Todesrezeptoren unter physiologischen Bedingungen erfolgt über die Bindung spezifischer Liganden. So stellt CD95L (L=Ligand), ein ebenfalls glykosyliertes Transmembranprotein, den Ligand für den CD95-Rezeptor dar. Unter anderem sind Chemotherapeutika in der Lage, den Liganden zu exprimieren (Kasibhatla et al., 1998, Kaufmann et Earnshaw, 2000). Analog dem CD95-Rezeptor existiert der CD95L in membrangebundener als auch in löslicher Form. Dazu wird der Ligand von Metalloproteasen oberhalb der Zellmembran abgeschnitten (Kayagaki et al., 1995; Mariani et al., 1995; Tanaka et al., 1995). Allerdings ist die Expression von CD95L auf aktivierten T- und B-Zellen, sowie natürlichen Killer-Zellen beschränkt. Ferner lässt sich der Ligand auf Zellen einiger nichtlymphoider Organe wie Hoden (Yu et al., 1999) und die vordere Augenkammer (Griffith et al., 1995) nachweisen, wie auch auf neoplastischen Zellen (Hahne et al., 1996; O'Connell et al., 1996; Strand et al., 1996).

Neuere Ergebnisse zeigen einen weiteren Mechanismus der Rezeptoraktivierung. Dieser läuft Liganden unabhängig ab und wird unter bestimmten Umständen durch eine extrazelluläre Rezeptordomäne, PLAD (pre-ligand-binding assembly domain) bezeichnet, verursacht. Sowohl auf dem CD95- als auch auf dem TNF-R1-Rezeptor ist eine solche Domäne zu finden (Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000). Die genaue Funktion ist jedoch noch nicht bekannt.

Neben den physiologischen Arten der Aktivierung von Rezeptoren erfolgt eine Aktivierung mit Hilfe von agonistischen Antikörpern. Beispielsweise ist der Antikörper anti-APO1 (APO steht für Apoptose auslösend) in der Lage den CD95 Rezeptor auf Tumorzellen zu binden und dadurch Apoptose auszulösen (Trauth et al., 1989). Diesen Effekt nahmen wir für unsere Versuche in Anspruch.

1.3.2. Die Signaltransduktion

Mit dem Auffinden von spezifischen Todesrezeptoren, die durch Bindung ihrer Liganden den programmierten Zelltod auslösen, begann die Forschung nach dem Signalweg. Erste Untersuchungen wurden am TNF-R1 mit gebundenem LT- α/β durchgeführt. Das Ergebnis präsentierte eine durch Liganden ausgelösten Rezeptortrimerisierung, die es der Zelle ermöglicht, das Signal von Außen in das Zellinnere zu transferieren (Banner et al., 1993). Diese Dreierkonformation der Rezeptoren, ausgelöst durch ihre trimerisierten Liganden, spielt

bei CD95 ebenfalls eine signifikante Rolle (Peitsch and Tschopp; 1995). Erst diese Trimerisierung oder sogar Multimerisierung bewirkt die Weiterleitung des apoptotischen Signals in die Zelle (Dhein et al., 1992).

1.3.3. Der Signalkomplex

Nach Bindung des CD95L an CD95 vereinigen sich wie bereits beschrieben drei Liganden und drei Rezeptoren zu einem Komplex. Dies führt zu einer Annäherung der intrazellulären Todesdomänen der drei CD95-Rezeptoren, wodurch nun Proteine gebunden werden. Die generierte Einheit aus aktivierten Rezeptoren und assoziierten Signalmolekülen bezeichnet sich als todinduzierender Signalkomplex kurz DISC (=death inducing signaling complex) (Kischkel et al., 1995).

Im DISC erfolgt zuerst die Fixierung des Proteins FADD/MORT1 durch homologe Interaktion der Todesdomänen, welche sowohl auf FADD/MORT1 als auch auf den CD95-Rezeptoren zu finden sind. Nun übt FADD/MORT1 über eine weitere Domäne, die Todeseffektordomäne (death effector domain = DED), die Funktion eines Adapters aus und bindet die Procaspase-8 (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan and Dixit, 1996; Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Jeong et al., 1999; Muzio et al., 1996).

Die Ausbildung des DISC ist essentiell für die Induktion der Apoptose. So ließ sich anhand genetisch defekter Mäuse nachweisen, dass eine Mutation der Todesdomäne, eine verminderte Rezeptordichte oder die Expression von funktionslosen Liganden in einem Ausbleiben der Apoptose resultiert. Als Folge wiesen alle Mäuse auf Grund eines massiven Vorkommens von fehlerhaften T-Lymphozyten eine ausgeprägte Splenomegalie sowie Vergrößerung der Lymphknoten auf. Zudem entwickelten sie Symptome ähnlich der Lupus erythematodes-Erkrankung durch autoimmune Antikörper (Krammer, 1996 und 1998; Nagata et al., 1995).

Die Zelle besitzt jedoch auch einen natürlichen Hemmmechanismus des DISC. So ist c-FLIP in der Lage an der „death effecting domain“ des FADD/MORT1 Adapterproteins zu binden und hierdurch eine Rekrutierung der Procaspase 8 in den DISC zu verhindern. Demzufolge steht die Abkürzung FLIP für FLICE- inhibitory protein, wobei der ursprüngliche Name für Caspase 8, FLICE war. Hergestellt wird FLIP zum einem durch Viren, z.B. Herpesviren, wodurch FLIP die „Vorsilbe“ v erhält, zum anderem durch Zellen: c-FLIP (Irmeler et al.,

Einleitung

1997; Scaffidi et al., 1999). Weitere Regulationsmechanismen können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (Hengartner, 2000).

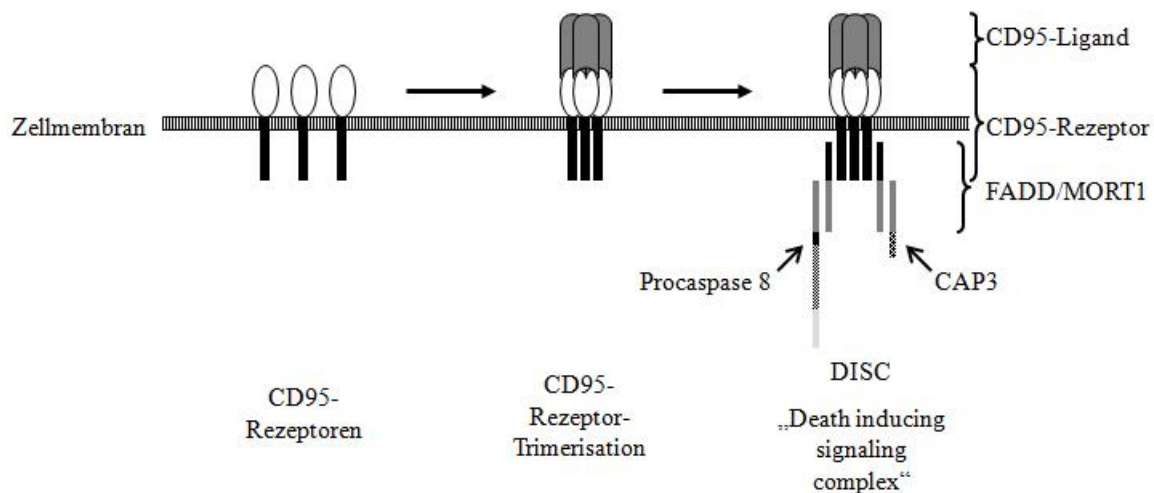


Abbildung 3: Darstellung der Aktivierung der Rezeptoren. Nach Rezeptor-Trimerisation, ausgelöst durch Ligandenbindung, erfolgt die Rekrutierung der Signalmoleküle FADD/MORT1, CAP3 und Procaspase 8. Der Gesamtkomplex wird als DISC bezeichnet, die Kurzform für „death inducing signaling complex“.

1.3.4. Formen des CD95-Signalwegs

In Abhängigkeit der DISC-Menge läuft die weitere Kaskade direkt (extrinsischer Weg) bzw. mit Hilfe einer mitochondrialen Signalverstärkung (intrinsisch) ab (Barnhart et al., 2003).

1.3.4.1. Der extrinsische CD95-Signalweg

Nach Eingehen der Trimerisation mit Ausbildung des DISC erfolgt die Rekrutierung des Eiweiß-spaltenden Proenzym Procaspase-8, welches autokatalytisch gespalten wird. Nach beschriebener Zusammenlagerung von jeweils zwei kleinen und großen Untereinheiten der Procaspase, entsteht die aktive Caspase 8, auch Initiatorcaspase genannt. Im weiteren Verlauf der Kaskade teilt und aktiviert die Caspase 8 die Caspase 3. Diese „ausführende“ Caspase wird als Effektorcaspase bezeichnet, da sie durch Zerstückelung zellulärer Substrate, wie z.B. Aktin und Plectin, Proteine des Zellgerüsts, zu dem morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führt.

Das morphologische Bild der Apoptose kennzeichnet sich insbesondere anhand der Zerschneidung der DNA in Längen von 180 Basenpaaren. Spezielle Proteine schützen im

Einleitung

Normalfall die DNA vor Endonukleasen. Nach Aktivierung der Effektorcaspasen werden die DNA-Schutzproteine gespalten und somit inaktiviert. Nun können die Endonukleasen in den Zellkern wandern und die DNA zwischen den Histonproteinen trennen. Die spezifischen Längen der DNA-Bruchstücke entstehen anhand der aufgewickelten DNA auf die Histone (s. Abb. 4) (Liu et al., 1997; Liu et al., 1999; Sakahira et al., 1998).

Versuche an Mäusen belegen, dass ein Fehlen der Caspase 3 keinen generellen Apoptosedefekt hervorruft (Kuida et al., 1996). Im Gegensatz zur Caspase 8, hier wiesen Zellen mit einem verminderten Gehalt an Caspase 8 eine Resistenz gegenüber CD95 vermittelter Apoptose auf (Varfolomeev et al., 1998). Diese Blockade der Apoptose erklärt sich in der essentiellen Rolle der Caspase 8 im CD95 vermittelten Signalweg. Die Caspase 8 dient als Bindeglied zwischen Todesrezeptoren und Effektorcaspase.

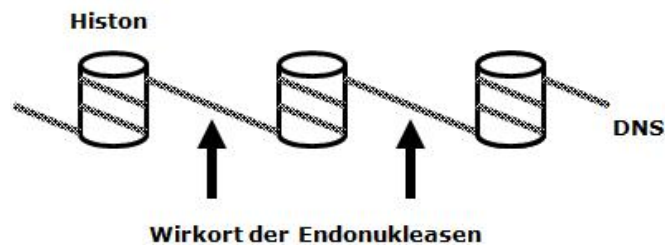


Abbildung 4: Fragmentierung der DNA während des apoptotischen Vorgangs. Einer der typischen Merkmale der Apoptose ist die Aufspaltung von chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke von 180 Basepaaren oder ein Mehrfaches davon. Diese entstehen durch enzymatische Verdauung der DNA zwischen den Histonproteinen.

1.3.4.2. Der intrinsische CD95-Signalweg

Zu diesem beschriebenen extrinsischen CD95-Signalweg gibt es in einigen Zellen eine Modifizierung, die als intrinsischer Weg bezeichnet wird (Hengartner, 2000). Auf Grund einer unzureichenden Ausbildung des DISC wird eine zu geringe Menge an Caspase 8 aktiviert. Für die Weitergabe des Apoptosesignals müssen diese Zellen, im Gegensatz zu Zellen mit viel DISC, über einen zusätzlichen Verstärkungsmechanismus verfügen. Hierfür spielt das proapoptotische Molekül Bid eine entscheidende Rolle. Eine durch Caspase 8 durchgeführte Spaltung des Bid resultiert in der „Aktivierung“ von Mitochondrien (Kroemer et al., 1998, Li et al., 1998). In Form einer Translokation binden sich diese Proteine, die vorwiegend im Zytosol auftreten, an die Mitochondrienmembran (Scaffidi et al., 1998). Dadurch werden proapoptotische Proteine, wie Cytochrom c (ein essentiellen Faktor der Atmungskette) aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt (Liu et. al., 1998; Luo et al.,

Einleitung

1998). Der spezifische Freisetzungsweg ist bislang ungeklärt (Hengartner, 2000). Freies Cytochrom c geht mit zytoplasmatischen Apaf-1 einen Komplex ein, auch Apoptosom genannt, welches unter ATP-Verbrauch die Caspase 9 aktiviert (Li et al., 1997; Salvesen and Renatus, 2002; Srinivasula et al., 1998 a und b). Über die Caspase 9 geht die Aktivierung der Caspase 3 vonstatten (Li et al., 1997). Nun läuft der Signalweg auf seinem gewohnten Weg weiter und resultiert in den typischen morphologischen Merkmalen.

Zur Differenzierung der beiden Zelltypen bedient man sich unterschiedlicher Namensgebung (Scaffidi et al., 1998). So wurden diejenigen Zellen, bei denen der Signalweg auf Grund eines geringen Anteils an DISC über Mitochondrien läuft, Typ-II Zellen getauft. Hierzu zählt mitunter die verwendete Hepatomzelllinie HepG2 (Eichhorst et al., 2004). Zellen mit einem hohen Gehalt an DISC bezeichnen sich als Typ-I. Bewiesen wurde eine solche Zelldifferenzierung beim CD95 Signalweg durch Analysen von Bid-Knockout-Mäusen. Trotz Injektion eines agonistisch wirkenden anti-CD95-Antikörpers erfolgte in den Typ II Leberzellen, ohne Protein Bid, keine Apoptoseinduktion. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen. Hier konnte durch den Antikörper eine hepatozelluläre Apoptose beobachtet werden (Yin et al., 1999).

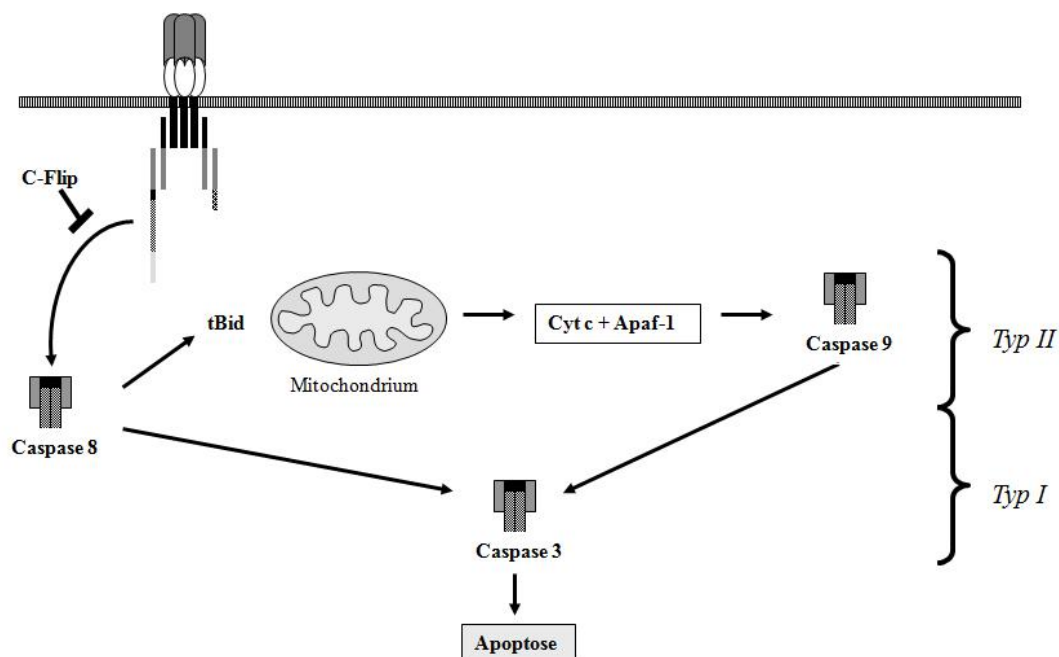


Abbildung 5: Darstellung des CD95-Signalweges in den verschiedenen Zelltypen I und II. In Abhängigkeit der DISC Menge erfolgt die Aktivierung von Caspase 8. Einem beim Zelltyp II auftretenden Mangel an DISC, folgt konsequenterweise auch nur eine geringe Caspase 8 Aktivierung. Die Caspase 8 ist nun nicht mehr in der Lage Caspase 3 in direkter Form zu aktivieren und nimmt über die Spaltung von Bid die Hilfe der Mitochondrien zur Signalverstärkung in Anspruch. Bei ausreichender Menge an DISC wird nach Aktivierung der Caspase 8 die Effektorcaspase 3 gebildet, welche zelluläre Substrate (beispielsweise Proteine des Zellgerüsts) spaltet. (Eichhorst and Krammer, 2001).

1.4. Folgerungen für Pathomechanismen

Die genaue Aufklärung des CD95 Signalweges und seiner Funktion hat Konsequenzen für das Verständnis von Krankheitsprozessen, welche durch eine übermäßige Steigerung bzw. Verringerung der Apoptose gekennzeichnet ist. Speziell in der Karzinogenese ist eine Massenzunahme von Zellen als die Summe von unkontrolliertem Wachstum und reduziertem Zellsterben durch z.B. eine verminderte Apoptoserate erklärbar. Anhand einer detaillierten Untersuchung der molekularen Grundlagen des Apoptoseprogramms lassen sich neue Therapieansätze formulieren. Hierbei ist es wichtig spezifische Apoptose ankurbelnde Medikamente zu entwickeln, welche nur in genau definierten Zellen, nämlich in den Tumorzellen, wirken (Eichhorst, 2005).

1.4.1. Krebsentstehung durch Mutagene

Der heutige Stand der Wissenschaft beschreibt die Entstehung des humanen Karzinoms als ein Ergebnis von Mutationen in multiplen Genen, welche die normale Zellproliferation, die Differenzierung und die Apoptose kontrollieren. Die mutierten Gene, die am häufigsten in Malignomen vorliegen, werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Eine Aktivierung dieser Proto-Onkogenen zu Onkogenen bzw. der Funktionsverlust der Tumor-Suppressor-Genen kann zu veränderten intrazellulären Signalen führen. Oftmals aufgefundene Alterationen in den Genprodukten humaner solider Tumoren sind Ras (ein GTP bindendes Protein), ErbB2/Her (eine membranassoziierte Tyrosinkinase) und nukleäre, transkriptionsbeeinflussende Proteine, wie Myc, Rb oder p53 (Bishop, 1991; Levine, 1997).

Mutationen in der Ras-onkogenen-Familie wurden als häufigste onkogene Alteration beschrieben und führen zu einem Anstieg der Zellproliferation und Tumorentstehung (Barbacid, 1987; Bos, 1989). Eine besonders hohe Inzidenz an Mutationen und/ oder Überexpression des Onkogens findet sich in Karzinomen des Pankreas (90%), der Thyroidea (50%), des Kolons (50%), der Lungen (30%) sowie in myloider Leukämie (30%). Identifizierte Mutationen im Ras-Protein, welche einen Tumor entstehen lassen, sind limitiert auf eine sehr begrenzte Anzahl von Lokalisationen. Von den Mutationen betroffen sind die Aminosäuren 12, 13, 59 und 61. Die Manifestation einer solchen Punktmutation liegt in der ständigen Aktivierung von Ras. Entdeckt wurde dies in Blasenkarzinomzellen. Spezifisch hierfür ist das 189 Aminosäuren lange H-ras Onkogen in der Position 12 durch Transversion

von GGC nach GTC verändert, mit der Folge, dass an dieser Stelle anstatt eines Glycins ein Valin vorliegt (Cerutti et al., 1994; Oxford et Theodorescu, 2003; Theodorescu et al., 1990 und 1991 a und b).

1.4.2. Das Ras-Gen

Ras stellt ein Akronym aus den Wörtern "rat sarcoma" dar, der Ursprung des viralen Genprototypen. Mitte der 1970iger Jahre wurde entdeckt, dass in Retroviren genetische Elemente vorliegen, welche für die tumorenstehende Fähigkeit verantwortlich sind. Bedeutsame Erkenntnis war hierbei insbesondere, dass die Gene dem zellulären Wirt der Viren „geklaut“ wurden (Krontiris, 1995). So konnten zwei eng verwandte Retroviren mit einer ähnlich defekten Replikationssequenz ausfindig gemacht werden, die für die Entstehung des Sarkoms bei Ratten verantwortlich sind, das Harvey murine sarcoma virus (Ha-MuSV) (Harvey, 1964) und das Kirsten murine sarcoma virus (Ki-MuSV) (Kirsten and Mayer, 1967). Die Genabschnitte beider Viren kodieren ein sehr nahstehendes Protein, v-H-ras und v-K-ras, welches für die zelluläre Transformation benötigt wird und onkogene Mutanten des normalen zellulären ras (c-H-ras und c-K-ras) darstellen (DeFeo et al., 1981; Ellis et al., 1981).

Grundsätzlich sind in humanen Zellen drei verschiedene Typen des potentiellen onkogenen ras Gens bekannt, das H-ras, Ki-ras und N-ras Gen (Barbacid, 1987). Wobei das Neuroblastom (N)-ras Gen bis zu diesem Zeitpunkt noch in keinem Retrovirus aufgefunden wurde (Adjei, 2001). Die drei Gene transkribieren für insgesamt vier verschiedene Ras-Proteine, denn durch differenzielles Spleisen entstehen zwei Transkripte des Ki-ras Gens, resultierend in zwei Protein-Isoformen, dem K-rasA und dem K-rasB (Chang et al., 1982; Barbacid, 1987). Allgemein lässt sich eine Tendenz ableiten, dass K-ras Mutationen häufiger in Nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomen, in Kolonrektum- und in Pankreas-Karzinomen auftreten. Die H-ras Mutationen sind in Blasen-, Nieren- und Schilddrüsen-Karzinomen weit verbreitet, wohingegen N-ras Mutationen in Melanomen, hepatozellulären Karzinomen und haematologischen Malignitäten gefunden werden (Adjei, 2001).

Das Molekulargewicht aller vier Ras-Proteine beträgt 21 kDa, weshalb diese auch als p21^{ras} bezeichnet werden (Scharovsky et al., 2000). Gebildet werden die Ras Proteine als pro-21 im Zytoplasma an freien Ribosomen, die Halbwertszeit beträgt mindestens 24h.

1.4.2.1. Mutationsfolgen der Ras-Proteins

Das Ras-Protein stellt einen molekularen Schalter dar, der zwischen einer inaktiven, Guanosin 5'-Diphosphat (GDP) gebundenen Form und einer aktiven, Guanosin 5'-Triphosphat (GTP) gebundenen Form, rotiert (Scolnick et al., 1979, Temeles et al., 1985). Reguliert wird das aktivierte Ras durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs = „guanine triphosphate-activating proteins“), die als Katalysatoren bei der Hydrolyse von GTP zu GDP dienen und dadurch das Leben des aktivierten Ras verkürzen können (Gibbs et Oliff, 1994; Levitzki, 1994; Pawson, 1995; Schafer et al., 1989; Temeles et al., 1985). In der Verhinderung der GAP induzierten GTP-Hydrolyse bleibt das Ras-Protein in der aktiven Form bestehen (Gideon et al., 1992; McGrath et al., 1984; Trahey and McCormick, 1987;). Dies resultiert, bezogen z.B. auf den Ras-1 Signalweg in einer kontinuierlichen Stimulation der zellulären Proliferation (Lowry et Willumsen, 1993). Als Beispiel dient die Erkrankung Neurofibromatose Typ I, welches durch eine Dysfunktion des GAP-Proteins Neurofibromin (NF1) das Ras-Protein abnorm aktiviert und in der Auslösung zahlreicher Melanome resultiert (Maruta et Burgess, 1994).

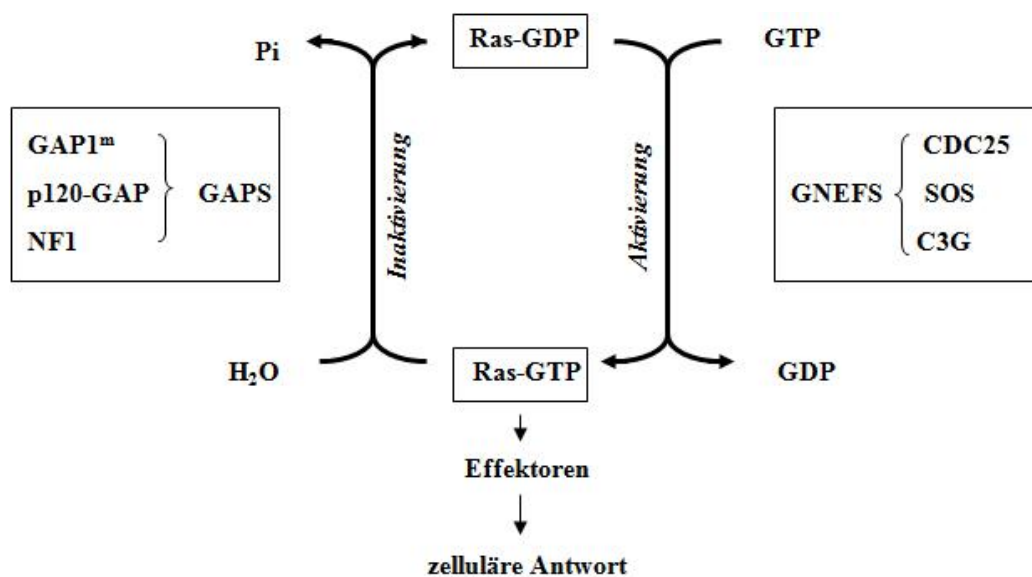


Abbildung 7: Aktivierungs- und Inaktivierungskreislauf des Ras-Proteins. GNEFs = guanine-nucleotide-exchange factors katalysieren die Ras-Aktivierung über Auslösung einer Konformationsänderung des Ras-Proteins, wodurch das fest gebundene GDP-Nukleotid von Ras dissoziiert. Die Inaktivierung des Ras-Proteins wird durch GTPase-aktivierende-Proteine, den GAPs = guanine triphosphate-activating proteins, p120-GAP, Neurofibromin (NF1) und GAP1^m stimuliert (Adjei, 2001).

1.4.2.2. Downstream-Mechanismus von Ras

Das aktivierte Ras (RasGTP) ist in der Lage unterschiedliche Effektoren, wie PI3K, Raf, RalGDS, und PLC ϵ in Gang zu setzen. Als Folge aktivieren diese Effektoren einige unterschiedliche Signalkaskaden, durch die Ras in der Lage ist, Zellproliferation, Überleben und weitere Aspekte des Zellverhaltens, welche dem transformierten Phänotyps zugerechnet werden, zu steuern (Burgering et Bos, 1995, Khosravi-Far et Der, 1994, Khwaja et al., 1997, Lambert et al., 2002, Rodriguez-Viciana et al., 1994). Die einzelnen Signalwege sind in der anschließenden Grafik dargestellt.

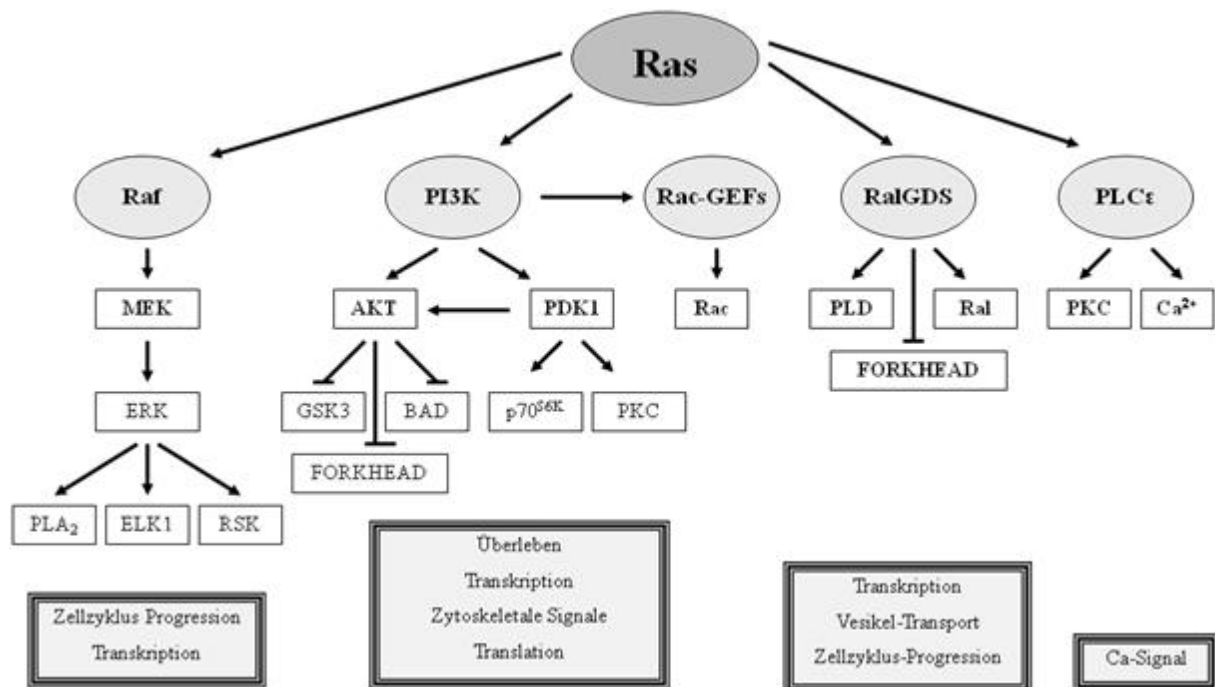


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des Ras-Signalwegs. Der Ras/ Raf-Weg ist der best charakterisierte Weg und beschreibt einen typischen MAP-Kinase-Signalweg. Hierbei stellt Raf eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase dar, welche MEK eine MAP-Kinase-Kinase aktiviert. Nach Aktivierung der MAP-Kinase ERK werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren des Zellkerns phosphoryliert und damit aktiviert. Typ I Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) generiert „second messenger“ Lipide, wie Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate, welche eine Vielzahl von Zielproteinen, inklusive der Überlebens-Signal Kinase Akt/PKB, aktiviert. RalGDS Proteine sind Guanin Nukleotid Austausch Faktoren (GEFs) für Ral, ein Ras-verwandtes Protein. Diese regulieren Forkhead Transkriptionsfaktoren. Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) katalysiert die Hydrolyse des Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphats zu Diacylglycerol und Inositol Trisphosphat, welches in der Protein Kinase C (PKC) Aktivierung und Calcium Mobilisierung resultiert.

GSK3= Glykogen-Synthase-Kinase-3; P70^{S6K}= p70 ribosomale Protein S6-Kinase; PDK1= „phosphatidylinositol trisphosphate-dependent kinase“; PLA₂= Phospholipase A₂; PLD= Phospholipase D; RSK= p90 ribosomale Protein S6-Kinase; BAD= pro-apoptisches Protein der Bcl-2 Familie (Downward, 2003).

1.4.3. Therapeutischer Ansatz durch Farnesyltransferase-Inhibitoren

Die Erkenntnisse, dass in 30% aller Tumorzellen eine ras-Mutation zu finden ist, nahmen Forscher zum Anlass, neue Therapiekonzepte zu entwickeln. Der Grundgedanke liegt in der Inhibierung der ständig aktivierten Ras-Signalkaskade. Es wurde nach Stoffen gefahndet, die in der Lage sind, spezifisch diese anhaltende Aktivierung der Ras-Signalkaskade zu hemmen (Johnston, 2001 a und b). Zur Unterbrechung des Ras-Signalweges bestehen drei Ansätze: Inhibierung der Expression des Ras Proteins durch Ribozyme, antisense Oligonukleotiden oder RNAs, Verhinderung der Ras-Verankerung in die Zellmembran, bzw. Inhibierung von downstream Effektoren (Scharovsky et al., 2000).

Das Wissen, dass jedes neu synthetisierte Ras-Protein eine Reihe an post-translationalen Modifikationen, wie Farnesylierung, Proteolyse und Methylierung, durchläuft, galt als ein vielversprechender Therapieansatz (Hancock, 1989). Mit Hilfe der Farnesylierung erhält das Ras-Protein durch kovalente Addition eines Farnesyl (15-carbon) Isoprenoids hydrophobe Eigenschaften, anhand derer dem prozessierten Ras-Protein eine Anbindung an die Innenseite der Plasmamembran erleichtert wird (Willumsen et al., 1984, Casey et al, 1989; Zhang et Casey, 1996). Dieser Schritt stellt sich als essentiell für die Assoziierung des Ras mit der Membran dar und wird durch die zwei darauffolgenden Schritte, Proteolyse und Methylierung, in seiner Effizienz verstärkt (Kato et al, 1992). Mit der Verankerung erhält das Ras-Protein seine biologische Funktion und kann seine Rolle als Aktivator wichtiger Signalkaskaden wahrnehmen, welche die zelluläre Proliferation (Mulcahy et al., 1985) und die Differenzierung (Noda et al., 1985) betreffen (Boguski und McCormick, 1993).

Mit dem Entwerfen von Inhibitoren der Farnesylierung erhoffte man sich Chemotherapeutika zu schaffen, die einen geringen Einfluss auf die normale Zellphysiologie nehmen, jedoch in der Lage sind, maligne Zellphänotypen zu inhibieren (Prendergast, 2001). Benannt wurden die Chemotherapeutika mit Farnesyltransferase-Inhibitoren.

In einer Vielzahl von Versuchen mit Maus Modellen, bei denen Mäusen ein körperfremdes bzw. ein transgenes Gewebe transplantiert wurde, gelang es aufzuzeigen, dass Farnesyltransferase-Inhibitoren die Modifikation von neu synthetisierten H-Ras-Proteinen inhibieren und ein Anker-unabhängiges Zellwachstum unterdrücken. Der Verlust dieser Anker-Unabhängigkeit korreliert mit einer Reversion zu einem flachen Zellphänotyp und einer permissiven Zellproliferation (James et al., 1993; Prendergast et al., 1994). Auch die von K-Ras und N-Ras transformierten Zellen werden von einer Inhibierung der Farnesyltransferase beeinflusst. Allerdings erfolgt dies nicht in dem Ausmaß wie H-Ras

Einleitung

transformierte Zellen (Sepp-Lorenzino et al., 1995).

In einigen Transplantaten und transgenen Maus-Modellen blockierten Farnesyltransferase-Inhibitoren die Malignität entweder durch eine Hinderung des Tumorwachstums oder durch eine Auslösung der Tumorregression. Die Regression erklärte sich mit einer Blockade des Zellzyklus, bzw. einer gesteigerten Apoptose.

Diese Beeinflussung der Apoptose durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren nahmen wir zum Anlass, die Art der Apoptoseinduktion zu erforschen. Einen möglichen Wirkmechanismus stellten wir mit Hilfe von in vitro Versuchen dar. Spezifisch wurden hierbei zwei unterschiedliche Karzinome, das hepatozelluläre sowie das kolorektale Karzinom untersucht. Mit dem Wissen, dass nur in der kolorektalen Zelllinie eine Mutationen des ras Gens vorlag, konnten wir zudem eine mögliche Unabhängigkeit in der Wirkweise der Farnesyltransferase-Inhibitoren von einer solchen Mutation aufzeigen. Verwendet wurden hierbei zwei unterschiedliche Farnesyltransferase-Inhibitoren. Als Ziel galt die Erforschung des Wirkmechanismus von BMS-214662 und SCH66336, um den Einsatz der beiden Chemotherapeutika effizienter zu gestalten und eine mögliche Therapieoption für einen der zwei meist verbreiteten Karzinome aufzuzeigen.

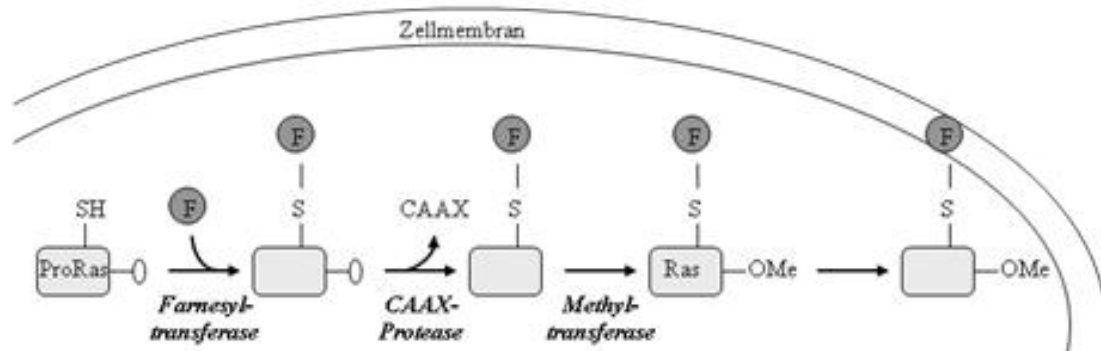


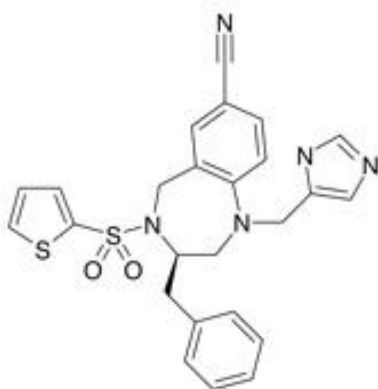
Abbildung 6: Darstellung der post-translationalen Modifikation des Ras. Ras wird als inaktives Pro-Protein (pro-Ras) synthetisiert. Anschließend erfolgen diverse post-translationalen Modifikationen, welche die Assoziation mit der inneren Plasmamembran ermöglichen. Der erste Schritt stellt die Addition der Farnesylgruppe am Cys 186 dar, katalysiert durch das Enzym Farnesyltransferase. Als nächstes erfolgt die Abtrennung des CAAX-Restes durch die CAAX-Protease. Der verbleibende Rest methyliert sich am Cys 186 Ende durch Methyltransferase (Crul et al., 2001).

1.5. In unseren Versuchen verwendete Farnesyltransferase-Inhibitoren

Die beiden von uns verwendeten Farnesyltransferase-Inhibitor BMS-214662 und SCH66336 werden jeweils in klinischen Studien evaluiert. Insgesamt gesehen rufen sie vergleichbare Nebenwirkungen wie gebräuchliche Chemotherapeutika hervor: z.B. Neutropenie, Thrombozytopenie, Diarrhö, Ausschlag, Neuropathie und Transaminasenanstieg. Ein Nachweis klinischer Aktivität gelang in soliden Tumoren (Ready et al., 2007; Chow et al., 2008) wie dem Kolon- (Ryan et al, 2004; Adjei et al, 2000) und Mamma-Karzinom (Johnston et Kelland, 2001), als auch für das myelodysplastische Syndrom (Kurzrock et al., 2003), multiple Myelome (Santucci et al., 2003), chronische myeloische Leukämie und akute Leukämie (Karp et al., 2001). In soliden Tumoren liegt der Effekt insbesondere in der stabilisierenden Wirkung des Tumors (Ryan et al, 2004). Durch Kombination mit einem Chemotherapeutikum lässt sich eine Intensivierung der Wirkung mit Einleitung einer Remission erreichen (Khuri et al., 2004; Mackay et al., 2004).

1.5.1. BMS-214662

BMS-214662 stellt ein nicht sedierendes Benzodiazepin-Derivat dar, das neben der stärksten apoptotischen Wirkung sich insbesondere durch einen kurativen Einfluss gegenüber einer Vielzahl von Tumorzelllinien (insbesondere in H-Ras transformierten Zellen) kennzeichnet. Die übrigen Farnesyltransferase-Inhibitoren weisen allenfalls einen zytostatischen Einfluss auf.



(*R*)-7-Cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1*H*-1,4-benzo-diazepine

Abbildung 10: Darstellung des Farnesyltransferase-Inhibitors BMS-214662 in seiner chemischen Formel (Hunt et al., 2000).

Einleitung

Seit Februar 2001 wird das Medikament BMS-214662 in einer klinischen Studien-Phase-Nr. II, durchgeführt an Patienten mit Pankreas- und Kolorektalem-Karzinom, in den USA evaluiert (Johnston, 2003). Allerdings besteht für das BMS-214662 ein entscheidender Nachteil. So zeigten klinische Studien der Phase I, dass eine orale Verabreichung aufgrund seiner ausgeprägten Nebenwirkungen nicht möglich ist. Ernste gastrointestinale Effekte sowie Lebertoxizität verhinderten eine adäquate systemische Verabreichung. Aus diesem Grund musste die intravenöse Verabreichung (wöchentliche Infusion über 1 h) gewählt werden, ein Nachteil für den Einsatz als Langzeitmedikament (Caponigro, 2002). Die Ergebnisse der Phase I Studien belegen eine Stabilisierung der tumorösen Aktivität des Patienten bis hin zum klinischen Ansprechen in einigen wenigen Patienten (siehe folgende Tabelle 1). Bezüglich der Verabreichung wird nach den Phase I Versuchen eine Dosis von 200 mg/kg als Monotherapie bzw. 160 mg/kg als Kombinationstherapie i.v. über 1 h wöchentlich empfohlen (Bailey et al., 2007; Ryan et al. 2004). Anhand in vivo Versuchen mit Mäusen unter Verwendung von HT29-Zellen konnte eine Höchstdosis von 450 mg/kg detektiert werden. Hierunter verstarb 1 von 8 Mäusen. Unter Verwendung von 300 mg/kg konnten 3 Mäuse von 8 geheilt werden, aber bereits die Verwendung von 200 mg/kg galt als effektiv (Rose et al., 2001).

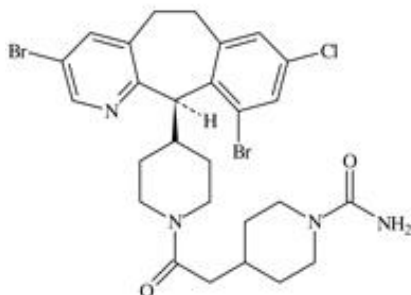
In unseren Versuchsreihen wurde 1 bzw. 10 μM BMS-214662 verwendet. Die molekulare Masse von BMS-214662 beträgt < 600 Da (Gibbs, 2000). Anhand dessen ließ sich errechnen, dass 10 $\mu\text{M} \approx 6$ mg/l BMS-214662 darstellt. In den klinischen Versuchen wurde meistens eine Konzentration von 0,2 – 2,5 mg/ml BMS-214662 in Abhängigkeit der Körperoberfläche verwendet.

Dosis [mg/m ²]	Therapie-regime	Pat. zahl	Neben-wirkungen	Klinische und biologische Aktivität	Literaturnachweis
Phase I					
• 36-168	• 1-0-0 oral	• 13	• Toxizität	• dosisabhängige Inhibierung der Farnesylierung im peripheren Blut (Leukozyten)	• Sonnichsen et al., 2000
• 36-225	• 1h i.v. (q21)	• 44	• Übelkeit • Erbrechen • Diarrhoe	• Klinische Aktivität in 3 Pat. (z.B. Colon-Ca 1 Pat.)	• Ryan et al, 2004
• 200	• 1h i.v. (q21) + Cisplatin [75mg/m ²]	• 29	• GI-Effekte	• kein direktes Ansprechen, jedoch Stabilisierung bei 15 Pat. mit soliden Tumoren	• Mackay et al., 2004
• 28-220	• 1h i.v. (q7)	• 27	• GI-Effekte • Neutropenie	• Stabilisierung bei 25 Pat. für 22 Wochen (solide Tumore)	• Papadimitrakopoulou et al., 2005
• 160 (80-245)	• 1h i.v. (q7) + Paclitaxel [80mg/m ²]	• 26	• GI-Effekte	• Signifikante (>80%) Aktivität in peripheren mononuklearen Zellen	• Bailey et al., 2007

Tabelle 1: Auflistung einer Auswahl von Ergebnissen der klinischen Phase I Studien mit BMS-214662. Eine dosisabhängige Inhibierung der Farnesylierung im peripheren Blut konnte nachgewiesen werden. Ebenfalls demonstrierte BMS-214662 bei den meisten Patienten eine Stabilisierung bis hin zu einem direkten Ansprechen auf die tumoröse Aktivität.

1.5.2. SCH66336

SCH66336 auch Lonafarnib, SarasarTM genannt, ist ein nicht-thiolhaltiger trizyklischer Farnesyltransferase-Inhibitor.



(+)-4-{2-[4-(8-Chloro-3,10-dibromo-6,11-dihydro-5H-benzo (5,6) cyclohepta [1,2-b] pyridin-11-yl)-1-piperidinyl]-2-oxoethyl}-1-piperidinecarboxamide

Abbildung 11: Der Farnesyltransferase-Inhibitor SCH66336 in seinem chemische Aufbau (Morgan et al., 2003).

Einleitung

Derzeit befindet sich SCH66336 in der klinischen Studie-Phase-Nr. III (Doll et al., 2004; Downward, 2002; Norman, 2002). In den präklinischen Karzinomstudien zeigt SCH66336 eine erhöhte antitumoröse Aktivität in Verbindung mit Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil oder Vincristin. Eine Besonderheit konnte in der Blockadefähigkeit des Pgp-Rezeptors aufgedeckt werden, welcher für die Multiresistenz der Zellen gegenüber vielen Medikamenten verantwortlich ist. Die Phase I Studien demonstrieren in einigen Patienten mit soliden Tumoren eine Stabilität. 2 Patienten wiesen sogar eine Remission mit der kombinierten Gabe gängiger Chemotherapeutika auf. Die Phase II Studien fanden bislang hauptsächlich an Patienten mit Leukämie und Myelodysplastischen Syndrom mit Nachweis einer Reaktivität statt. In der Literatur ließ sich als einziger Vertreter der soliden Tumoren das Urothel-Karzinom finden. Allerdings zeigte SCH66336 keinen wesentlichen Einfluss (siehe auch Tabelle 2). In den Studien wurden Dosen von 25 – 300 mg SCH66336 verabreicht. Vergleichend zu unseren Ergebnissen wurden Konzentrationen von 25 μM \approx 14 mg/l verwendet, wobei die molekulare Masse von SCH66336 560 Da beträgt (Han et al., 2005).

Dosis [mg]	Therapieregime	Pat. zahl	Nebenwirkungen	Klinische und biologische Aktivität	Literaturnachweis
Phase I					
• 25-300	• 1-0-1 14 Tage oral (q28)	• 21	• Nausea, Diarrhoe	• 2 Patienten stabil für 4 Monate mit Colon-Ca	• Adjei et al., 2000
• 100/ 125/150	• 1-0-1 (q28) + Paclitaxel 40/ 60/80mg/m ² i.v. 1/W	• 27	• Neutropenie, Diarrhoe	• Stabilität in 16 Pat. für mehr als 4 Zyklen in 6 Pat. (solide Tumore)	• Ready et al., 2007
• 75-125 (q28/21)	• + Gemcitabine 750- 1000mg/m ² (Tag 1,8,15)+ Cisplatin 75mg/m ² alle 28 T.	• 22	• Neutropenie, Thrombozytopenie => Dosisreduktion	• Stabilität in 4 Pat., komplette Remission 1 Pat., partielle R. 1 Pat. (solide Tumoren)	• Chow et al., 2008
Phase II					
• 200	• 1-0-1 (q28)	• 19	• Depression, Dyspnoe	• kein Ansprechen (10 Pat.), Progression(5) bei Urothel-CA	• Winquist et al, 2005
• 200	• 1-0-1 (q28)	• 17	• GI-Probl. + Myelosuppression	• geringe Aktivität in Pat. mit MDS oder sek. AML	• Ravoet et al., 2008
• 200-300	• kontinuierlich	• 67	• Diarrhoe, Nausea	• Reaktivität in 6/32 bzw. 10/35 bei Pat. mit MDS bzw. CMML	• Feldman et al., 2008

Tabelle 2: Auflistung einzelner Studien der Phase I und II in denen das Medikament SCH66336 getestet wurde. Insgesamt ließ sich ein geringes Ansprechen erkennen. So konnte bei 2 Patienten mit Kolonkarzinom eine Stabilität erreicht werden. In Kombination mit den Chemotherapeutika Gemcitabine und Cisplatin konnte sogar bei 4 Patienten eine komplette Remission erzielt werden.

1.6. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Farnesyltransferase-Inhibitoren hinsichtlich der antitumorösen Wirkung auf gastrointestinale Tumore in verschiedenen *in vitro* Experimenten untersucht. Als Marker für die therapeutische Wirkung wurde die Induktion der Apoptose gewählt. Die Messung der potentiellen apoptotischen Aktivität der beiden Farnesyltransferase-Inhibitor-Vertreter BMS-214662 und SCH66336 erfolgte anhand der apoptosetypischen fraktionierten DNA. Es galt darzustellen, inwieweit die Wirkung dosisabhängig ist bzw. ob eine Beeinflussung durch Verwendung von anti-Apo 1, einem agonistisch wirkenden Antikörper, besteht.

Bei Bestätigung einer Apoptoseinduktion durch Verwendung der Farnesyltransferase-Inhibitoren sollte der Wirkmechanismus auf den CD95-Signalweg untersucht werden. Mittels Western Blot wurde die Darstellung einer möglichen Aktivierung der Caspase 3 und 8 geplant. Anhand der PCR sollte ein Einfluss der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf den CD95-Rezeptor bzw. dessen Liganden überprüft werden.

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit war, eine mögliche Abhängigkeit der Farnesyltransferase-Inhibitoren von der Ras-Mutation zu untersuchen. Dies sollte mittels Verwendung einer Zelllinie mit Ras-Mutation (HT29) im Vergleich zur Zelllinie ohne Ras-Mutation (HepG2) dargestellt werden.

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturmaterialien

RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Phosphat Suffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München/ Steinheim, D

2.1.2. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden 2 unterschiedliche Zelllinien verwendet: die vor ca. 50 Jahren, aus einem kolorektalem Adenokarzinom, gewonnenen HT29-Zellen sowie die hepatozellulären Karzinomzellen HepG2 mit einem Alter von ca. 21 Jahren. Im Vergleich zu den HepG2-Zellen besitzt die HT29-Zelllinie mehrere Onkogene, unter anderem Mutationen im ras-Gen.

Zelllinie	Gewebe	Onkogene	Gewinnung
HT29	Kolorektales Adenokarzinom	myc ⁺ , ras ⁺ , myb ⁺ , fos ⁺ , sis ⁺ , p53 ⁺ , abl ⁻ , ros ⁻ , src ⁻	ca. 1959
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	Keine	ca. 1988

Tabelle 3: Darstellung der beiden verwendeten Zelllinien HT29 und HepG2.

2.1.3. Medikamente und deren Vorbereitung

BMS-214662	Bristol-Myers-Squibb, München, D
SCH66336	Schering-Plough, New York, USA

Material und Methodik

a) Präparation von BMS-214662

Das Hydrochloridsalz BMS-214662 stellte die Bristol-Myers-Squibb Gesellschaft bereit, nach deren Angaben die Herstellung der Suspension erfolgte. Zuerst erfolgte die Lösung des BMS-214662-Salzes in einer 1 zu 10 Verdünnung mit 100% Ethanol. Bei einem erneuten Bezug des Farnesyltransferase-Inhibitors ergaben sich Änderungen zum Lösungsverfahren. Insofern wurde BMS-214662 in einer Mischung aus DMSO und Aqua bidest mit einer Konzentration von 1 zu 50 suspendiert.

b) Präparation von SCH66336

Das SCH66336 erhielten wir von Schering-Plough compound resources. Anfangs wurde eine Mischung aus Methanol und Aqua bidest von 50 zu 50 angefertigt. Davon wurde 1,6 ml zu dem SCH66336-Salz gegeben, wodurch eine Stock Lösung von 50 mM entstand. Diese Stock Lösung wurde dann, je nach benötigter Konzentration, weiter in der Methanol/ Aqua bidest Mischung verdünnt.

2.1.4. Chemikalien

Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Dichlormethan	Roth, Karlsruhe, D
Aqua bidest	Merck KgaA, Darmstadt, D
Propidiumiodid	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Tris- Base	Roth, Karlsruhe, D
Borsäure	Sigma, Steinheim, D
EDTA disodium H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt, D
Trypanblau	Sigma, München/ Steinheim, D
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim, D
Loading Dye	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Gene ruler 100 Bp	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Kd DNA Ladder	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Tris- HCl (pH 6,7; 6,8 und 8,8)	Roth, Karlsruhe, D
NaCl	Roth, Karlsruhe, D

Material und Methodik

Triton- X– 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Complete	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vanadate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Trizma	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
konzentrierte HCl	Roth, Karlsruhe, D
flüssiger Stickstoff	Merck KgaA, Darmstadt, D
Acrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bis	Roth, Karlsruhe, D
SDS	Roth, Karlsruhe, D
APS	Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Tris (für Western Running)	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5. Antikörper

Anti-APO1	Gabe von Peter Krammer, DKFZ, Heidelberg, D
Protein A	Gabe von Peter Krammer, DKFZ, Heidelberg, D
M- MLV RT	Gibco BRL, Karlsruhe, D
First Strand Buffer 5x	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Primer Poly A (dT ₁₅)	Roche, Mannheim, D
DTT	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Primer upstream	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Primer downstream	Gibco BRL, Karlsruhe, D
dNTP	Promega, Mannheim, D
PCR-Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe, D
RNA-Inhibitor	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Marker für Elektrophorese beim Western	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Flice (Caspase 8) Antikörper	Gabe von Peter Krammer, DKFZ, Heidelberg, D
anti-Caspase 3	Biocarta, Hamburg, D

Material und Methodik

β-Aktin Antikörper	Biocarta, Hamburg, D
anti-mouse	Biocarta, Hamburg, D
anti-rabbit	Biocarta, Hamburg, D
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, Buckinghamshire, GB
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

2.1.6. Geräte und sonstige Materialien

Latexhandschuhe (nicht steril)	Cardinal Health, Baesweiler, D
Petrischalen (10 cm)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
6- Lochplatten	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Glas- Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten (verstellbar 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (10 µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Falcons (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Neubauer- Zählkammer/ Zellsieb	Schärfe System, Reutlingen, D
Sicherheitswerkbank (Herasafe)	Thermo Scientific, D
Inkubator (Heracell)	Thermo Scientific, D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Zentrifuge	Beckmann, München, D
Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, D
FACScan	Becton Dickinson FACScan system, USA
Probenröhrchen	Becton Dickinson, USA
Tischzentrifuge	Qualitron, GB
Tubes (PCR, 200 µl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
Photometer	Bibby Scientific, USA
Cycler	Qiagen, Hilden, D
Falcons	Schott, Mainz, D

Material und Methodik

Bechergläser	LabMarket, Mannheim, D
Messbecher	LabMarket, Mannheim, D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Latexhandschuhe (extra fest für PCR)	Cardinal Health, USA
Mikrowelle	Samsung, D
PCR Elektrophorese	Bio-Rad, USA
Stromkasten	Bio-Rad, USA
Entwickler für PCR Gel	Qiagen, Hilden, D
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Laufkammer	Bio-Rad, USA
Blotkammer	Amersham, Buckinghamshire, UK
Kreisrüttler	Nortex, Neolab
Folie	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Parafilm M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Röntgenfilm	Hyperfilm™ ECL Eastman Kodak
Röntgenkassette	Biomax, Kodak
Entwickler	Kodak

2.1.7. Puffer und Lösungen

RPMI- Vollmedium:	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	FCS
	5 ml	Gentamycin
	5 ml	Glutamin
Nicoletti Puffer:	100 mg	Na- Citrat
	100 µl	Titron X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
	in 100 ml H ₂ O	
Stripping Puffer:	250 ml	62,5mM Tris- HCl- Lsg [pH 6,7]
	5 g	SDS
	1760 µl	Mercaptoethanol

Material und Methodik

Facs Puffer [10 l]:	81,2g	NaCl
	2,6g	KH ₂ PO ₄
	23,5g	Na ₂ HPO ₄
	2,8g	KCl
	4,3g	(NaCl)LiCl
	2,0g	NaN ₃
	3,6g	Na ₂ -EDTA
	in 10 l H ₂ O	
RT- Mastermix:	4µl	MMLV- RT- Puffer (= First Strand Buffer)
	2µl	0,1M DTT
	4µl	2,5mM dNTP Mix
	4µl	20µM Primer Poly A (dT ₁₅)
	1µl	M- MLV RT
RT- PCR- Mastermix:	1 µl	Primer upstream
	1 µl	Primer downstream
	1 µl	2,5mM dNTP Mix
	5 µl	PCR- Puffer
	0,25 µl	Taq- Polymerase
	36,75 µl	H ₂ O
10 x TBE:	108 g	Tris- Base
	55 g	Borsäure
	7,44 g	EDTA disodium 2 H ₂ O
	-> in 1000 ml H ₂ O (aqua bidest)	
	-> pH 8,3 mit Borsäure eingestellt	
Agarose- Gel:	3 g	Agarose
	150 ml	0,5 TBE

Material und Methodik

Lysepuffer [50ml]:

20 mM	Tris HCl
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
1 %	Triton- X- 100
1 x	Complete (in 2ml H ₂ O dest. gelöst)
0,1 mM	Vanadate
10 mM	NaF

SDS-Gel [12,5%]:

- Trenngel:

4,1 ml	Acr 30 %
1,666 ml	Bis 2 %
3,125 ml	Tris- HCl pH 8,8
125 µl	SDS 10 %
925 µl	H ₂ O
50 µl	APS 10 %
5 µl	TEMED

- Sammelgel:

0,650 ml	Acr 30 %
0,260 ml	Bis 2 %
1,250 ml	Tris- HCl pH 6,8
50 µl	SDS 10 %
2,765 ml	H ₂ O
50 µl	APS 10 %
5 µl	TEMED

10xWestern Running:

30,28 g	0,25 M Tris
242,63 g	1,9 M Glycin
1 %	SDS

-> auf 1000 ml H₂O

10xTowbin:

250 mM	Tris Base
140 mM	Glycin

-> auf 1000 ml H₂O

Material und Methodik

10xTBS [11]: 24,2 g Trizma
 80 g NaCl
 -> in 1000 ml H₂O dest.
 -> Einstellung auf pH 7,60 mit konzentrierter HCl

2.2. Methodik

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivieren der Zellen

Die Kultivierung der adhären wachsenden Zellen erfolgte in Petrischalen mit 10 ml RPMI 1640 Medium, das 1 % Gentamycin, 1 % Glutamin und 10 % FCS beinhaltet. In einem Brutschrank mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37° C fand die Aufbewahrung der Zellen statt. Nach einem Zeitraum von drei bis vier Tagen entstanden etwa 60-80 % konfluent wachsende Zellen. Zur Ablösung der Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS mit 5 ml Trypsin passagiert, was eine Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte ermöglichte. Somit lagen die Zellen abgerundet und vereinzelt vor. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in RPMI-Vollmedium. Die Aussäung wurde in einem Verhältnis von 1:4 bzw. je nach gewünschter Zellmenge in 10 cm Petrischalen vorgenommen. Hierbei galt es eine weitere Proteolyse zu verhindern. Die Umsetzung gelang mittels Inaktivierung des Trypsins über den Proteinanteil des Kälberserums im RPMI-Vollmedium. In einem abschließenden Schritt wurde die Zell-Mediumsuspension mit frischem RPMI-Vollmedium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Kryoröhrchen. Eine ausreichende Konservierung erzielten wir durch ein schrittweises herunterkühlen auf Temperaturen von -80° C im Gefrierfach bzw. auf -196° C in Tanks mit flüssigem Stickstoff. In einem raschen Auftauvorgang erwärmten wir die Zellsuspension in einem auf 37° C temperierten Wasserbad und überführten sie anschließend in 10 ml RPMI-Vollmedium. Ein nach fünfminütiger

Zentrifugation bei 1500 U/min gewonnener Überstand wurde verworfen. Das verbleibende Zellpellet verteilten wir auf die Petrischalen in 10 ml frisches Medium. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen.

Vor dem Einfrieren der Zellen lösten wir diese mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Schalen und resuspendierten sie in 10 ml RPMI-Vollmedium. Nach darauffolgender Zentrifugation wurde wiederum der Überstand verworfen. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 1 ml kalter Lösung, bestehend aus 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid, mit anschließender Lagerung in Kryoröhrchen. Dabei stellte DMSO die Substanz dar, die sowohl die Ausdehnung der Zellen bei Kälte als auch die Kristallisation innerhalb der Zellen beim Einfrieren verhindert. Im Gegensatz zum Auftauen läuft der Vorgang des Einfrierens langsam ab. Zuerst wurden die Zellen auf Eis bei 4° C, dann 2 Stunden bei -20° C, anschließend bei -80° C gelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3. Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung aussagefähiger Ergebnisse galt es für die Versuchsreihen eine analoge Zellzahl zu bestimmen. Hierfür wurde den mit Trypsin gelösten und anschließend in Medium resuspendierten Zellen 10 µl entnommen und in einem Verhältnis von 1 : 4 mit Trypanblau gemischt. Die Auszählung der lebenden Zellen erfolgte mittels der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Vitalität der Zellen ließ sich hierbei durch die Zugabe von Trypanblau abschätzen, da der Farbstoff die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren kann, jedoch das Zytoplasma toter Zellen blau färbt. Die Anzahl der Zellen errechnete sich aus dem Mittelwert der vier gezählten Quadranten und der Multiplikation mit 2×10^4 ((Zellzahl : 4) x 2×10^4), wodurch das Volumen der Neubauer-Zählkammer und die Verdünnung berücksichtigt wurde.

2.2.2. Apoptose-Assay mittels Durchflußzytometer

Für den Nachweis des Apoptosevorgangs boten sich verschiedene Methoden an. Sehr zuverlässig wie auch sicher reproduzierbar zeigte sich hierbei die Propidiumiodid-Färbung der Zellen mit anschließender Messung im Durchflußzytometer. Mit Hilfe dieses Verfahrens

Material und Methodik

lassen sich die unterschiedlichen DNA-Sequenzen in Hinblick auf normale oder apoptotische Zellen aufzeigen (Nicoletti et al., 1991).

Der Grundgedanke der Propidiumiodid Färbung zur Bestimmung der Apoptoserate lag in dem typischen Fragmentierungsmerkmal beim apoptotischem Zelltod. Bei dem allgemeinen Apoptosevorgang erfolgt ein Zerschneiden der chromosomalen DNA in kleine Bruchstücke von 180 Basepaaren oder ein mehrfaches davon. Diese entstehen durch enzymatische Verdauung der DNA zwischen den Histonproteinen. Bei der DNA-Färbung von apoptotischen Zellen wird ein DNA-Gehalt beobachtet, der sich geringer als bei normalen, in der G₁-Phase befindlichen Zellen darstellt. Man spricht hier von sub-G₁ Zellen.

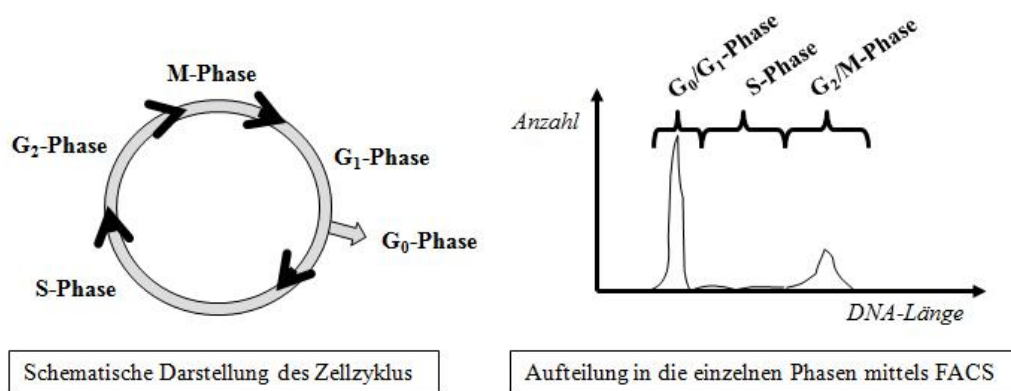


Abbildung 12: Die linke Grafik verdeutlicht den Ablauf des Zellzyklus mit seinen unterschiedlichen Phasen. Hierbei steht die S-Phase für aktive DNA-Synthese und Chromosomenverdopplung, die M-Phase für Mitose. Getrennt sind beide Phasen durch unterschiedlich lange G₁- und G₂-Phasen (= „Gap“-Phasen). Zellen können reversibel aus dem Zellzyklus in eine verlängerte Ruhephase übergehen (G₀-Phase) (z.B. Pfreundschuh et Schölmerich, 2000). Die rechte Grafik zeigt die Auswertung der DNA mittels Durchflußzytometrie (= FACS) nach Propidiumiodid-Anfärbung. Die linke Spitze enthält Zellen der G₁- und G₀-Phase, die rechte der G₂- und Mitose-Phase. Im Tal zwischen den Spitzen befinden sich Zellen der Synthese-Phase.

2.2.2.1. Apoptose Induktionsmethoden

Mit der oben beschriebenen Methode der Durchflußzytometrie untersuchten wir die Auswirkung der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf die Apoptose. Die Versuche wurden mit Hilfe der HepG2- und HT29-Zelllinien durchgeführt. Auch testeten wir die verwendeten Lösungsmittel der Farnesyltransferase-Inhibitoren, da in einige Studien für DMSO, Ethanol und Methanol ebenfalls eine Apoptose induzierende Wirkung dargestellt werden konnte.

Durch die Inkubation der Zellen mit anti-APO1 und Protein A im Vergleich zu den Farnesyltransferase-Inhibitoren konnte die Induktion der Apoptose über den CD95-Pfad

Material und Methodik

beobachtet und synergistische Effekte geprüft werden. Anti-APO1 stellt einen agonistisch wirkenden Antikörper des CD95-Rezeptors dar. Verstärkt wird die von anti-APO1 verursachte Apoptose-Induktion durch Protein A, ein Toxin, welches in der Lage ist, CD95-Rezeptoren untereinander zu verbinden. Die resultierende Nähe der Rezeptoren erleichtert dem CD95-Ligand, die Rezeptor Trimerisation auszulösen. Diese leitet den CD95-Signalweg ein. Im Rahmen der nachfolgend aufgeführten Versuche wurde das Protein A ausschließlich in einem Verhältnis von 1 : 100 zu anti-APO1 verwendet.

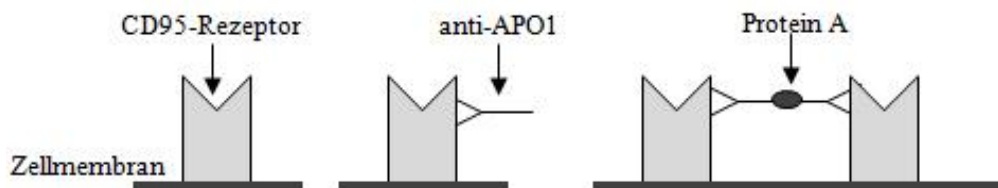


Abbildung 13: Darstellung des Wirkmechanismus von anti-APO1 und Protein A. Links ist der Rezeptor-CD95, lokalisiert auf der Zellmembran, dargestellt. In dem mittleren Bild zeigt sich das nicht verdrängende Bindungsverhalten von anti-APO1 an den Rezeptor. Die Zugabe von Protein A (rechte Grafik) verstärkt den Mechanismus. Über Vernetzung wird die benötigte Rezeptor Trimerisation hervorgerufen.

Die jeweilige Zelllinie wurde für die Stimulation in 6-well-Platten in einer Konzentration von ca. 100.000 Zellen pro well ausgesät und mit 2 ml Medium versetzt. Nach 2-3 Stunden waren die Zellen adhärent, so dass mit den entsprechenden Versuchsreihen begonnen werden konnte. Verglichen wurden unterschiedliche Konzentrationen des Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 mit einer aufsteigenden Konzentration von anti-APO1 in Kombination mit Protein A (Verhältnis 1 : 100). Zusätzlich erfolgte eine Inkubationsreihe mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Farnesyltransferase-Inhibitors als Kontrolle. Die jeweilige Stimulationsdauer betrug 24 h.

2.2.2.2. Propidiumiodid Färbung

Nach oben beschriebener 24 stündiger Stimulation erfolgte ein Abschaben der Zellen vom Plattenboden mit darauffolgender Zentrifugation der Zell-Medium-Suspension für 10 min bei 5000 Umdrehungen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl Nicoletti Puffer für 1 bis 4 Tagen unter Lichtschutz und bei 4° C inkubiert. Das in dem Puffer enthaltene Propidiumiodid ließ die Zellen durch hypotrophe Wirkung platzen. Die freiwerdende DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt (Nicoletti et al., 1991).

2.2.2.3. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Durch Anfärben der DNA mit dem fluoreszierenden Propidiumiodid lässt sich die Länge der DNA bestimmen. Je länger, sprich intakter die DNA, umso stärker ist die Fluoreszenz, die mittels Durchflußzytometer gemessen wird. Hierzu wird die in ein Proberöhrchen gegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit (dem Facs Puffer, eine isotone Kochsalzlösung) stark beschleunigt, wobei es zur Auftrennung von kleineren Zellaggregaten und zur Hintereinanderreihung der Zellen kommt. Am Analysepunkt trifft der fokussierte Lichtstrahl für den Bruchteil einer Sekunde auf die durchströmende Zelle, und die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mittels Spiegel- und Filtersystemen auf die verschiedenen Fotoverstärker geleitet. Die Anregungswellenlänge des luftgekühlten Argon-Lasers beträgt 488nm. Durch diese Methode lassen sich die unterschiedlichen DNA-Sequenzen in Hinblick auf normale oder apoptotische Zellen aufzeigen. Für unsere Versuchsreihen wurden die apoptotischen, sich in der sub-G1 Phase befindenden Zellen ausgezählt und verglichen.

2.2.2.4. Statistische Auswertung

Zur direkten Messung der Apoptose erfolgte die Quantifizierung der fraktionierten DNA wie oben beschrieben mittels Durchflußzytometer. Verglichen wurde jeweils ein Duplikat des gleichen Experiments. Die Resultate der Experimente wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel 2007 von Microsoft. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch mindestens 6 weitere Experimente. Die Signifikanz wurde mittels t-Test für gepaarte Stichproben berechnet, wobei ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant bezeichnet wurde.

2.2.3. Western Blot mit anschließendem Immunoblotting

Intrazellulär werden im Rahmen der CD95-Signalkaskade spezifische Caspasen durch Spaltung mit anschließender Zusammenlagerung aktiviert (s. Abb. 2). Hierbei stellt die kleine Untereinheit einen wichtigen Indikator dar. Diese aktive kleine Untereinheit wurde nach Inkubation mit Farnesyltransferase-Inhibitoren mittels Western Blot und Immunoblotting analysiert.

2.2.3.1. Stimulation der Zellen

Zur Stimulation der Zellen wurden zunächst die HepG2- und HT29-Zellen mit 5 ml RPMI-Vollmedium in 10 cm² Petrischalen ausgesät. Nachdem eine genügende Anzahl von Zellen gewachsen war, erfolgte die Behandlung nach folgendem Schema:

I.) Kontrolle:	keine Behandlung	
II.) anti-APO1:	anti-APO1 [$\mu\text{g/ml}$]:	1 $\mu\text{g/ml}$
	Protein A 1/100 [0,01g/l]:	0,01 $\mu\text{g/ml}$
III.) anti-APO1 + Ft-I:	anti-APO1 [$\mu\text{g/ml}$]:	1 $\mu\text{g/ml}$
	Protein A 1/100 [0,01g/l]:	0,01 $\mu\text{g/ml}$
	BMS-214662	10 μM
IV.) Ft-I:	BMS-214662	10 μM

Tabelle 4: Darstellung der vier unterschiedlichen Proben welche jeweils für einen spezifischen Farnesyltransferase-Inhibitor verwendet wurde mit dessen Konzentration.

Die Stimulation wurde über einen Zeitraum von 8 h durchgeführt. Zur Ernte wurden die adhärent gewachsenen Zellen auf Eis mit dem Scraper vom Boden der Schalen gelöst. Das Medium mit den frei schwimmenden Zellen wurde in 15 cm Falcons gegeben und bei 4° C für 5 min mit 1200 U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Absaugen des Überstands. Mit Hilfe eines Vortexers wuschen wir die Zellen in gekühltem 1 x PBS. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min bei 1200 U/min und 4° C konnte der Überstand entfernt werden, die Zellpellets wurden zur weiteren Verarbeitung mit flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20° C gelagert.

2.2.3.2. Isolierung der Proteine

Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in 100 µl Lysepuffers resuspendiert. Das zusätzliche Aussetzen der Zellen mit Ultraschall auf Stufe 3 über einen Zeitraum von 7 sec verbesserte ein Zerplatzen der Zellmembranen. Die folgende Zentrifugation bei 4° C mit 1300 U/min für 15 min trennte die im Zytosol enthaltenen Zellorganellen von den Zellkernen. Deren Bestandteile sammelten sich am Boden des Falcons an. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse, der im Zytosol gelösten Proteine, aufbewahrt.

2.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976)

Die Methode nach Bradford dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Diese gehen eine Bindung mit dem enthaltenen Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 ein, mit dem Ergebnis einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm.

Anhand des Vergleiches einer Standard-Proteinlösung mit der zu analysierenden Lösung erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Gemessen wurde die Absorption bei 595 nm. Der Proteinstandard stellte Rinderserum-Albumin (BSA) mit bekannter Konzentration dar. Die Erstellung einer Verdünnungsreihe basierte auf ausgewählten Konzentrationen an BSA, aufgefüllt auf 800 µl mit H₂O. Nach Zugabe von 200 µl Bradford Reagenz inkubierten die Proben bei Raumtemperatur für mindestens 2 min. Die nachfolgende Erstellung einer Eichgerade ermittelte Absorptionswerte, der Konzentrationen 2 µg/ml bis 22 µg/ml. Anhand der Standardkurve war eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben möglich. Das Volumen der Proben belief sich hierbei auf 2 µl. Die Behandlung erfolgte analog.

2.2.3.4. Das Gießen der Gele

Nach Vorbereitung des Gießstandes für die Gele, erfolgte die Zusammensetzung des 12,5 % SDS-Trenngels, das daraufhin zwischen zwei Glasplatten im Abstand von 1 mm gegossen wurde. Das in dem Trenngel-Ansatz enthaltene APS 10 % und TEMED verursachte die Polymerisation. Für eine glatte Oberfläche sorgte die Überschichtung der Gele mit ca. 1 ml Dimethylethan. Der Rest der Kammer wurde mit H₂O aufgefüllt. Nach ca. 30 min trat die Polymerisation des Trenngels ein, woraufhin der Überstand dekantiert wurde.

Daraufhin wurde das Trenngel mit dem hergestellten Sammelgel-Ansatz bis zum oberen Rand der Kammer überschichtet. Die Ausbildung der Taschen für die Proben erfolgte mittels, in das noch flüssige Gel eingesetzter, Käbme. Um etwaige Salzurückstände nach Auspolymerisation zu beseitigen, wurden die Gele gründlich mit Wasser gewaschen.

2.2.3.5. SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anhand der Gel-Elektrophorese werden die Proteinmischungen nach den Molekulargewichten analysiert. Zur Vermeidung eines Überwiegens einzelner Aminosäureladungen wird die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) verwendet. Die Proteine binden durch das SDS so viele negative Ladungen, dass einzelne Ladungen nicht mehr ins Gewicht fallen. Als Ergebnis entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnissen. Diese vergleichbaren hydrodynamischen Eigenschaften unterschiedlich großer Proteine können nun mittels Elektrophorese analysiert werden. Durch die negativen Ladungen wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol und werden dabei mit Hilfe des Molekularsiebeffektes einer porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Massengewicht getrennt. Verstärkt wird der Effekt durch zwei weitere Eigenschaften des SDS. Als Detergens denaturiert SDS die Proteine und kann über seinen unpolaren Molekülteil mit den unpolaren Seitenketten der Proteine in Wechselwirkung treten, so dass ein Ausbilden von Wechselwirkungen unter den Proteinen ausbleibt.

Eine weitere Optimierung des Systems wurde durch die pH- Differenz zwischen Trenngel und Sammelgel um zwei Einheiten bewirkt. In Abhängigkeit zu den Laufeigenschaften des eingesetzten Glycinats und der im Sammelgel und Trenngel enthaltenen Chlorid-Ionen wird eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel erreicht.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden zwei SDS-Gele in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit dem Laufpuffer 1 x Western Running gefüllt. Zu 50 µg Protein der zu analysierenden Probe war 1/3 5 x Lade zugesetzt worden. Nach Erhitzen der Proben für 10 min bei 70°C erfolgte die Beladung der einzelnen Taschen des SDS Gels. Als Größenmarker wurde ein Proteingemisch aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung ereignete sich bei einer Ladung von 150 V. Nach ca. 60 min war der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau am Ende des Trenngels herausgelaufen und somit die Elektrophorese abgeschlossen.

2.2.3.6. Western Blot

Um die Proteine nach der Elektrophorese, spezifischen, immunochemischen Reaktionen zu unterziehen, mussten diese aus dem SDS-Gel heraus mobilisiert werden. Hierzu wurde das Verfahren des Western Blots verwendet, bei dem die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden.

Dazu wurde die 9 x 7,5 cm große PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran 30 sec in Methanol gelegt, anschließend mit H₂O abgespült und für einige Minuten im Transfer-Puffer äquilibriert. Eine genügende Anzahl von Schwämmen und Filterpapieren wurde ebenfalls mit dem Puffer getränkt. Der Aufbau des Blot-Systems erfolgte durch das Aufeinanderlegen der einzelnen Bestandteile nach folgendem Schema: zwei Schwämme, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und wiederum zwei Schwämme. Anschließend wurde dieses Gel-Membran-Sandwich in eine Halterung eingespannt und in die mit Blotpuffer, bestehend aus 60 ml 1 x Towbin, 120 ml Methanol [20 %] und 600 ml H₂O, gefüllte Blotkammer gehängt. Damit die Übertragung der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran gelang, wurde das Gel in der Blotkammer zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet und für 60 min an einen Strom mit 60 V angeschlossen.

2.2.3.7. Blocken der Membran und anschließendem Immunoblotting

Die Behandlung der geblotteten, auf der Oberfläche der Membran fixierten Proteine, mit spezifischen Antikörpern, dient der Identifizierung der Proteine. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran mit Blockierungspuffer, 5 % Magermilch in TBS plus 1 ml Tween [20 %] (=TBST), für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der primäre Antikörper wurde dann, in Blockierungspuffer verdünnt, zugegeben und die PVDF-Membran für weitere 60 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper erfolgte ein Waschen der Membran für 3 x 5 min in TBST. Die Zugabe des sekundären Antikörpers fand ebenfalls verdünnt im Blockierungspuffer über einen Zeitraum von 60 min bei leichtem Schwenken statt. Der zweite Antikörper stellt ein Meerrettich Peroxidase (HRP-) konjugiertes Immunglobulin dar. Nach der erneuten Durchführung von 3 Waschrufen konnten die Proteine detektiert werden. Bei jedem der einzelnen Vorgänge wäre ebenfalls eine Behandlung über Nacht bei 4° C möglich gewesen.

Material und Methodik

Als ersten Antikörper wurde der Flice (Caspase 8) Antikörper mit einer 1: 20 Verdünnung bzw. anti-Caspase 3 (1: 1500) in Verbindung mit dem zweiten Antikörper anti-mouse (1: 5000) bzw. anti-rabbit (1: 200) verwendet. Um die Mengen aufgetragenen Proteins vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin, einem in Eukaryonten ubiquitär vorkommenden Protein des Zytoskeletts, inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde wiederum anti-mouse verwendet.

Spezifität	Bindungsorte	Herkunft	Endkonzentration
Caspase 8	aktive Untereinheit 11-kD	Maus	1: 20
Caspase 3	aktive Untereinheit 17-kD	Hase	1: 1500
β -Aktin	45-kD	Maus	

Tabelle 5: Diese Tabelle veranschaulicht die in unseren Versuchen verwendeten Antikörper mit ihren Merkmalen sowie deren Herkunft.

2.2.3.8. Detektion der membrangebundenen Proteine

Zur Detektion wurde der „Enhanced Chemi Luminescence Kit“ von Amersham Biosciences verwendet. Das Grundprinzip liegt hierbei in der Oxidation von Luminol in alkalischen Bedingungen mit Hilfe des Enzyms Meerrettich Peroxidase, welches gebunden an dem 2. Antikörper vorliegt. Während der Oxidation erfolgt die Anhebung des Luminols auf ein erhöhtes instabiles Energieniveau. Bei der Rückkehr in die stabile Ausgangslage wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Dieses freiwerdende Licht wird in seiner Intensität durch Verwendung eines Phenols verstärkt.

Die Membranen wurden vor der Detektion so lang auf Filterpapier gelegt, dass sie noch leicht feucht waren. Dann erfolgte die Überdeckung der proteingebundenen Seite der Membranen mit der Mischung der beiden ECL Lösungen, welche das Luminol und Phenol enthalten, mit jeweils 1 ml. Nach 1 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran nochmals auf Filterpapier zum Entfernen des restlichen ECL gelegt. Nach Einschweißen der Membran in Folie fand dann die Detektion des Lichtsignals mit dem HyperfilmTM ECL Röntgenfilm in einer Röntgenkassette statt. Anschließend musste der Film zur Aufzeichnung der Proteine nur noch entwickelt werden.

2.2.3.9. Stripping

Nachdem die Membran mit dem Antikörper gegen Caspase 8 behandelt wurde, kann die gleiche Membran nach Entfernung (Stripping) der Antikörper neu untersucht werden.

Hierzu erfolgte die 30-minütige Inkubation der Membran in 50° C warmen Stripping-Puffer bei leichtem Schwenken. Anschließend wurde die Membran zwei Mal in TBST-Puffer für 10 min auf dem Kreisrüttler gewaschen und erneut im Blockierungspuffer für 30 min behandelt. Die Hybridisierung mit weiteren Antikörpern ereignete sich nach oben beschriebenem Immunoblotting Protokoll.

2.2.4. Die Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion spielt eine wichtige Rolle in der Molekularbiologie, anhand derer selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden (Mullis et al., 1986; Mullis et Faloon, 1987; Saiki et al., 1985). Wir wählten diese Methode zur Untersuchung der Einflussnahme der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf den CD95-Rezeptor und CD95-Ligand. Beispielsweise konnten bereits mehrere Versuche an Tumorzellen belegen, dass der Einsatz von Chemotherapeutika eine Induktion der CD95-Rezeptor Expression hervorruft (Friesen et al., 1996; Fulda et al., 2000; Herr et al., 1997; Razzaque et al., 1999).

2.2.4.1. Zellbehandlung

Der Versuchsaufbau erfolgte dahingehend, dass die Zellen mit unterschiedlicher Konzentration an Farnesyltransferase-Inhibitoren behandelt und die synthetisierte mRNA-Menge gemessen wurde.

Im Einzelnen wurden die HepG2- und HT29-Zellen in 10 cm² Petrischalen mit 5 ml RPMI-Vollmedium ausgesät. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen an SCH66336 bzw. BMS-214662. Zu Kontrollzwecken wurde das Lösungsmittel mit der höchsten Konzentration gewählt, in der das Medikament gelöst vorlag.

a) Stimulation von HT29 und HepG2 mit BMS-214662:

Die verwendeten Konzentrationen an BMS-214662 betragen 0; 0,1; 0,5; 1; 10 und 100 μM . Als Kontrolle wurde 500 μl einer Mischung aus DMSO mit Aqua bidest im Verhältnis 1 : 50 zu den Zellen gegeben.

b) Stimulation von HT29 und HepG2 mit SCH66336:

Für die Stimulation mit SCH66336 wurden die Konzentrationen 5; 10; 15; 20 und 25 μM SCH66336 gewählt. Die Stimulation der Kontrollzellen erfolgte mit 25 μl Methanol.

2.2.4.2. Zellgewinnung

Zum Lösen der Zellen wurde zuerst das RPMI-Vollmedium aspiriert und anschließend die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS lösten wir die Zellen mit 1 ml Trypsin vom Boden der Petrischalen und resuspendierten diese in RPMI-Vollmedium. Anschließend wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min der Überstand verworfen und das Zellpellet in ein Eppendorf Tube zur weiteren Behandlung überführt.

2.2.4.3. RNA-Isolation

Mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von Qiagen und dessen Herstelleranweisungen führten wir die RNA-Isolation durch. Hierbei stellt die RNeasy Methode eine Technik dar, welche die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikon-Gel-basierten Membran mit der Geschwindigkeit der Mikrospin Technologie verbindet. Die Zentrifugation führten wir mittels einer Tischzentrifuge durch. Die Zellpellets wurden zuerst in Gegenwart eines stark denaturierenden Guanidin Isothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffers (Buffer RLT) lysiert. Das Guanidinsalz bewirkte eine sofortige Inaktivierung der RNase, wodurch eine Isolierung intakter RNA gewährleistet war. Bei einer Zellzahl von $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ gaben wir 600 μl des Buffer RLT hinzu. Das Homogenisieren der Zellsuspension erfolgte durch ein mehrmaliges Pipetieren unter Verwendung von Insulinspritzen. Optimale Bindungsverhältnisse wurden durch Zugabe von 600 μl Ethanol erreicht. Im Anschluss wurden die Proben in das RNeasy mini column gegeben und für 15 sec mit 10.000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang ermöglichte die Bindung der gesamten RNA an die Membran des RNeasy mini column's.

Kontaminationen wurden anschließend in einem dreifachen Waschvorgang weggespült. Hierbei gaben wir zuerst 700 µl Buffer RW1, danach jeweils 500 µl Buffer RPE hinzu. Bei den ersten beiden Schritten wurde eine anschließende Zentrifugation von 15 sec bei 10.000 U/min durchgeführt. In einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 U/min trocknete die Membran abschließend. Die RNA wurde durch Gabe von RNase-freiem Wasser mit nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 U/min von der Membran gelöst. Die hierbei verwendete Gesamtmenge von 100 µl RNase-freiem Wasser teilte sich in 30 µl und 20 µl auf.

2.2.4.4. RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierzu wurde zur Quantifizierung der RNA 4 µl gewonnene RNA in 796 µl Aqua bidest verdünnt. Anschließend bestimmten wir mit dem Photometer die Extinktionen und dadurch die Konzentration der einzelnen Proben gegen das Referenzmedium Wasser. Das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} dient hierbei zur Darstellung der Qualität der RNA-Extraktion. Die Ratio für reine RNA beträgt 1,9.

2.2.4.5. RT-Reverse Transkriptase

Die weitere Analyse bedurfte einer Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA). Hierzu gaben wir anhand der photometrisch bestimmten Konzentrationen zu jeweils 2 µg RNA 0,5 µl RNA-Inhibitor hinzu, was eine Hemmung der ubiquitär vorkommende RNase in ihrer Aktivität gewährleistet. Andernfalls baut sich die gewonnene RNA leicht enzymatisch ab. Um die gleiche Menge an Proben zu erhalten, wurden diese mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach Erhitzung auf 65° C über einen Zeitraum von 10 Minuten erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA mittels dem Enzym M-MLV Reverse Transkriptase (RT), von dem 1 µl in den Mastermix hinzugegeben wurde. Zusätzlich enthielt der Mastermix 4 µl MMLV-RT-Puffer (= First Strand Buffer), 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl 2,5 mM dNTP-Mix und 4 µl 20 µM Primer-Poly-A (dT₁₅). Diese 15 µl Mastermix wurden zu den Proben pipettiert. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation der Templates bei 37° C, welches das Arbeitsoptimum für das transkribierende Enzym M-MLV RT darstellt. Beendet wird die RT-

Reverse Transkriptase durch ein kurzes Erhitzen der Proben auf 65° C für 10 min, wodurch das Enzym denaturiert wird. Im Anschluss wurden die Proben auf 4° C zur weiteren Lagerung runtergekühlt.

2.2.4.6. RT-PCR

Die neu synthetisierte cDNA wurde anschließend als Template für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Zu 5 µl an RT-Produkt wurde 45 l Mastermix hinzugegeben. Dies wurde so gewählt, da nicht mehr als 1/5 des RT-Produkts verwendet werden sollte.

Der Mastermix enthielt die Primer CD95 und CD95L, welche an denjenigen Abschnitten binden, die spezifisch untersucht werden sollten. Als Referenzwert wurde ein Primer für GAPDH, ein ubiquitär vorkommendes Enzym, bzw. β-Aktin verwendet. Es wurden je 1 µl der zwei Arten des jeweiligen Primers benützt, da unterschiedliche Bindungsmechanismen an den zwei Einzelsträngen der DNA existieren. Auf diese Weise stellten wir sicher, dass sowohl am downstream- als auch am upstream-Strang der DNA die Primer binden konnten. Zur weiteren Verlängerung der abzulesenden Abschnitten wurde 1 µl an einem 2,5mM Oligonukleotid Mix (dNTP Mix) sowie 0,25 µl Taq-Polymerase in den Mastermix hinzugegeben. Für ein geeignetes Milieu sorgte 5 µl PCR-Puffer. Zu diesen Bestandteilen wurden 36,75 µl RNase-freies Wasser pipettiert, wodurch 45 µl Mastermix entstand. Als negativ Kontrolle zum Ausschluss von Verunreinigungen erfolgte die Anfertigung einer Probe aus 45 µl Mastermix und 5 µl RNase-freiem Wasser.

Im Allgemeinen lässt sich das PCR-Programm in drei Schritte aufteilen, in den Denaturierungsschritt, den Annealingschritt und den Elongationsschritt. Die Denaturierung erfolgte für 1 min bei 95° C. Hier trennten sich die beiden Stränge der Template-DNA. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 58° C für 30 sec gesenkt um die Hybridisierung zu ermöglichen. Die im massiven Überschuss vorkommenden Oligonucleotidprimer banden in dieser Phase an den einzelsträngigen Template-DNAs. Danach wurde die Temperatur auf 72° C für 1 min angehoben, welches für die Taq-Polymerase das Temperaturoptimum darstellte. Im Elongationsschritt wurde der Primer verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag, die der ursprünglichen Template-DNA exakt glich. Die Komplementierung lief an beiden Strängen der Template-DNA ab, insofern betrug die Zahl der Template-DNAs nach einem Zyklus das (nahezu) Doppelte. Die Wiederholung des Zyklus ergab dann die vierfache

Menge. Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 95° C folgten insgesamt vierunddreißig Zyklen. Im Anschluss wurde auf 4° C runtergekühlt.

2.2.4.7. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Dies geschah in 1 % Agarose-Gelen, hergestellt aus 3 g Agarose und 150 ml 0,5 x TBE, welches durch Aufkochen in der Mikrowelle in Lösung ging. Dieser Vorgang dauerte ca. 2 min, während dessen mehrmals geschwenkt wurde. Im Anschluss wurden 2 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in den waagrechten Gelschlitten gegossen. Ein Kamm diente zur Ausbildung der Taschen für die Templates während der einstündigen Polymerisation. Nach Verfestigung des Gels wurden die DNA-Proben in die Geltaschen eingefüllt. Um ein Absinken der Proben in die Taschen zu ermöglichen, vermischten wir 10 ml Template mit 2 µl Loading Dye. Insgesamt wurden 10 µl der Mischung in die Taschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 1 h in 0,5 x TBE-Laufpuffer. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkalierte während der Elektrophorese mit der Nukleinsäure unserer Proben. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht (315 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so dass wir das Ergebnis der Elektrophorese fotografisch dokumentieren konnten. Die Länge der DNA-Fragmente verglichen wir mit einem DNA-Marker (5 µl Gen ruler mit 100 Bp), der ebenfalls auf das Gel aufgetragen worden war.

3. Ergebnisse

3.1. Farnesyltransferase-Inhibitoren induzieren Apoptose in Hepatom- bzw. Kolonkarzinom-Zellen

Zunächst untersuchten wir über 24 h ein generelles Ansprechen der Hepatomzelllinie HT29 sowie der Kolonkarzinomzelllinie HepG2 auf die Inkubation mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336. Nach Auswertung mittels Durchflußzytometer präsentierte sich als Ergebnis ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen.

Die Abbildung 14 zeigt hierbei ein typisches Bild einer Apoptoseinduktion von HepG2-Zellen, die mit Farnesyltransferase-Inhibitoren inkubiert wurden. Stimuliert wurden jeweils 100.000 Zellen in 6-well Platten mit 50 $\mu\text{M/ml}$ BMS-214662 bzw. 50 $\mu\text{M/ml}$ SCH66336 und DMSO zur Kontrolle über 24 h. Das FACScan Histogramm zeigt die Zellzahl (counts) vs. DNA-Gehalt (FL2-H = Fluorescence in log). Im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt sich ein sub-G1 Peak (in der Abbildung mit M1 bezeichnet) bei den mit Farnesyltransferase-Inhibitoren behandelten Zellen darstellen. So wurde unter Verwendung von 50 μM BMS-214662 ein Anteil von 29,69 %, für 50 μM SCH66336 14,11 % an apoptotischen Zellen gewonnen. Die Inkubation mit dem Lösungsmittel erbrachte keinen nennenswerten, detektierbaren Ausschlag (2,19 %). Falsch positive Werte, welche durch eine zusätzliche apoptotische Wirkung des Lösungsmittels entstehen, können demnach vernachlässigt werden.

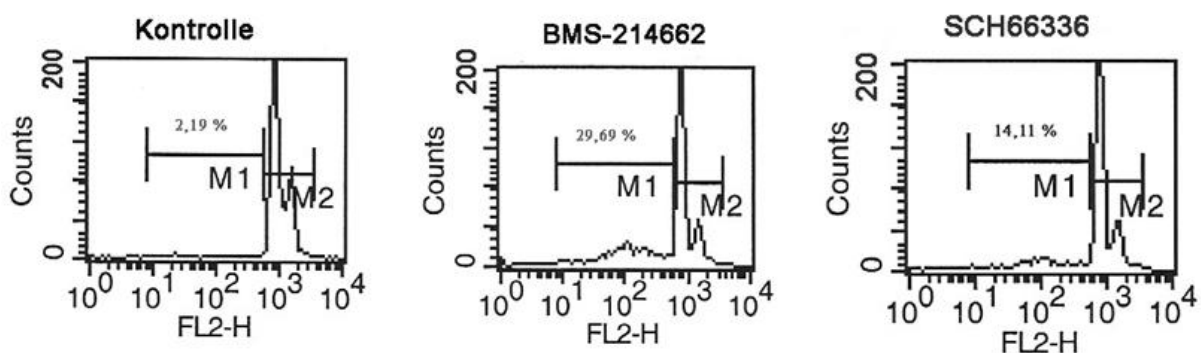


Abbildung 14: Apoptoseinduktion bei HepG2 Zellen durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 (10 $\mu\text{M/ml}$) und SCH66336 (50 $\mu\text{M/ml}$). In der Kontrolle erfolgte die Stimulation der Zellen mit Lösungsmittel DMSO über jeweils 24 h. Das FACScan Histogramm zeigt die Zellzahl (counts) vs. DNA-Gehalt (FL2-H). Die verschiedenen Zellzyklusphasen sind mit M2, die fragmentierten Zellen mit M1 bezeichnet. Deutlich lässt sich der M1 Anstieg zwischen der Kontrollgruppe und der mit Farnesyltransferase-Inhibitoren behandelten Zellen darstellen. Dies veranschaulicht die Zunahme der apoptotischen Zellen, BMS-214662: 29,69 % und SCH66336: 14,11 % im Vergleich zur Kontrolle mit 2,19 %.

3.1.1. Die Induktion der Apoptose durch Farnesyltransferase-Inhibitoren ist dosisabhängig

Nach Detektion einer Apoptose durch eine Inkubation mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 über 24 h überprüften wir unterschiedliche Konzentrationen. So wurden die HepG2-Zellen und HT29-Zellen mit 1 und 10 μM BMS-214662 sowie 25 und 50 μM SCH66336 behandelt. Als Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet.

Als Ergebnis präsentierte sich nach Auszählung mit dem Durchflußzytometer in den HepG2-Zellen nach Gabe von 1 μM BMS-214662 eine Apoptoserate von $3,3 \% \pm 0,67$. Eine Konzentrationserhöhung auf 10 μM BMS-214662 löste einen Anstieg der Apoptose auf $41,7 \% \pm 2,72$ aus. Die Kontrolle mit DMSO ließ die Apoptoserate auf $1,2 \% \pm 0,33$ ansteigen. Ein geringfügiges besseres Ansprechen zeigten die HT29-Zellen. Eine Apoptose konnte bei $7,2 \% \pm 4,66$ der Zellen unter Inkubation von 1 μM BMS-214662 gemessen werden. Durch Gabe von 10 μM BMS-214662 stieg die Zahl auf $27,7 \% \pm 7,66$ an. Die Kontrolle mit 10 μl Ethanol erbrachte Werte von $2,4 \% \pm 0,71$.

Die Verwendung von SCH66336 präsentierte ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gabe von 25 μM SCH66336 erreichte $12,4 \% \pm 2,49$ an apoptotischen HepG2-Zellen. Eine Erhöhung auf $14,7 \% \pm 0,76$ konnte durch 50 μM SCH66336 erzielt werden. Die Kontrolle mit 1 μM Methanol ließ die Apoptoserate der Hepatomzellen auf $8,5 \% \pm 0,76$ ansteigen. Ähnlich verhielt es sich in der HT29-Zelllinie. So erreichte 25 μM eine Apoptoserate von $12,4 \% \pm 2,49$, 50 μM SCH66336 $13,8 \% \pm 0,73$. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte 1 μl Methanol in $2 \% \pm 0,20$ der HT29-Zellen eine Apoptose auslösen.

Zusammenfassend bedingt die Behandlung sowohl mit BMS-214662 als auch mit SCH66336 einen Anstieg der Apoptoserate. Ein deutlicher Unterschied liegt hingegen in der benötigten Konzentration des jeweiligen Farnesyltransferase-Inhibitors. So löste bereits 1 μM BMS-214662 in den HT29-Zellen eine Apoptoserate von $7,2 \%$ aus. Die Verwendung von 10 μM BMS-214662 ließ gar die Apoptose auf $27,7 \%$ ansteigen. Wohingegen die Verwendung von 25 bzw. 50 μM SCH66336 einen Anstieg auf 12,4 und 13,8 $\%$ erzielte (siehe Abbildung 15). Unsere nachfolgenden Versuche stützten sich auf diese Ergebnisse. So wurden stets niedrigere Dosierungen an BMS-214662 im Vergleich zu SCH66336 gewählt.

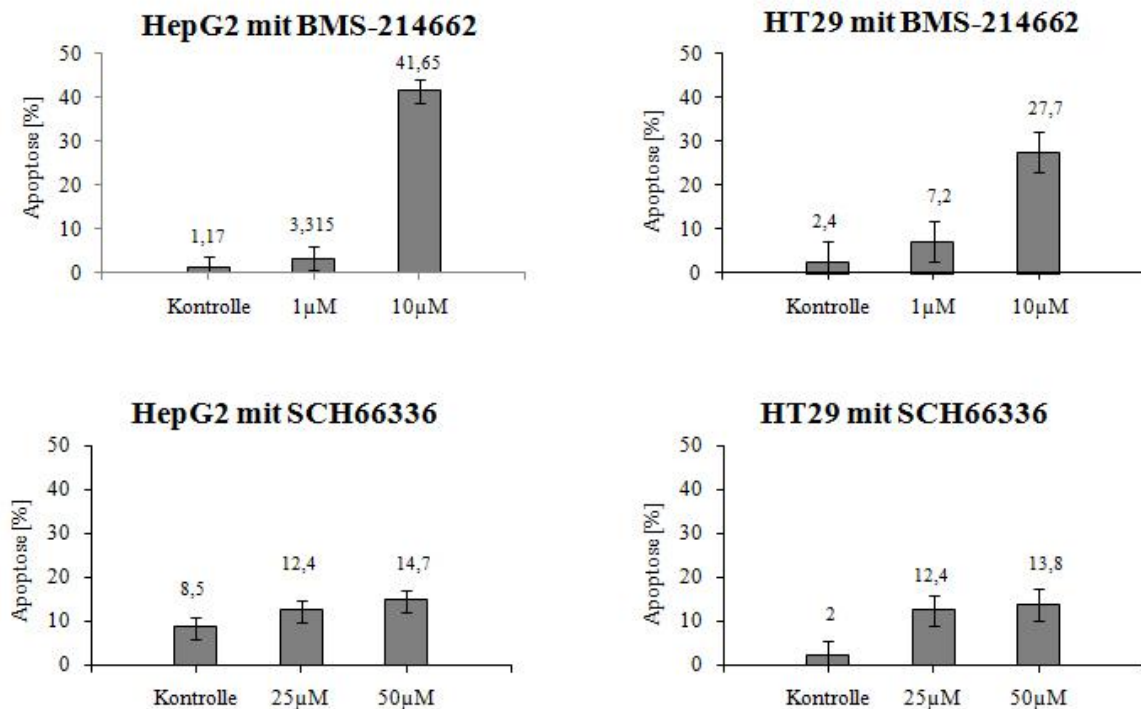


Abbildung 15: Die Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 verursachen einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe (BMS-214662: 0µM 1,2%, 1µM 3,3%, 10µM 41,7% (HepG2-Zellen), 0µM 2,4%, 1µM 2,4%, 10µM 27,7% (HT29-Zellen); SCH66336: 0µM 8,5%, 25µM 12,4%; 50µM 14,7% (HepG2-Zellen), 0µM 2%, 25µM 12,4%, 50µM 13,8% (HT29-Zellen)). Erkennbar ist zudem der unterschiedliche Wirkungsgrad der Farnesyltransferase-Inhibitoren, indem die relativ niedrige Konzentration von 10 µM BMS-214662 mehr apoptotische Zellen auslöst als die relativ hohe Konzentration von 50 µM SCH66336. Die Auszählung der Konzentration erfolgte mittels Durchflußzytometrie nach 24 h Inkubation der HepG2 bzw. HT29-Zelllinien. Die Ergebnisse sind mit der jeweils größten Standardabweichung [±] dargestellt.

3.1.2. Farnesyltransferase-Inhibitoren beeinflussen den CD95-Signalweg

Nach Darstellung einer Apoptose-Induktion durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren untersuchten wir eine mögliche Beeinflussung des CD95-Signalwegs. Wir wählten diesen Signalweg, da viele Chemotherapeutika (z. B. Bleomycin, Cisplatin, Methotrexat) in der Lage sind Apoptose über den CD95-Signalweg zu vermitteln. Dies wird durch eine Hochregulierung des CD95-Liganden verursacht (Muller et al., 1997).

Ergebnisse

Hierzu erfolgte neben der Inkubation mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 (1 und 10 μM) und SCH66336 (25 μM) die Gabe von einer aufsteigenden Konzentration an anti-APO1 in Verbindung mit Protein A (Verhältnis 1:100). Der Antikörper anti-APO1 wurde auf Grund des agonistischen Wirkmechanismus auf den CD95-Rezeptor verwendet.

Zunächst betrachteten wir die 24 stündige Inkubation der HepG2-Zellen mit 10 μM BMS-214662. Die Ergebnisse zeigten signifikant erniedrigte Apoptosewerte der Kontrollgruppe (10 μl Ethanol) im Vergleich zu 10 μM BMS-214662 unter Verwendung von 0 ng/ml anti-APO1 (1,17 % \pm 0,33 vs. 65 % \pm 2,72 -p = 0,001), 50 ng/ml anti-APO1 (26,81 % \pm 3,21 vs. 49,6 % \pm 0,81 -p = 0,001) sowie 200 ng/ml anti-APO1 (25,41 % \pm 2,98 vs. 46,66 % \pm 2,31 -p = 0,001) Keine signifikanten Apoptose-Anstiege wurden unter Inkubation mit 1 μM BMS-214662 vergleichend zur Kontrollgruppe dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe des t-Tests für 1 bzw. 10 μM BMS-214662 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Errechnung der Differenz ergab sich für die Menge von 1 μM : $t = \sqrt{6} (2,855 : 3,8634) = 1,8101$; für 10 μM : $t = \sqrt{6} (26,459 : 7,1818) = 9,0243$. Da $t (0,95 ; 5) = 2,571$ war die Induktion der Apoptose in den HepG2-Zellen durch Verwendung von 10 μM BMS-214662 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Unter Verwendung der Kolon-Karzinomzelllinie HT29 präsentierte bereits 1 μM BMS-214662 eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 10 μl Ethanol in Kombination mit 0 ng/ml anti-APO1 (7,15 % \pm 4,66 vs. 2,39 % \pm 0,71 -p = 0,001), 50 ng/ml anti-APO1 (35,74 % \pm 1,19 vs. 22,73 % \pm 0,88 -p = 0,001) bzw. 200 ng/ml anti-APO1 (42,68 % \pm 3,33 vs. 25,01 % \pm 3,37 -p = 0,001). Auch die Inkubation mit 10 μM BMS-214662 konnte eine signifikant höhere Apoptose auslösen vergleichend zur Kontrolle unabhängig von der anti-APO1-Gabe. Im einzelnen erzielte 0 ng/ml anti-APO1: 27,67 % \pm 7,66 vs. 2,39 % \pm 0,71 -p = 0,001; 50 ng/ml anti-APO1: 67,84 % \pm 3,08 vs. 22,73 % \pm 0,88 -p = 0,001; bzw. 200 ng/ml anti-APO1: 59,14 % \pm 0,52 vs. 25,01 % \pm 3,37 -p = 0,001. Die jeweiligen Berechnungen lauteten $t [1 \mu\text{M}] = \sqrt{6} (12,3058 : 4,3071) = 6,9980$ bzw. $t [10 \mu\text{M}] = \sqrt{6} (34,8975 : 6,4268) = 13,3007$.

Der Einsatz des Farnesyltransferase-Inhibitors SCH66336 zeigte in den HepG2-Zellen nur einen sehr geringen Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für letzteres wurde das Lösungsmittel Methanol herangezogen. Nach Berechnung konnte auch keine Signifikanz in der Erhöhung der Apoptoserate durch Gabe von 25 μM SCH66336 verifiziert werden: $t = \sqrt{6} (0,8875 : 3,1045) = 0,7002$. Dies war unabhängig zur verwendeten anti-APO1 Menge.

Ergebnisse

Im Gegensatz hierzu fand sich in den HepG2-Zellen jedoch ein signifikant erhöhten Werte an der erzielten Apoptose nach Inkubation mit SCH66336 ($t = \sqrt{6} (13,1608 : 3,6727) = 8,7775$). Im einzelnen war die Apoptoserate unter Verwendung von 0 ng/ml anti-APO1 bei der Kontrolle mit 1 µl Methanol niedriger als vergleichsweise mit 25 µM SCH66336 ($2,04 \% \pm 0,20$ vs. $12,35 \% \pm 3,50$ - $p = 0,001$). Ein ähnliches Ergebnis präsentierte auch die zusätzliche Inkubation mit 50 ng/ml anti-APO1 ($9,53 \% \pm 1,21$ vs. $21,07 \% \pm 5,01$ - $p = 0,001$) bzw. die Verwendung von 200 ng/ml anti-APO1 ($17,33 \% \pm 4,70$ vs. $32,41 \% \pm 1,49$ - $p = 0,001$).

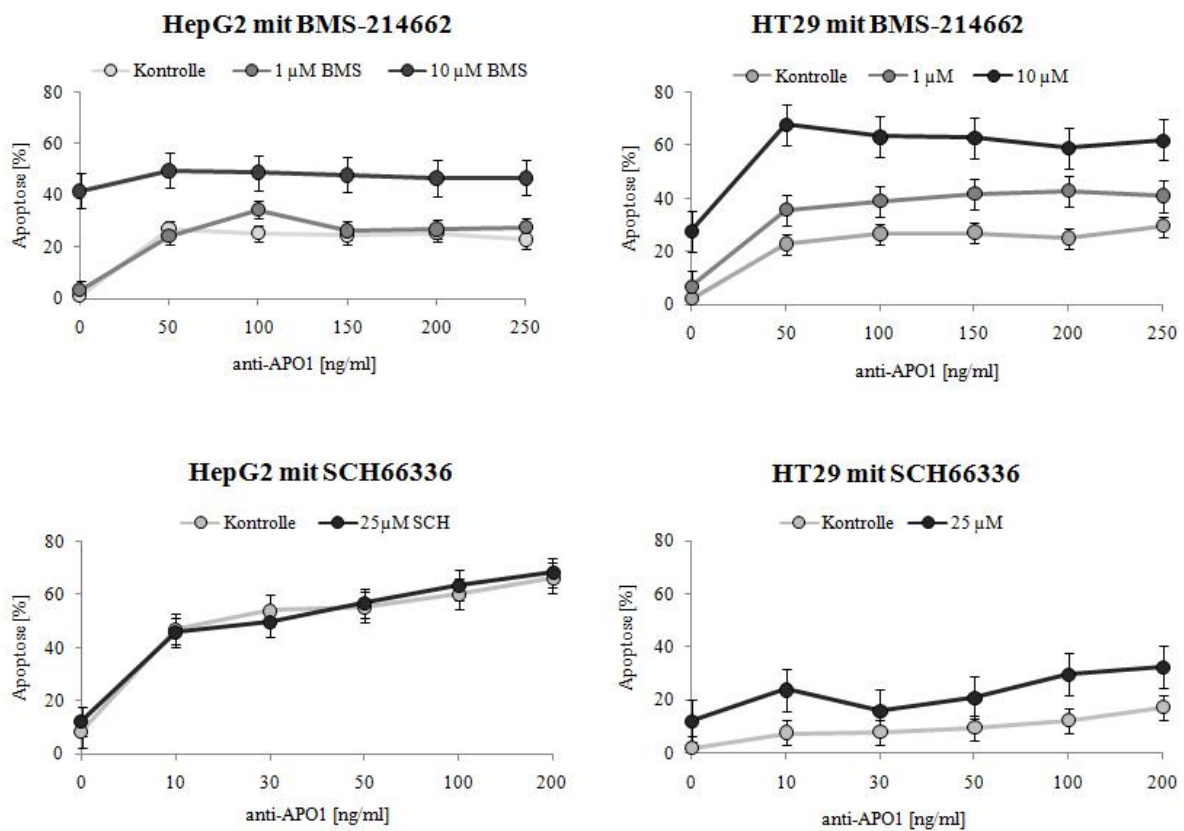


Abbildung 16: Erhöhung der Apoptoserate durch BMS-214662 und SCH66336 in Verbindung mit anti-APO1 und Protein A in Abhängigkeit der Konzentration. Darstellung der Apoptoserate an den HepG2- und HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren. Als Kontrolle wurde Ethanol, DMSO bzw. Methanol verwendet. Der Fehlerindikator ist die jeweils größte Standardabweichung pro Versuchsreihe. Als Ergebnis präsentiert sich ein signifikanter Anstieg der Apoptose in den HepG2-Zellen unter 10 µM BMS-214662. Für die HT29-Zelllinie zeigt sich sowohl für 1 µM und 10 µM BMS-214662 als auch für 25 µM SCH66336 ein signifikant erhöhter Apoptose-Wert vergleichend zur Kontrollgruppe.

3.1.3. Eine geringe Zell-Sensibilisierung durch BMS-214662 ist nachweisbar

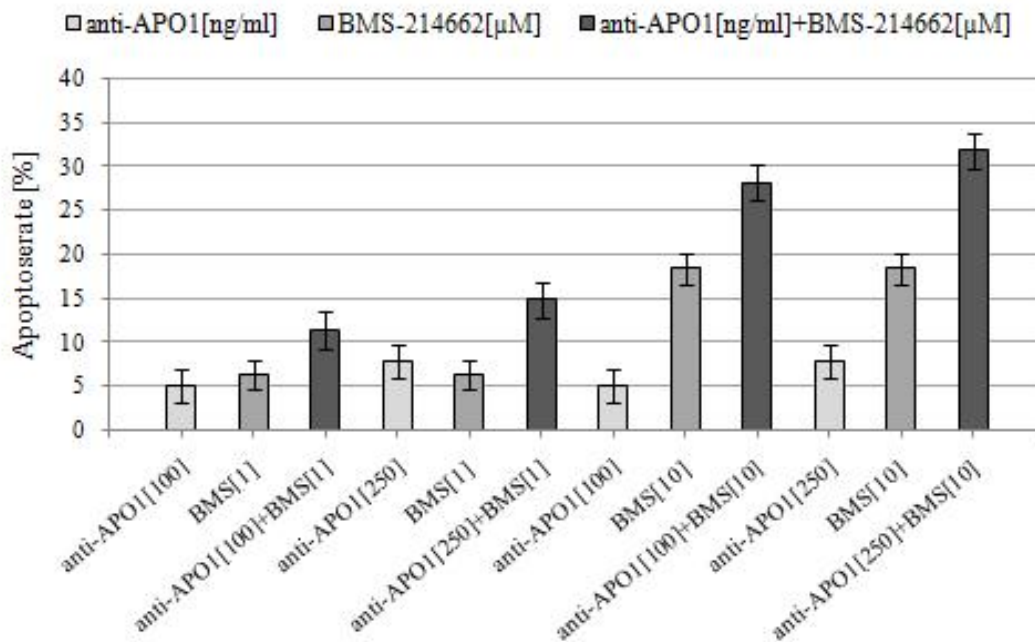
Zudem untersuchten wir in unseren Versuchsreihen einen möglichen Sensibilisierungseffekt zwischen den Farnesyltransferase-Inhibitoren und dem Antikörper anti-APO1 in Kombination mit Protein A.

Nach Auswertung der Ergebnisse ließ sich ein synergistischer Effekt unter Verwendung von BMS-214662 vermuten. Eine Signifikanz konnte allerdings nach Berechnung aller Proben mit Hilfe des t-Tests nicht dargestellt werden. So ergaben sich für die jeweilige BMS-214662-Konzentration die Werte $t [1 \mu\text{M}] = \sqrt{5} (0,938 : 1,3367) = 1,5691$ und $t [10 \mu\text{M}] = \sqrt{5} (0,595 : 4,3445) = 0,3062$. Da $t (0,95; 4) = 2,132$ waren die Ergebnisse als nicht signifikant zu werten. Einzig durch Verabreichung von $10 \mu\text{M}$ BMS-214662 in Verbindung mit 100 und 250 ng/ml anti-APO1 konnte sowohl in den HepG2- als auch den HT29-Zellen ein signifikanter synergistischer Effekt errechnet werden: $\sqrt{2} (5,1925 : 0,5621) = 13,064$; $t (0,95; 1) = 12,706$. So löste in den HepG-Zellen die Verwendung von 100 ng/ml anti-APO1 mit $10 \mu\text{M}$ BMS-214662 im Vergleich zu deren Summe ($28,185 \% \pm 1,85$ v.s. $23,39 \% \pm 1,87$ ($4,995 \% + 18,395 \%$) - $p = 0,001$) eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate aus. Ähnlich errechnete sich dies für $10 \mu\text{M}$ BMS-214662 bei gleichzeitiger Gabe von 250 ng/ml anti-APO1 ($31,815 \% \pm 1,20$ vs. $26,225 \% \pm 0,82$ ($18,395 \% + 7,83 \%$) - $p = 0,001$). Die HT29-Zelllinie präsentierte ein ähnliches Ergebnis. Die Kombination von 100 ng/ml anti-APO1 mit $10 \mu\text{M}$ BMS-214662 erzeugte eine höhere Apoptoserate als deren Summe ($63,165 \pm 7,12$ v.s. $54,27 \pm 7,66$ ($26,605 \% + 27,665 \%$) - $p = 0,001$). Dies stellte sich auch für die gleichzeitige Inkubation von 250 ng/ml anti-APO1 mit $10 \mu\text{M}$ BMS-214662 dar ($62,04 \% \pm 2,94$ v.s. $57,16 \% \pm 7,66$ ($27,665 \% + 29,495 \%$) - $p = 0,001$).

Die Verabreichung beider Stoffe mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ BMS-214662 erzielte einen kleinen, synergistischen Effekt, welcher jedoch nicht signifikant war.

Vergleichend hierzu zeigte der Einsatz des Farnesyltransferase-Inhibitors SCH66336 nur einen geringen Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für letztere wurde das Lösungsmittel Methanol herangezogen. Auch ließen sich keine Hinweise auf einen synergistischen Effekt zwischen der Kombination von SCH66336 und anti-APO1 demonstrieren. Dies galt sowohl für die HepG2- als auch für die HT29-Zelllinie.

Synergistischer Effekt der HepG2-Zelllinie mit BMS-214662



Synergistischer Effekt der HT29-Zelllinie mit BMS-214662

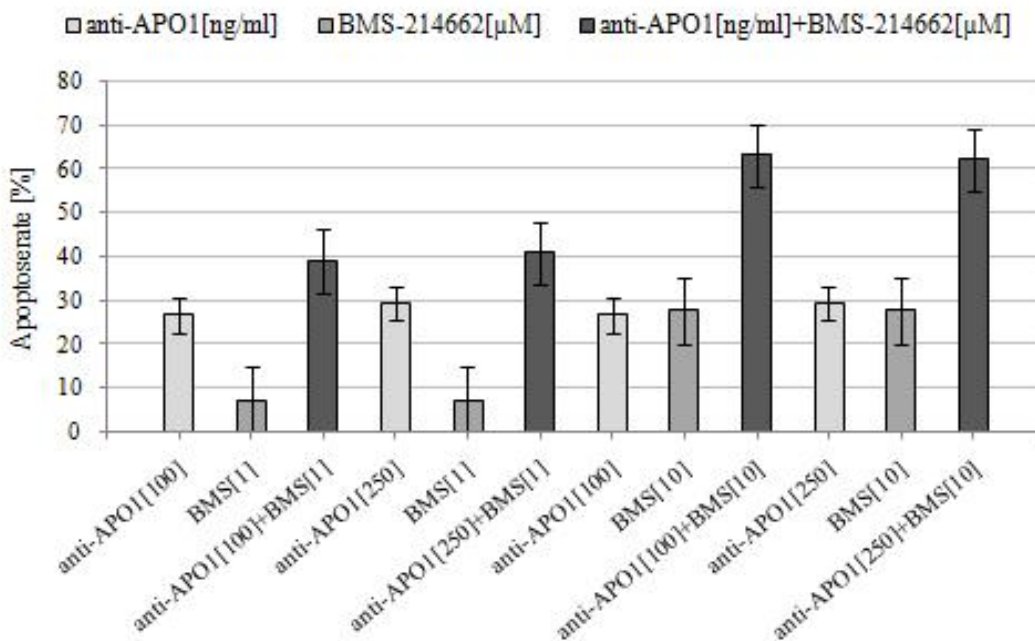


Abbildung 17: Sowohl HepG2 als auch HT29-Zellen werden durch die Verwendung von BMS-214662 auf anti-APO1 sensibilisiert. Der synergistische Effekt ist jedoch dosisabhängig und wird erst bei 10 µM erzielt. Dieser Mechanismus ruft ein besseres Ansprechen der Zellen auf anti-APO1 hervor. BMS-214662 zeigt hierdurch einen Vorteil gegenüber SCH66336, welches nicht in der Lage ist, einen synergistischen Effekt auszulösen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung ± angezeigt

3.1.4. BMS-214662 ruft eine Aktivierung der Caspase 3 hervor

Anschließend untersuchten wir die Auswirkung der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf biochemischer Ebene. Hierbei konnten wir eine Auslösung der Apoptose mittels Western-Blot bestätigen. Durch Inkubation mit BMS-214662 ließ sich eine Erhöhung der Effektorcaspase 3 darstellen, was als Hinweis für die Apoptose-Induktion durch den Farnesyltransferase-Inhibitor zu sehen ist. Gemessen wurde die Aktivität an der kleinen Caspase 3 Untereinheit. Diese entsteht nach Spaltung der Procaspase 3 in die kleine (19 - 11 kd) und große Untereinheit (50 - 40 kd). Nach anschließender Umlagerung entsteht das aktive Enzym, welches die Apoptose bedingt.

Nach 8 bzw. 16 Stunden Inkubation mit 10 μ M BMS-214662 ließ sich in den HT29-Zellen eine geringe Bande detektieren. Auch die Inkubation mit anti-APO1 belegte die Bildung der aktiven kleinen Untereinheit. Die Kombinationsbehandlung über 8 h mit BMS-214662 und anti-APO1 rief ebenso eine Aktivierung der Caspase 3 hervor. Eine deutliche Zunahme der kleinen Untereinheit konnte nach einer Inkubationsdauer von 16 h aufgezeigt werden. Wohingegen in beiden Zelllinien nach Behandlung mit DMSO (Kontrolle) sich keine Aktivierung der Caspase 3 fand. Die Kontrollen mit β -Aktin demonstrierten die Gleichheit der verwendeten Proteinmengen.

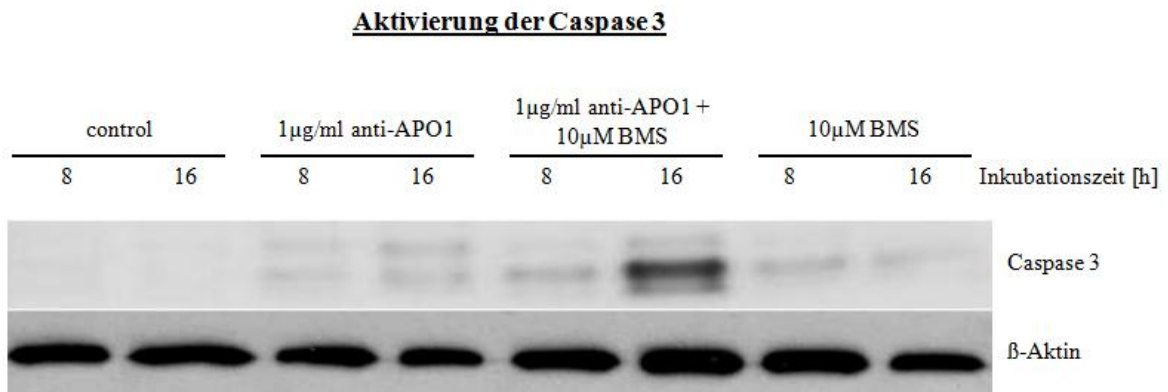


Abbildung 18: Dargestellt ist die Aktivierung der Caspase 3 durch die Inkubation mit BMS-214662 in den HT29-Zelllinien. Eine Zunahme der kleinen Untereinheit p11 gemessen bei 11 kd ist durch anti-APO1, BMS-214662 sowie die Kombination von anti-APO1 und BMS-214662 zu erkennen. Die Stimulationszeit betrug 8 und 16 h. Zu anti-APO1 wurde zudem Protein A (im Verhältnis von 1:100) hinzugefügt. Als Kontrolle diente β -Aktin.

3.1.5. Die Inkubation mit BMS-214662 induziert einen Anstieg der Caspase 8

Die Caspase 8 dient als Bindeglied zwischen Todesrezeptor und Effektorcaspase. In unserer Versuchsreihe wurde neben der Aktivierung von Caspase 3 auch ein Ansprechen der Caspase 8 durch die Inkubation mit BMS-214662 in der Zelllinie HT29 festgestellt. So löste die alleinige Gabe von 10 μ M BMS-214662 eine deutliche Zunahme der kleinen Untereinheit dargestellt durch die Bande bei 11 kd aus. Die Dauer der Inkubation betrug 8 h. Im Vergleich konnten die Kontroll-Proben mit DMSO kein Ansprechen hervorrufen. Einen deutlichen Einfluss demonstrierte die Gabe von anti-APO1. Ebenso stellte sich eine Intensivierung des Signals bei den Proben dar, welche neben anti-APO1 noch mit BMS-214662 inkubiert worden waren. Als Kontrolle verwendeten wir das ubiquitär vorkommende Enzym β -Aktin. Zusammenfassend wies der Western Blot eine erhöhte Spaltung der Caspase 8 nach Behandlung mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor auf. Diese Teilung fand abhängig zur Inkubationszeit statt. So konnte nach einer Inkubationsdauer von 16 h im Vergleich zu 8 h der höchste Anstieg detektiert werden. Allerdings waren die Daten nicht als quantitativ zu werten und zusätzlich spielte die technische Limitierung eine Rolle. Der dargestellte Nachweis des Caspase 8 Anstiegs durch BMS-214662 ließ uns auf einen möglichen Angriffspunkt schließen: Die Wirkung der Farnesyltransferase-Inhibitoren beruht auf der Spaltung und somit Aktivierung der Caspase 8. Allerdings gelang es uns nicht eine Entsprechung bezüglich des Synergismus darzustellen. Dies ist möglicherweise auf eine Übersättigung des Blots im Rahmen der technischen Limitierung zurückzuführen.

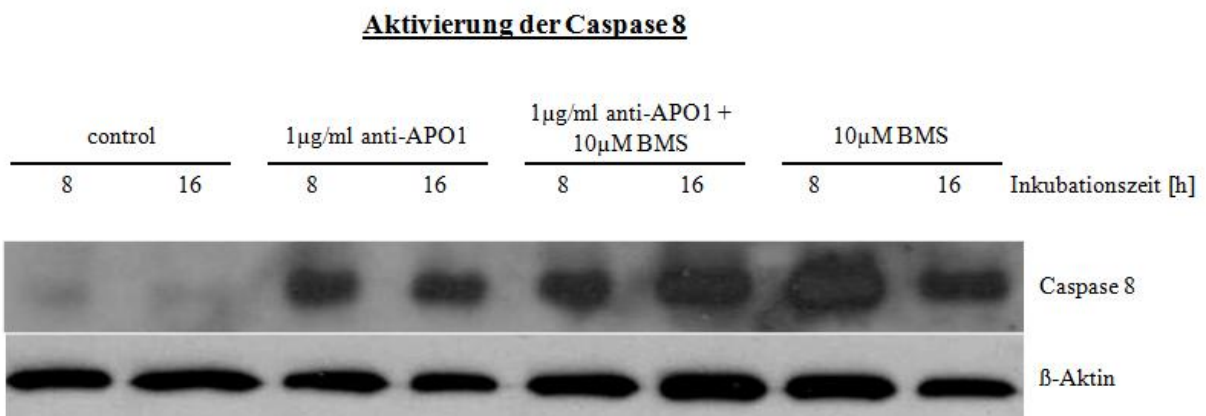


Abbildung 19: Nachgewiesen wird ein Anstieg der kleinen Untereinheit p 11 der Caspase 8 im Sinne einer Aktivierung. Ausgelöst wird dies nach Inkubation mit BMS-214662 sowie anti-APO1. Verglichen wurde die Zellreihe HT29 nach 8 und 16 stündiger Stimulation. Als Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. Zu anti-APO1 wurde zudem Protein A (im Verhältnis von 1:100) hinzugefügt.

3.2. Die Caspase 8 Aktivierung erfolgt nicht über eine Erhöhung des CD95-Rezeptors bzw. dessen Liganden

Nachdem eine Apoptose-Induktion durch Farnesyltransferase-Inhibitoren gezeigt werden konnte, untersuchten wir den auslösenden Weg. Eine Beeinflussung der Apoptose könnte direkt über eine CD95-Rezeptor-Liganden-Bindung erfolgen. Mittels RT-PCR ließ sich jedoch eine Beeinflussung der Rezeptorausprägung durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren ausschließen. Nach 24-stündiger Inkubation zeigten sich trotz ansteigender Konzentration von BMS-214662 und SCH66336 keine Unterschiede in der Bandendicke. Dieses Ergebnis präsentierte sich ebenso unabhängig von dem verwendeten Zelltyp.

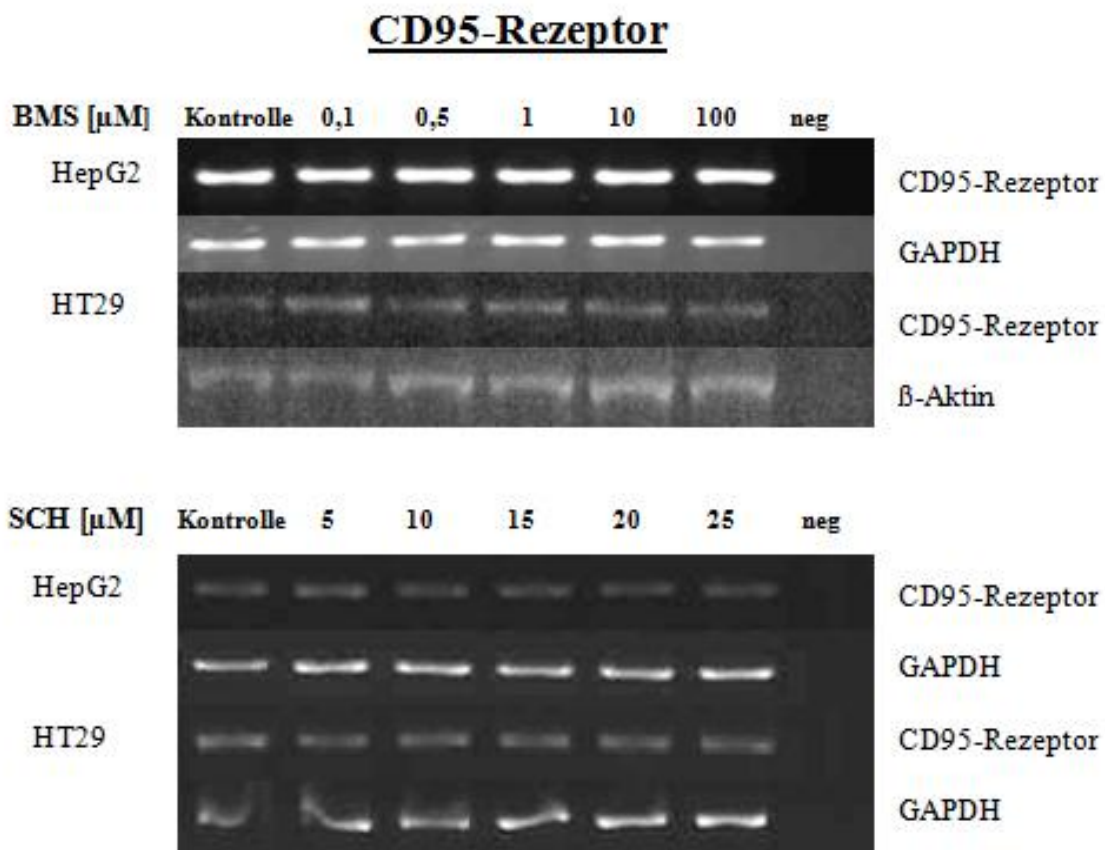


Abbildung 20: Durch die Inkubation mit Farnesyltransferase-Inhibitoren zeigt sich keine Beeinflussung der CD95-Rezeptoren. Mittels RT-PCR wurde die m-RNA beider Zelllinien HT29 und GepG2 ohne bzw. mit erfolgter Stimulation durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 über 24 h verglichen. Die Menge des verwendeten Medikaments erfolgte in aufsteigender Konzentration, erkennbar an den einzelnen Banden. Zur Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO (bei BMS-214662) bzw. Methanol (bei SCH66336). Anhand der Negativprobe mit destilliertem Wasser ließ sich ein falsch positiver Wert durch Kontamination ausschließen. Die CD95-Rezeptor Banden präsentierten sich im Bereich von 384 bp, die Kontroll-Enzyme GAPDH bei 401 bp und β -Aktin bei 387 bp.

Ergebnisse

Neben dem Angriffspunkt der CD95-Rezeptoren wurden die spezifischen Liganden als Wirkort der Farnesyltransferase-Inhibitoren untersucht. Es konnte bereits für Chemotherapeutika wie z. B. das 5-Fluorouracil gezeigt werden, dass diese durch eine verstärkte Hochregulation der CD95-Liganden die Apoptose induzieren (Eichhorst et al., 2000; Eichhorst et al., 2001; Kasibhatla et al., 1998). Wiederum stellte sich in den einzelnen Grafiken keine Veränderung der Bandendicke, unabhängig von der verwendeten BMS-214662- bzw. SCH66336-Konzentration oder der Negativprobe, dar. Eine Einflussnahme der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf die CD95-Liganden durch vermehrte Expression kann somit ausgeschlossen werden.

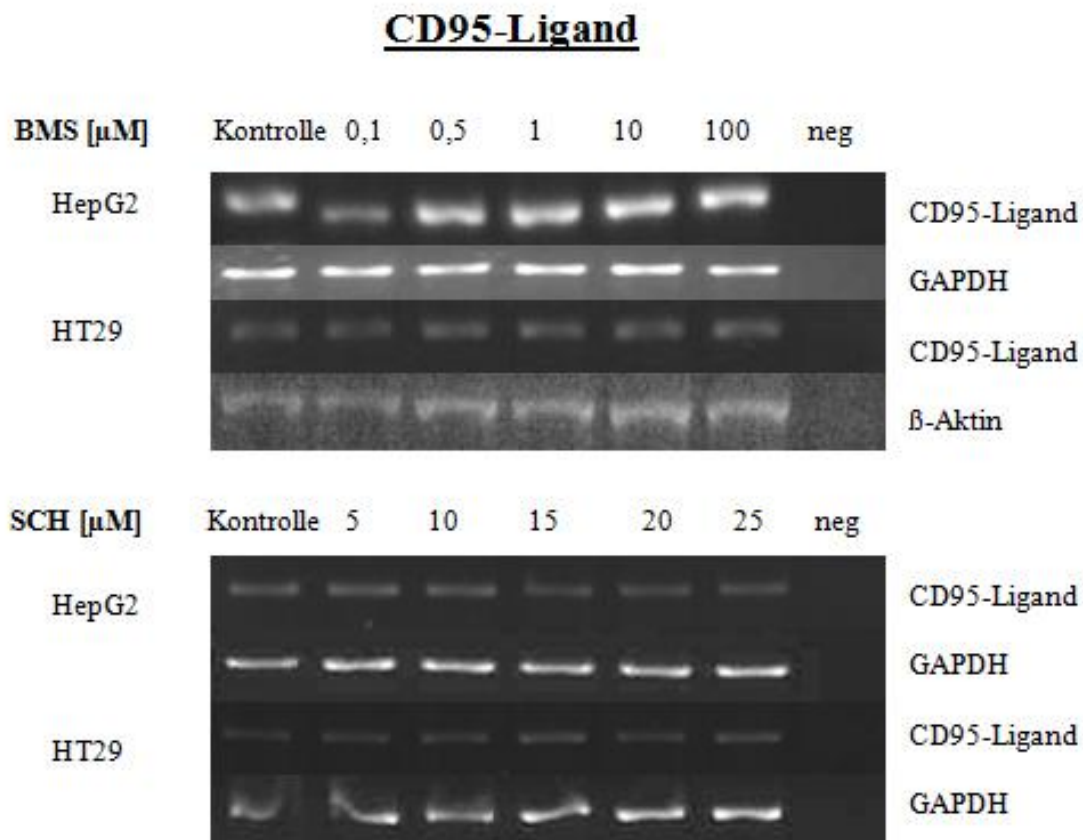


Abbildung 21: Ausschluss der Beeinflussbarkeit nach Inkubation mit BMS-214662 und SCH66336 als Beispiel der Farnesyltransferase-Inhibitoren auf die Ausprägung der CD95-Liganden. Dargestellt mit RT-PCR nach Stimulation der Zelllinien HepG2 und HT29 über 24 h mit jeweils aufsteigender Konzentration von BMS-214662 und SCH66336. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO bzw. Methanol, die Negativprobe mit destilliertem Wasser, bzw. die ubiquitär vorkommenden Enzyme verwendet. Der CD95-Ligand wurde bei 503 bp gemessen.

4. Diskussion

4.1. Farnesyltransferase-Inhibitoren üben einen dosisabhängigen antitumorösen Effekt durch Induktion der Apoptose aus

Das Ziel unserer Arbeit war, einen antitumorösen Effekt der Farnesyltransferase-Inhibitoren als Therapieoption für das Hepatozelluläre Karzinom sowie das Kolonkarzinom zu eruieren. Anhand unserer Versuche mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 konnte diese Potenz dargestellt werden. Der antitumoröse Effekt generierte sich durch Induktion der Apoptose in Tumorzellen des Kolonkarzinoms als auch in hepatozellulären Karzinomen. Hierbei zeigte sich die Induktion der Apoptose dosisabhängig. Die Inkubation der beiden Zelllinien mit 1 μM BMS-214662 löste insgesamt eine Apoptoserate von 6,75 % aus. Vergleichend erzielte die Kontrollgruppe 2,5 %. Durch die Verwendung von 10 μM konnte der Anteil der apoptotischen Zellen um das dreifache, auf 23,05 % gesteigert werden.

Die Verwendung von SCH66336 präsentierte ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate. Die Gabe von 25 μM SCH66336 ließ die Apoptose auf insgesamt 12,4 % in den HepG2 und HT29-Zellen anwachsen. Eine geringe Erhöhung auf 14,25 % wurde mit der Inkubation von 50 μM SCH66336 erzielt. Im Vergleich wuchs die Rate der Apoptose auf 5,25 % in der Kontrollgruppe an.

Falsch positive Werte, welche durch eine zusätzliche apoptotische Wirkung des verwendeten Lösungsmittels entstanden, konnten nach Auswertung der Ergebnisse vernachlässigt werden. Dies ist wichtig, da z. B. für Ethanol, das SCH66336-Lösungsmittel, eine Induktion der Apoptose über einen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg sowie Aktivierung der TLCK-sensitiven Serin Protease beschrieben wurde (Nakayama et al., 2001).

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen, welche ebenfalls eine Induktion der Apoptose unter Verwendung von Farnesyltransferase-Inhibitoren nachgewiesen haben (Suzuki et al., 1998; Du et al., 1999; Edamatsu et al., 2000). Z. B. konnte anhand von in vivo Versuchen mit menschlichen Tumor Xenograft Modellen unter anderem mit Kolonkarzinomzellen ein Anstieg der Apoptose nach Gabe von SCH66336 gemessen werden (Liu et al., 1998). Aber auch in vitro Versuche belegen eine Erhöhung der Apoptoserate. In der HCT-116-Zelllinie, ebenfalls aus einem humanen Kolonkarzinom gewonnen, stieg die Apoptoserate unter 24 stündiger Inkubation mit BMS-214662 [25 μM] im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 20 an (Rose et al., 2001). Dieser deutliche

Zuwachs an apoptotischen Zellen im Vergleich zu unseren Versuchen ist in der höheren Konzentration des verwendeten BMS-214662 zu sehen. Wir erzielten mit 10 μM einen Anstieg der Apoptose um den Faktor 9.

4.1.1. Die Farnesyltransferase-Inhibitoren weisen ein unterschiedliches Aktivierungspotential auf

Vergleichend zeigte insbesondere BMS-214662 eine sehr hohe Potenz, den programmierten Zelltod auszulösen. So reichten bereits 10 μM BMS-214662 aus, um eine Apoptoserate von 40,5 % in HepG2- bzw. 30 % in HT29-Zellen hervorzurufen. Wohingegen SCH66336 mit einer Menge von 25 μM Raten von 4 % in HepG2- und 10,4 % in den HT29-Zellen erzielte. Das Ergebnis des sehr potenten Agens BMS-214662 spiegelte sich in einer Vielzahl von Tumorzellen, aus den unterschiedlichsten Geweben, wie Kolon, Mamma, Ovar und Prostata, wieder (Rose et al., 2001). Auch hier war bereits unter Verwendung von Kleinstdosen [0,1 – 0,3 μM] mit einer Inkubationszeit von 24 – 48 h eine Apoptose-Induktion erfolgt. Wird vergleichsweise SCH66336 verwendet, sind sehr hohe Konzentrationen von 50 – 200 μM notwendig, um eine signifikante Apoptose hervorzurufen. (Rose et al., 2001). Dieses Ergebnis wurde in klinischen Studien bestätigt, in denen BMS-214662 eine „zytotoxische“ Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Tumoren angerechnet werden konnte, wohingegen SCH66336 als „zytostatisch“ eingestuft wurde und bislang keine kurative Regression in Tumoren hervorrief (Liu et al., 1998; Nakajima et al., 2003). Auch weitere Farnesyltransferase-Inhibitoren wie L-744832 und R115777 zeigten eine zytostatische Wirkweise (Barrington et al., 1998; End et al., 2001; Norgaard et al., 1999). Weitere Studien von BMS-214662 und SCH66336 belegten, dass die äquivalente Dosis von SCH66336 erst eine Apoptose in Zellen hervorrief, wenn diese mit weiteren Tod-fördernden Mitteln, wie Zell-Loslösung (Lebowitz et al., 1997), Wachstum in geringem Serum (Suzuki et al., 1998) oder Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (Edamatsu et al., 2000) kombiniert wurde.

4.1.2. Vergleiche zwischen unseren in vitro Versuchen mit klinischen Studien

Die Wirkungsweise der getesteten Farnesyltransferase-Inhibitoren ließ sich ebenfalls auf die klinische Testung übertragen. Beide riefen eine tumorstabilisierende Wirkung in den

Patienten hervor. BMS-214662 war jedoch zusätzlich in der Lage bei manchen Patienten ein klinisches Ansprechen auszulösen. Anhand der Phase I Studien konnte SCH66336 nur in Kombination mit gängigen Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil, oder Vincristin eine antitumoröse Aktivität erzielen. So zeigten einige Patienten unter der Doppeltherapie eine Remission des Tumors (siehe Tabelle 1 und 2).

Trotz der dargestellten sehr hohen Wirkung des Farnesyltransferase-Inhibitors BMS-214662 bestand ein entscheidender Nachteil, wenn es als Medikament verabreicht wurde. Aufgrund ausgeprägter gastrointestinalen Komplikationen sowie Lebertoxizität musste nach klinischer Testung von einer oralen Einnahme Abstand genommen werden. Im Vergleich zu SCH66336, mit dem optimalen Therapieregime von 200 mg 2 Mal täglich oral, wurde die Dosis als wöchentliche Infusion mit 200 mg/m^2 über 1 h festgelegt.

Bezugnehmend auf die verwendeten Dosen in den klinischen Versuchen waren diese deutlich höher als unsere gewählten Konzentrationen. Beispielsweise ließ sich für $10 \text{ }\mu\text{M}$ BMS-214662 eine Dosis von $\approx 0,006 \text{ mg/ml}$ errechnen im Vergleich zu $0,2 - 2,5 \text{ mg/ml}$ BMS-214662, welches in den klinischen Studien eingesetzt wurde. Ähnliches galt für SCH66336. Hier wählten die Studien Dosen von $25 - 300 \text{ mg}$ SCH66336, vergleichend zu unserer Konzentrationen mit $25 \text{ }\mu\text{M} \approx 14 \text{ mg/l}$. Doch trotz der geringen Konzentrationen zeigen sich Parallelen zwischen unseren in vitro und den klinischen in vivo Versuchen mit dem sehr hohen Ansprechen der Apoptose-Induktion unter Verwendung von BMS-214662 und dem niedrigeren SCH66336.

4.2. Die Farnesyltransferase-Inhibitoren wirken Ras-unabhängig

Ursprünglich wurden die Farnesyltransferase-Inhibitoren kreiert, um spezifisch die Ras-Kaskade zu unterbrechen. Der antiproliferative Effekt in Tumoren mit ras-Mutation wurde in einer Vielzahl von Studien bestätigt (z. B. Kato et al., 1992; Sepp-Lorenzino et al., 1995). In neueren Versuchen konnte die antitumoröse Eigenschaft auch in vielen Tumorzellen ohne Veränderungen des ras-Gens detektiert werden (Adjei, 2000; Cox et Der, 1997 und 2000; Lebowitz and Prendergast, 1998). Auch wir konnten anhand unserer Versuchsreihe diese Ergebnisse bestätigen. So verwendeten wir 2 Tumorzelllinien, die sich im Ras-Protein unterschieden. Für die HT29-Zelllinie wurden mehrere Mutationen unter anderem für H-, K- als auch N-ras beschrieben, wohingegen für die HepG2-Zellen kein Onkogen bekannt ist (ATCC, 2003; Choudhary et Wang, 2007).

Nach Auswertung unserer Ergebnisse konnte ein unterschiedliches Ansprechen beider Tumorzelllinien auf die Farnesyltransferase-Inhibitoren ausgeschlossen werden. Sowohl in den hepatozellulären als auch den kolorektalen Karzinomzellen wurde eine vergleichbare Apoptoserate ausgelöst. Diese Resultate waren deckungsgleich zu vielen Fremdstudien, in welchen sich ein antiproliferativer Effekt sowohl in Tumoren mit Ras-Mutationen als auch in nicht transformierten Zellen darstellte (Cox et al., 1994; End et al., 2001; Prendergast et al., 1994; Prevost et al., 1999; Sepp-Lorenzino et al., 1995; Sun et al., 1995). Dies deutete auf einen von der Farnesylierung unabhängigen Weg hin (Liu et al., 1998).

4.3. Die Apoptose ist am wahrscheinlichsten durch eine gesteigerte Aktivierung der Caspase 8 und einen geringen Synergismus mit anti-APO1 induziert

4.3.1 Die erhöhte Rekrutierung der Caspase 8 dargestellt an Hand der gesteigerten Aktivierung der Caspase

Eine Intention der Arbeit bestand darin, die Auslösung der Apoptose durch Farnesyltransferase-Inhibitoren darzulegen. Dies zeigten wir anhand unserer Apoptose-Assays. Das Ergebnis ließ sich ebenfalls auf biochemischer Ebene aufzeigen. Mit Hilfe des Western Blots fand sich nach Inkubation mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor BMS-214662 eine deutliche Erhöhung der Effektorcaspase 3. Mit dem Darstellen der aktiven Untereinheit der Caspase 3 wurde die Auslösung der Apoptose durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren bewiesen. Neben der Aktivierung der Caspase 3 stellten wir zudem eine Aktivierung der Caspase 8 nach Inkubation mit BMS-214662 dar. Als Initiatorcaspase spielt diese eine sehr wichtige Rolle in der Signalkaskade der Apoptose.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine spanische Forschergruppe. Diese konnte mit Hilfe des Western Blots die aktivierte Untereinheit der Caspase 3 detektieren. Beim Versuchsablauf erfolgte die Gewinnung von unbehandelten B-Zellen bei chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL) aus dem peripheren Blut von Erwachsenen. Anschließend wurden diese Zellen mit 0,25 μM BMS-214662 für 6 h inkubiert (Marzo et al., 2004).

Insgesamt gelten die einzelnen Caspasen als die wichtigsten Mediatoren der Apoptose. Die aktivierten Initiatorcaspasen (z. B. Caspase 8) spalten die pro-Form nachgeschalteter Effektorcaspasen (unter anderem Caspase 3). Diese führen zum apoptotischen Tod der Zelle.

Sie sind selbst aktiv am Abbau von Lamin (in der Zellkernmembran) und Actin (Teil des Zytoskeletts) beteiligt, bzw. führen indirekt zur Spaltung der DNA.

Nach Auswertung beider Experimente konnte daher festgestellt werden, dass die Apoptose-Induktion durch den Farnesyltransferase-Inhibitor BMS-214662 Caspase abhängig verläuft.

4.3.2. BMS-214662 ruft einen geringen synergistischen Effekt mit anti-APO1 hervor

Wie oben beschrieben sind Farnesyltransferase-Inhibitoren in der Lage die Apoptose über die Caspasen zu indizieren. In wie weit die Farnesyltransferase-Inhibitoren auf die CD95-Rezeptoren durch Kombination mit anti-APO1 Einfluss nehmen, war ebenfalls ein wichtiges Ziel in unserer Arbeit.

Neben der physiologischen Aktivierung der Apoptose mit Rezeptor-Ligand-Bindung existiert eine Art Verstärkungsmechanismus. Dies wird durch den agonistisch wirkenden Antikörper anti-APO1 ausgelöst, welcher den CD95-Rezeptor bindet und die Apoptose hervorruft. Insgesamt gilt der CD95-Rezeptor als Prognosefaktor. Ein Fehlen bzw. eine Funktionsbeeinträchtigung des Rezeptors führt zu einer Entdifferenzierung mit aggressivem Wachstum sowie zum Teil zu einer Zytostatika-Resistenz (De Toni et al., 2008). Denn viele der bekannten Zytostatika sind in der Lage in chemosensitiven Leukämien und soliden Tumoren wie Kolonkarzinom Apoptose durch Expression des CD95-Liganden auszulösen. Insofern wäre durch eine mögliche Sensibilisierung des CD-Rezeptors durch Farnesyltransferase-Inhibitoren ein besseres Ansprechen von Chemotherapeutika möglich. Zudem könnte eine Reduktion der Therapeutika durch die Kombinationstherapie erzielt werden.

Anhand unserer Ergebnisse zeigte sich ein geringer synergistischer Effekt unter Verwendung von BMS-214662 und anti-APO1. Unter den niedrig gewählten Konzentrationen von 100 und 250 ng/ml anti-APO1 mit 1 bzw. 10 μ M BMS konnte ein geringer Synergismus errechnet werden. Dies galt sowohl für die hepatozellulären Karzinomzellen als auch für die Zellen des Kolonkarzinoms.

Vergleichend galt dies nur für den Farnesyltransferase-Inhibitor BMS-214662. Die Verwendung von SCH66336 wies keine Beeinflussung auf.

4.4. Der Anstieg der Caspase 8 wird nicht über einen Anstieg der CD95-Rezeptoren bzw. CD95-Liganden Transkription ausgelöst

Die Aktivierung der Caspase 8 verläuft unabhängig vom CD95-Rezeptor bzw. dessen Liganden. Anhand unserer Versuchsreihe mit PCR konnte nach 24 h Inkubation keine Vermehrung der CD95-Rezeptoren bzw. CD95-Liganden m-RNA dargestellt werden. Hierfür wurden sogar Konzentrationen von bis zu 100 μ M BMS-214662 verwendet. Dies deutet auf einen intrazellulären Wirkmechanismus mit Aktivierung der Caspase 8 unterhalb der Rezeptorebene hin. Auch andere proapoptotische Medikamente wie Methotrexat (MTX) und 5-Fluorouracil (5-FU) wirken auf diese Weise. Eine Arbeitsgruppe beschrieb, ähnlich zu unserer Versuchsreihe, einen Anstieg der Caspase 8 Messenger-RNA nach Inkubation mit MTX und 5-FU (Erhardt et al., 2008).

Allerdings induzieren auch viele Chemotherapeutika die Apoptose durch eine Hochregulierung des CD95-Liganden. So konnte für das Chemotherapeutikum Doxorubicin, angewendet an H9T-Leukämie-Zellen, eine Beeinflussung des CD95-Liganden mit Apoptose-Induktion aufgezeigt werden (Fulda et al., 2000). Für eine Beeinflussung des CD95-Liganden mittels Farnesyltransferase-Inhibitoren gibt es bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten. Auch wir fanden nach 24-stündiger Inkubation mit Konzentrationen von bis zu 100 μ M BMS-214662 und 25 μ M SCH66336 keine vermehrte Expressierung des CD95-Liganden.

In Bezug auf den CD95-Rezeptor gewann eine andere Arbeitsgruppe gegensätzliche Daten. Diese konnte belegen, dass Fibroblasten mit H-ras Mutation einen geringen Anstieg der CD95-Rezeptor m-RNA nach 48 stündiger Inkubation mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor LB42722 (1 μ M) aufwiesen (Zhang et al., 2002). Auch weitere Daten belegen einen Anstieg der Rezeptor-Expression, welche die Sensitivität der Zellen gegenüber der Apoptose veränderte (Chan et al., 1999; Fulda et al., 1998).

Die Gründe der gegensätzlichen Ergebnisse könnten einerseits in den unterschiedlich verwendeten Zelllinien zu finden sein. In den Fibroblasten lag eine deutliche Anzahl von H-Ras Onkogenen vor (Zhang et al., 2002). Für die HT29-Zellen wurde neben dem H-ras Onkogen eine zusätzliche Expression von K- als auch N-ras beschrieben, wohingegen HepG2-Zellen keine Ras Mutationen aufwiesen (ATCC, 2003). Auch Konzentration und Inkubationsdauer der verwendeten Farnesyltransferase-Inhibitoren wären in der Lage gewesen, ein unterschiedliches Ergebnis herbeizuführen. Allerdings wurde nur eine sehr geringe Dosis von 1 μ M an LB42722 verwendet. In unseren Versuchen wurde die Dosis von BMS-214662 bis auf 100 μ M gesteigert. Auf Grund der hohen Konzentration von BMS-

214662 im Vergleich zu LB42722 ist die Zeitspanne von 24 h im Gegensatz zu 48 h zu vernachlässigen.

So liegt die Vermutung nahe, dass der entscheidende Faktor der gesteigerten CD95-Rezeptor-Expression in der Verwendung unterschiedlicher Zellarten besteht. So scheinen Zelllinien mit einer H-Ras Mutation sensibler auf die Farnesyltransferase-Inhibitoren zu reagieren. Ebenso könnten sich die verwendeten Farnesyltransferase-Inhibitoren unterschiedlich auswirken.

4.5. Für die Zukunft bestehen noch weitere Perspektiven und Forschungsgebiete

Nach den bisherigen Ergebnissen unserer Studie sollte als zusätzlicher möglicher Ansatzpunkt für die Farnesyltransferase-Inhibitoren der „death inducing signal complex“, kurz DISC diskutiert werden. Sowohl die gemessene Zunahme der Caspase 8 und der Caspase 3 im Western Blot als auch das Fehlen einer Antwort der CD95-Rezeptoren und Liganden sprechen für eine Aktivitätsänderung des DISC (Eichhorst et al., 2004).

Durch Literaturrecherche fanden wir zudem einen Hemmmechanismus von SCH66336 bezüglich c-FLIP (Takada et al., 2004). Das Protein c-FLIP blockiert über die Bindung am Rezeptor des DISC die Rekrutierung und damit Aktivierung der Procaspase 8 (siehe Abbildung 5). Durch Inhibierung des c-FLIP wird der Hemmmechanismus auf dem CD95-Signalweg beseitigt und über Bindung von Caspase 8 die Apoptose induziert.

Zusätzlich sollte auch eine mögliche Induktion weiterer Todesrezeptoren durch die Farnesyltransferase-Inhibitoren diskutiert werden. Denn bekanntermaßen wird die Caspase induzierte Apoptose nicht allein über den CD95-Signalweg ausgelöst. Es existiert eine Vielzahl von weiteren Todesrezeptoren, welche die Apoptose induzieren. Beispielsweise sind die beiden Todesrezeptoren DR4 und DR5, aus der Gruppe der TRAIL-Rezeptoren, am engsten mit dem CD95-Rezeptor verwandt. Wie CD95 rekrutiert der TRAIL-Rezeptor FADD/ MORT1 und Procaspase 8 zur DISC Bildung (Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000; Bodmer et al., 2000). Auch hier erfolgt der weitere Signalweg über die Caspasen (Suliman et al., 2001; Ozören and El-Deiry, 2002; Fulda et al., 2002). Unser Versuchsaufbau war so ausgelegt, dass nur der CD95 Signalweg spezifisch untersucht wurde.

4.6. Schlussfolgerung

Wir konnten anhand unserer Studie darlegen, dass die Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 in der Lage sind in hepatozellulären und kolorektalen Karzinomzellen die Apoptose zu induzieren. Anhand folgender Auflistung werden die wichtigsten Punkte zusammengefasst:

1. Die Farnesyltransferase-Inhibitoren BMS-214662 und SCH66336 lösen eine dosisabhängige Apoptose aus, wobei BMS-214662 eine stärkere Wirkung als SCH66336 aufweist.
2. Hierbei spielen Mutationen des ras-Gens keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch Farnesyltransferase-Inhibitoren.
3. Die Caspase 8 Aktivierung spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Auslösung der Apoptose. Denn eine Hochregulation des CD95-Rezeptors bzw. dessen Liganden musste als möglicher Ansatzpunkt der Farnesyltransferase-Inhibitoren ausgeschlossen werden. Andererseits konnte ein kleiner synergistischer Effekt durch die Kombination mit einem agonistisch wirkenden Antikörper anti-APO1 dargestellt werden.

Trotz weiterhin bestehender Unklarheit über den exakten Auslösemechanismus der Farnesyltransferase-Inhibitoren, konnte eine deutliche antitumoröse Aktivität aufgezeigt werden. Die Wirkung entfaltet sich als Mono- wie auch als Kombinations-Präparat, in Verbindung mit zytotoxischen Chemotherapeutika.

Zusammenfassend lässt sich formulieren: das Potential der Farnesyltransferase-Inhibitoren als Therapeutikum in der Tumortherapie ist vielversprechend. Um dieses jedoch noch besser ausschöpfen zu können, muss weiterhin nach den genauen Wirkmechanismen geforscht werden.

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom wie auch das hepatozelluläre Karzinom gelten als eine der häufigsten Tumorerkrankung mit steigender Inzidenz weltweit. Bislang ist die Operation die einzige kurative Therapieoption. Die meisten Patienten, insbesondere mit Diagnose hepatozelluläres Karzinom, sind jedoch für eine operative Versorgung ungeeignet. Aus diesem Grund wird nach neuartigen Therapieoptionen gefahndet. Anhand dieser Arbeit untersuchten wir die Wirkstoffgruppe der Farnesyltransferase-Inhibitoren als eine mögliche Option. Hierbei richtete sich unser Hauptaugenmerk auf eine mögliche Induktion der Apoptose in den entarteten Zellen.

Durchgeführt wurden unsere Versuche mit den Zelllinien HepG2, gewonnen aus einem hepatozellulären Karzinom, sowie HT29, einem kolorektalen Adenokarzinom, unter Verwendung von BMS-214662 und SCH66336 als Vertreter der Farnesyltransferase-Inhibitoren. Diese werden derzeit in klinischen Studien getestet. BMS-214662 befindet sich in Phase II, im Rahmen von SCH66336 sind bereits Phase III Studien abgeschlossen worden.

Anhand von Apoptose-Assays waren wir in der Lage einen antitumorösen Effekt aufzuzeigen. Dieser Effekt lag in der Induktion der Apoptose. Hierbei war die Auslösung der Apoptose dosisabhängig von dem verwendeten Farnesyltransferase-Inhibitor. Gemessen wurde die fragmentierte DNA mit Hilfe des Durchflußzytometers. Im Gegensatz zu SCH66336 induzierte BMS-214662 bereits unter Verwendung von 1 μ M in 24 h die Apoptose, wohingegen eine Konzentration von 25 μ M SCH66336 notwendig war, eine signifikante Apoptose in den beiden verwendeten Zelllinien hervorzurufen.

Die Induktion der Apoptose zeigte sich unabhängig von einer Ras-Mutation. Sowohl in den HT29-Zellen mit Mutation des Ras-Proteins, als auch in den mutationsfreien HepG2-Zellen erfolgte ein Anstieg der Apoptoserate nach Inkubation mit den Farnesyltransferase-Inhibitoren. Das Ras-Protein ist ein zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren. Aktiviert wird Ras durch mehrere Enzyme, unter anderem der Farnesyltransferase. Ursprünglich wurde die Gruppe der Farnesyltransferase-Inhibitoren entwickelt, speziell dieses Enzym zu blockieren und die Ras-Signalkaskade zu hemmen. Anhand von Versuchen zeigte sich jedoch bald eine Ras-unabhängige Wirkung der Medikamentengruppe. Dies konnten wir anhand unserer Versuche bestätigen.

Am wahrscheinlichsten wird die Apoptose durch eine gesteigerte Rekrutierung der Caspase 8 verursacht. Mit Hilfe des Western Blots konnte ein Anstieg der kleinen aktiven Untereinheit

Zusammenfassung

der Caspase 8 detektiert werden. Dies bestätigte sich auch durch eine messbare Erhöhung der Caspase 3. Die Effektorcaspase 3 wird durch die Initiatorcaspase 8 aktiviert und ruft den apoptotischen Tod der Zelle hervor. Zusätzlich konnte ein geringer synergistischer Effekt durch den Antikörper anti-APO nachgewiesen werden.

Anhand der durchgeführten rt-PCR verlief die Aktivierung der Caspasen jedoch Rezeptor- bzw. Liganden-unabhängig. Trotz hoher Konzentration der beiden Farnesyltransferase-Inhibitoren konnte nach 24 h Inkubationszeit keine Erhöhung der Rezeptorenzahl oder deren Liganden nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

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, 6: 2318-25.

Adjei, A. A., Protein farnesyltransferase as a target for the development of anticancer drugs. *Drugs of the Future*, 2000, 25: 1069-1079.

Adjei, A. A., Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93: 1062-1074.

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. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7: 1438-1445.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J., Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, 87: 171.

ATCC The Global Bioresource Center, Cell Lines HT-29 and Hep G2. www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm, 2003.

Bailey, H. H., Alberti, D. B., Thomas, J. P., Mulkerin, D. L., Binger, K. A., Gottardis, M. M., Martell, R. E., Wilding, G., Phase I trial of weekly paclitaxel and BMS-214662 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2007 15: 3623-3629.

Baker, S. J., Reddy, E. P., Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 1996, 12: 1-9.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W., Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 1993, 73: 431-445.

Barbacid, M., ras genes. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 779-827.

Literaturverzeichnis

Barclay, A. E., Franklin, K. J., Prichard, M. L., The fetal circulation and cardiovascular system and the changes they undergo at birth. Oxford: Blackwall, 1944.

Barrington, R. E., Subler, M. A., Rands, E., Omer, C. A., Miller, P. J., Hundley, J. E., Koester, S. K., Troyer, D. A., Bearss, D. J., Conner, M. W., Gibbs, J. B., Hamilton, K., Koblan, K. S. et al., A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice harboring multiple oncogenic mutations by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 85-92.

Bishop, J. M., Molecular themes in carcinogenesis. *Cell*, 1991, 64: 235-248.

Bodmer, J., Holler, N., Reynard, S., Vinciuguerra, P., Schneider, P., Juo, P., et al., TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 241-243.

Boehmer, H., Positive selection of lymphocytes. *Cell*, 1994, 76: 219-228.

Boguski, M. S., McCormick, F., Proteins regulation Ras and its relatives. *Nature*, 1993, 366: 643-654.

Boldin, L. H., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., Wallach, D., Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 1996, 85: 803-815.

Bos, J. L., Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, 1989, 50: 4682-4689.

Burgering, B. M. T., Bos, J. L., Regulation of Ras-mediated signaling: more than one way to skin a cat. *TIBS*, 1995, 20: 18-22.

Caponigro, F., Farnesyl transferase inhibitors: a major breakthrough in anticancer therapy? Naples, 12 April 2002. *Anticancer Drugs*, 2002, 13: 891-897.

Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J., Buss, J. E., p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 8323-8327.

Literaturverzeichnis

Cerruti, P., Hussain, P., Pourzand, C., Aguilar, F., Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Research*, 1994, 54: 1934-1938.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., Lenardo, M. J., A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 2000, 288: 2351-2354.

Chan, H., Bartos, D. P., Owen-Schaub, L. B., Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF- κ B p50-p65 recruitment. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19: 2098-2108.

Chang, E. H., Gonda, M. A., Willis, R. W., Scolnick, E. M., Lowy, D. R., Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 4848-4852.

Cherfils, J., Chardin, P., GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *TIBS*, 1999, 24: 306-311.

Chinnaiyan, A. M., Dixit, V. M., The cell-death machine. *Curr Biol*, 1996, 6: 555-562.

Choudhary, S. and Wang, H.-C. R., Pro-apoptotic activity of oncogenic H-Ras for histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis of human cancer HT29 cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2007, 133: 725-739

Chow, L. Q., Eckhardt, S. G., O' Bryant, C. L., Schultz, M. K., Morrow, M., Grolnic, S., Basche, M., Gore, L., A phase I safety, pharmacological, and biological study of the farnesyl protein transferase inhibitor, lonafarnib (SCH 663366), in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008, 62: 631-646.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., David, C. N., Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol*, 1999, 9: 959-962.

Conradt, B., Horvitz, H. R., The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 1998, 93: 519-529.

Cox, A. D., Der, C. J., Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply ras? *Biochim Biophys Acta* , 1997, 1333: F51-71.

Cox, A. D., Der, C. J., Farnesyltransferase inhibitors, anti-Ras or anticancer drugs. IN: Gutkind (ed.), *JS; Signaling Network and Cell Cycle Control: The Molecular Basis of Cancer and and Other Diseases*. Humana Press, Inc., 2000.

Cox, A. D., Garcia, A. M., Westwick, J. K., Kowalcyk, J. J., Lewis, M. D., Brenner, D. A., Der, C. J., The CAAX peptidomimetic compound B581 specifically blocks farnesylated, but not geranylgeranylated or myristylated, oncogenic ras signaling and transformation. *J Biol Chem*, 1994, 269: 19203-19206.

Crul, M., de Klerk, G. J., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M., Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. *Anti-Cancer Drugs*, 2001, 12: 163-184.

DeFeo, D., Gonda, M. A., Young, H. A., Chang, E. H., Lowy, D. R., Scolnick, E. M., Willis, R. W., Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 3328-3332.

De Toni, E. N., Thieme, S. E., Herbst, A., Behrens, A., Stieber, P., Jung, A., Blum, H., Göke, B., Kolligs, F. T., OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clin Cancer Res.*, 2008, 14: 4713-4718.

Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., Krammer, P. H., Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol*, 1992, 149: 3166-3173.

Doll, R. J., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: critical crossroads. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 2004, 7: 478-86.

Downward, J., Targeting Ras Signalling Pathways in Cancer Therapy. *Nature Reviews*, 2003, 3: 11-22.

Du, W., Liu, A., Prendergast, G. C., Activation of the PI3K-AKT pathway masks the proapoptotic effects of farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Research*, 1999, 59: 4208-4212.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H., Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 383-424.

Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R. P., Ng, S. C., Zheng, L., Lenardo, M. J., Fesik, S. W., NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 1998, 392: 941-945.

Edamatsu, H., Gau, C. L., Nemoto, T., Guo, L., Tamanoi, F., Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene*, 2000, 19: 3059-3068.

Eichhorst, S. T., Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9: 83-99.

Eichhorst, S. T., Krammer, P. H., Derangement of apoptosis in cancer. *The Lancet*, 2001, 358: 345-346.

Eichhorst, S. T., Krueger, A., Muerkoster, S., Fas, S. C., Golks, A., Gruetzner, U., Schubert, L., Opelz, C., Bilzer, M., Gerbes, A. L., Krammer, P. H., Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med*, 2004, 6: 602-609.

Eichhorst, S. T., Muerkoster, S., Weigand, M. A., Krammer, P. H., The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Induces Apoptosis in Mouse Thymocytes in Vivo via Activation of the CD95(APO-1/Fas) System. *Cancer Research*, 2001, 61: 243-248.

Eichhorst, S. T., Muller, M., Li-Weber, M., Schulze-Bergkamen, H., Angel, P., Krammer, P. H., A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 7826-7837.

El-Serag, H. B., Davila, J. A., Petersen, N. J., McGlynn, K. A., The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med.*, 2003, 139: 817-823.

Ellis, H. M., Horvitz, H. R., Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 1986, 44: 817-829.

Ellis, R. E., Horvitz, H. R., Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development*, 1991, 112: 591-603.

Ellis, R. E., Jacobson, D. M., Horvitz, H. R., Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1991, 129: 79-94.

Ellis, R. W., DeFeo, D., Shih, T. Y., Gonda, M. A., Young, H. A., Tsuchida, N., Loxy, D. R., Scolnick, E. M., The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature*, 1981, 292: 506-511.

End, D. W., Smets, G., Todd, A. V., Applegate, T L., Fuery, C. J., Angibaud, P., Venet, M., Sanz, G., Poignet, H., Skrzat, S., Devine, A., Wouters, W., Bowden, C., Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res.*, 2001, 61: 131-137.

Ehrhardt, H., Häcker, S., Wittmann, S., Maurer, M., Borkhardt, A., Toloczko, A., Debatin, K. M., Fulda, S., Jeremias, I., Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene*, 2008, 27: 783-793.

Feldman, E. J., Cortes, J., De Angelo, D. J., Holyoake, T., Simonsson, B., O'Brien, S. G., Reiffers, J., Turner, A. R., Roboz, G. J., Lipton, J. H., Maloisel, F., Colombat, P., Martinelli, G., Nielsen, J. L., Petersdorf, S., Guilhot, F., Barker, J., Kirschmeier, P., Frank, E., Statkevich, P., Zhu, Y., Loechner, S., List, A., On the use of lonafarnib in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, 2008, 22: 1707-1711.

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., Debatin, K. M., Involvement of the CD95(APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in Leukemia cells. *Nat. Med.*, 1996, 2: 574-577.

Fulda, S., Los, M., Friesen, C., Debatin, K.M., Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int. J. Cancer*, 1998, 76: 105-114.

Fulda, S., Meyer, E., Debatin, K. M., Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 2002, 21: 2283-2294.

Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P. H., Peter, M. E., Debatin, K. M., Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ*, 1998, 5: 884-893.

Fulda, S., Strauss, G., Meyer, E., Debatin, K. M., Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood*, 2000, 95: 301-308.

Gibbs, J., B., Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, 2000, 287: 1969-1973.

Gibbs, J. B., Oliff, A., Pharmaceutical research in molecular oncology. *Cell*, 1994, 79: 193-198.

Gideon, P., John, F., Frech, M. Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E., Wittinghofer, A., Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 2050-2056.

Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R., Ferguson, T. A., Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege [see comments]. *Science*, 1995, 270: 1189-1190.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J., Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 1996, 274: 1363-1366.

Han, J. Y., Oh, S. H., Morgillo, F., Myers, J. N., Kim, E., Hong, W. K., Lee, H.-Y., Hypoxia-inducible factor 1alpha and antiangiogenic activity of farnesyltransferase inhibitor SCH66336 in human aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005, 97: 1272-1286 Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2007, 99: 1211.

Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., Marshall, C. J., All ras Proteins are Polyisoprenylated but only some are Palmitoylated. *Cell*, 1989, 57: 1167-1177.

Harvey, J. J., An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature*, 1964, 204: 1104-1105.

Hengartner, M. O., The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407: 770-776.

Hengartner, M. O., Ellis, R. E., Horvitz, H. R., *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 1992, 356: 494-499.

Hengartner, M. O., Horvitz, H. R., *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 1994, 76: 665-76.

Hengartner, M. O., Horvitz, H. R., Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature*, 1994, 369: 318-320.

Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., Debatin, K. M., Activation of CD95(APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J*, 1997, 16: 6200-6208.

Higaki, K., Yano, H., Kojiro, M., Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol.*, 1996, 149: 429-437.

Horvitz, H. R. , Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* , 1999, 59: 1701-1706.

Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W., Ellis, H. M., Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1983, 48: 453-463.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W., NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 1996, 384: 638-641.

Hunt, J. T., Ding, C. Z., Batorsky, R., Bednarz, M., Bhide, R., Cho, Y., Chong, S., Chao, S., Gullo-Brown, J., Guo, P., Kim, S. H., Lee, F. Y., Leftheris, K., Miller, A., Mitt, T., Patel, M., Penhallow, B. A., Ricca, C., Rose, W. C., Schmidt, R., Slusarchyk, W. A., Vite, G., Manne, V., Discovery of (R)-7-cyano -2,3,4,5-tetrahydro -1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl) -4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepine (BMS-214662), a farnesyltransferase inhibitor with potent preclinical antitumor activity. *J Med Chem.*, 2000, 43: 3587-3595.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., Tschopp, J., Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP [see comments]. *Nature*, 1997, 388: 190-195.

Ito, Y., Monden, M., Takeda, T., Eguchi, H., Umeshita, K., Nagano, H., Nakamori, S., Dono, K., Sakon, M., Nakamura, M., Tsujimoto, M., Nakahara, M., Nakao, K., Yokosaki, Y., Matsuura, N., The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2000, 82: 1211-1217.

Itoh, N., Nagata, S., A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, 1993, 268: 10932-10937.

Literaturverzeichnis

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S. M., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S., The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 1991, 66: 233-243.

Jaeschke, H., Lemasters, J. J., Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 2003, 125: 1246-1257.

James, G. L., Golgstein, J. L., Brown, M. S., Rawson, T. E., Somers, T. c., McDowell, R. S., Crowley, C. W., Lucas, B. K., Levinson, A. D., Marsters, J. C., Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. *Science*, 1993, 260: 1937-1942.

Jenkins, E. J., Kingston, R., Smith, K. A., William, G. T., Owen, J. J., Antigen induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol*, 1989, 19: 2175-2177.

Jeong, E. J., Bang, S., Lee, T. H., Park, Y. I., Sim, W. S., Kim, K. S., The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J Biol Chem*, 1999, 274: 16337-16342.

Johnston, S. R., Farnesyl transferase inhibitors: a novel targeted therapy for cancer. *Lancet Oncol.*, 2001, 2: 18-26.

Johnston, S. R., Kelland, L. R., Farnesyl transferase inhibitors: a novel therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8: 227-235.

Johnston, S. R., BMS-214662 (Bristol-Myers Squibb). *I. Drug*, 2003, 6: 72-78.

Karp, J. E., Lancet, J. E., Kaufmann, S. H., End D. W., Wright, J. J., Bol, K., Horak, I., Tidwell, M.L., Liesveld, J., Kottke, T.J., Ange, D., Buddharaju, L., Gojo, I., Highsmith, W.E., Belly, R.T., Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, 2001, 97: 3361-3369.

Literaturverzeichnis

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., Green, D. R., DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*, 1998, 1: 543-551.

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

Kaufmann, S. H., Earnshaw, W. C., Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 2000, 256: 42-49.

Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inou, S., Yoshino, K., Okumura, D., Yagita, H., Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, 1995, 182: 1777-1783.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239-257.

Khosravi-Far, R., Der, C. J., The ras signal transduction pathway. *Cancer Metast Rev*, 1994, 13: 67-89.

Khuri, F. R., Glisson, B. S, Kim, E. S., Statkevich, R., Thall, R. F., Meyers, M. L., Herbst, P. S., Munden, R. F., Tendler, C., Zhu, Y., Bangert, S., Thompson, E., Lu, C., Wang, X.-M., et al., Phase I Study of the Farnesyltransferase Inhibitor Lonafarnib with Paclitaxel in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 2968-2976.

Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, F., Wennstrom, S., Warne, R. H., Downward, J., Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.*, 1997, 16: 2783-2793.

Kirsten, W. H., Mayer, L. A., Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 1967, 39: 311-335.

Literaturverzeichnis

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 1995, 14: 5579-5588.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A., Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 2000, 12: 611-620.

Krammer, P. H., Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord. *Robert Koch Mitt.*, 1996, 20: 1-11.

Krammer, P. H., The CD95 (APO-1/Fas) / CD95L system. *Toxicology Letters*, 1998, 102: 131-137.

Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 619-642.

Krontiris, T. G., Molecular Medicine Oncogenes. *New England Journal of Medicine*, 1995, 333: 303-306.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R. A., Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 1996, 384: 368-372.

Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Cortes, J. E., Singhania, N., Thomas, D. A., Wilson, E. F., Wright, J. J., Freireich, E. J., Talpaz, M., et al., Farnesyltransferase inhibitor R115777 in myelodysplastic syndrome: clinical and biologic activities in the phase I setting. *Blood*, 2003, 102: 4527-4534.

Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sondek, J., Collard, J. G., Der, C. J., Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nature Cell Biol.*, 2002, 4: 621-625.

Lebowitz, P. F., Prendergast, G. C., Non-ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene*, 1998, 17: 1439-45.

Lebowitz, P. F., Sakamuro, D., Prendergast, G. C., Farnesyltransferase inhibitors induce apoptosis in Ras-transformed cells denied substratum attachment. *Cancer Research*, 1997, 57: 708-713.

Leithäuser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Brüderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Möller, P., Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.*, 1993, 69: 415-429.

Levine, A., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88: 323-331.

Levitzki, A., Signal transduction therapy. A novel approach to disease management. *Eur J Biochem*, 1994, 226: 1-13.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J., Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94: 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, O., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., et al., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91: 479-489.

Liu, M., Bryant, M. S., Chen, J., Lee, S., Yaremko, B., Lipari, P., Malkowski, M., Ferrari, E., Nielsen, L. Prioli, N., Dell, J., Sinha, D., Syed, J., Korfmacher, W. A., Normeir, A. A., Lin, C.C et al., Antitumor activity of SCH 66336, an orally Bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Res.*, 1998, 58: 4947-4956.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997, 89: 175-184.

Literaturverzeichnis

Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., Wang, X., Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13836-13840.

Lowry, D. R., Willumsen, B. M., Function and regulation of Ras. *Ann Rev Biochem*, 1993, 62: 851-891.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94: 481-490.

Mackay, H. J., Hoekstra, R., Eskens, F. A. L. M., Loos, W. J., Crawford, D., Voi, M., Vreckem, A. V., Evans, T. R. J., Verweij, J., A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Farnesyl Transferase Inhibitor BMS-214662 in Combination with Cisplatin in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 2636-2644.

Mariani, S. M., Matiba, B., Baumler, C., Kramer, P. H., Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 2303-2307.

Maruta, H., Burgess, A. W., Regulation of the Ras signalling network. *Bioessays*, 1994, 16: 489-496.

Marzo, I., Pérez-Galán, P., Giraldo, P., López-Royuela, N., Gómez-Benito, M., Larrad, L., Laserra, P., Rubio-Félix, D., Anel, A., Naval, J., Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2004, 18: 1599-1604.

McCormick, F., How receptors turn Ras on. *Nature*, 1993, 33: 15-16.

McGrath, J. P., Capon, D. J., Goeddel, D. V., Levinson, A. D., Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature*, 1984, 310: 644-649.

Morgan, M. A., Ganser, A., Reuter, C. W. M., Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*, 2003, 17: 1482-1498.

Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E., M., Walczak, H., Hofmann, W., J., Stremmel, W., Krammer, P., H., Galle, P., R., Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *Journal Clinical Invest.*, 1997, 99: 403-413.

Mulcahy, L. S., Smith, M. R., Stacey, D. W., Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, 1985, 313: 241-243.

Mullis, K., Faloona, F., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalyzes chain reaction *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335-350.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986, 51: 263 -273.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidid, D., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., Dixit, V. M., FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 1996, 85: 817-827.

Nagata, S., Golstein, P., The Fas death factor. *Science*, 1995, 10: 1449-1456.

Nakajima, A., Tauchi, T., Sumi, M., Bishop, W. R., Ohyashiki, K., Efficacy of SCH66336, a Farnesyl Transferase Inhibitor, in Conjunction with Imatinib against BCR-ABL-positive Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, 2: 219-224.

Nakayama, N., Eichhorst, S. T., Müller, M., Krammer, P. H., Ethanol-induced apoptosis in hepatoma cells proceeds via intracellular Ca(2+) elevation, activation of TLCK-sensitive proteases, and cytochrome c release. *Exp Cell Res.*, 2001, 269: 202-213.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 1991, 139: 271-279.

Literaturverzeichnis

Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D., Amano, T., Takano, T., Ikawa, Y., Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*, 1985, 318: 73-78.

Norgaard, P., Law, B., Joseph, H., Page, D. L., Shyr, Y., Mays, D., Pietenpol, J. A., Kohl, N. E., Oliff, A., Coffey, R. Y., Poulsen, H. S., Moses, H. L., Treatment with farnesyl-protein transferase inhibitor induces regression of mammary tumors in TGF α and TGF α /neu transgenic mice by inhibition of mitogenic activity and induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5: 35-42.

Norman, P., Tipifarnib (Janssen Pharmaceutica). *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3: 313-319.
Nossal, G. J., Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 1994, 76: 229-239.

O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., Shanahan, F., The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*, 1996, 184: 1075-1082.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richard, S., Dhein, J., Trauth, B. C., et al., Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem*, 1992, 267: 10709-10715.

Okano, H., Shiraki, K., Inoue, H., Kawakita, T., Yamanaka, T., Deguchi, M., Sugimoto, K., Sakai, T., Ohmori, S., Fujikawa, K., Murata, K., Nakano, T., Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.*, 2003, 83(7): 1033-1043.

Oxford, G., Theodorescu, D., The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol*, 2003, 170: 1987-1993.

Ozören, N., El-Deiry, W. S., Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*, 2002, 4: 551-557

Literaturverzeichnis

Ozören, N., El-Deiry, W. S., Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol.*, 2003, 13: 135-147.

Papadimitrakopoulou, V., Agelaki, S., Tran, H. T., Kies, M., Gagel, R., Zinner, R., Kim, E., Ayers, G., Wright, J., Khuri, F., Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 given weekly in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res.*, 2005, 11: 4151- 4159.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2): 74-108.

Pawson, T., Protein modules and signalling networks. *Nature*, 1995, 373: 573-580.

Peitsch, M. C., Tschopp, J., Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol Immunol*, 1995, 32: 761-772.

Peter, M. E., Krammer, P. H., Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10: 545-551.

Pfreundschuh; Schölmerich, *Pathophysiologie, Pathobiochemie*. Urban & Fischer, 2000, : 50.
Porter, A. G., Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 394-401.

Prendergast, G. C., Farnesyltransferase inhibitors define a role for RhoB in controlling neoplastic pathophysiology. *Histol Histopathol*, 2001, 16: 269-275.

Prendergast, G. C., Davide, J. P., deSolms, S. J., Giuliani, E. A., Graham, S. L., Gibbs, J. B., Oliff, A., Kohl, N. E., Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 4193-4202.

Quilliam, L. A., Kato, K., Rabun, K. M., Hisaka, M. M., Huff, S. Y., Campbell-Burk, S., Der, C. J., Identification of Residues Critical for Ras(17N) Growth-Inhibitory Phenotype and for Ras Interaction with Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14: 1113-1121.

Ravoet, C., Mineur, P., Robin, V., Debusscher, L., Bosly, A., André, M., El Housni, H., Soree, A., Bron, D., Martiat, P., Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Ann Hematol.* 2008, 87: 881-885.

Razzaque, M. S., Koji, T., Kumatori, A., Taguchi, T., Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem Cell Biol*, 1999, 111: 359-365.

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. *Clinical Cancer Research*, 2007, 15: 576-583.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., Downward, J., Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 1994, 370: 527-32.

Rose, W. C., Lee, F. Y. F., Fairchild, C. R., Lynch, M., Monticello, T., Kramer, R. A., Manne, V., Preclinical Antitumor Activity of BMS-214662, a Highly Apoptotic and Novel Farnesyltransferase Inhibitor. *Cancer Research*, 2001, 15: 7507-7517.

Ryan, D. P., Eder, J. P., Puchlaski, T., Seiden, M. V., Lynch, T. J., Fuchs, C. S., Amrein, P. C., Sonnichsen, D., Supko, J. G., Clark, J. W., Phase I Clinical Trial of the Farnesyltransferase Inhibitor BMS-214662 Given as a 1-Hour Intravenous Infusion in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 2222-2230.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350-1354.

Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [see comments]. *Nature*, 1998, 391: 96-99.

Literaturverzeichnis

Salvesen, G. S., Renatus, M., Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell*, 2002, 2: 256-257.

Santucci, R. M. D., Mackley, P. A., Sebti, S. Ph. D., Alsina, M. M. D., Farnesyltransferase Inhibitors and Their Role in the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancer Control*, 2003, 10: 384-387.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Feng, L., Friesen, C., Tomasseli, K. J., et al., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 1998, 17: 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., Peter, M. E., The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, 274: 1541-1548.

Schafer, W. R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S., Rine, J., Genetic and Pharmacological Suppression of Oncogenic Mutations in Ras Genes of Yeast and Humans. *Science*, 1989, 245: 379-385.

Scharovsky, O. G., Rozados, V. R., Gervasoni, S. I., Matar, P., Inhibition of ras Oncogene: A novel approach to antineoplastic Therapy. *J Biomed Sci*, 2000, 7: 292-298.

Schuchmann, M., Galle, P. R., Sensitizing to apoptosis--sharpening the medical sword. *J Hepatol.*, 2004, 40: 335-336.

Scolnick, E. M., Papageorge, A. G., Shih, T. Y., Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc natn Acad Sci USA*, 1979, 76: 5355-5359.

Sepp-Lorenzino, L., Ma, Z., Rands, E., Kohl, N. E., Gibbs, J. B., Oliff, A., Rosen, N., A peptidomimetic inhibitor of farnesyl protein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines. *Cancer Res.*, 1995, 55: 5302-5309.

Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Park, J. Y., Lee, J. H., Lee, S. K., Lee, S. N., Jung, S. S., Han, J. Y., Kim, H., Lee, J. Y., Yoo, N. J., Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.*, 2001, 61: 4942-4946.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., Lenardo, M. J., Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations [see comments]. *Science*, 2000, 288: 2354-2357.

Sonnichsen, D., Damle, B., Manning, J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 in patients with advanced solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2000, 19: 691

Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J., Hengartner, M. O., Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature*, 1997, 385: 653-656.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Reiser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., et al., FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 2000, 12: 599-609.

Srinivasula, S. M. Ahmad, M.; MacFarlane, M.; Luo, Z.; Huang, Z.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E. S., Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J Biol Chem*, 1998, 273: 10107-10111.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1998, 1: 949-957.

Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R., Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells - a mechanism of immune evasion? *Nat Med*, 1996, 2: 1361-1366.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R. K., Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and independent pathways. *Oncogene* 2001, 2001, 20: 2122-2133.

Sun, J., Qian, Y., Hamilton, A. D., Sebt, S. M., Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion. *Cancer Res.*, 1995, 55: 4243-4247.

Suzuki, N., Urano, J., Tamanoi, F., Farnesyltransferase inhibitors induce cytochrome c release and caspase-3 activation preferentially in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 1998, 95: 15356-15361.

Takada, Y., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B., Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J Biol Chem.*, 2004, 279: 26287-2699.

Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., Nagata, S., Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J*, 1995, 14: 1129-1135.

Tartaglia, L. A., Pennica, D., Goeddel, D. V., Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*, 1993, 268: 18542-18548.

Temeles, G. L., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S., Sigal, I. S., Scolnick, E. M., Yeast and mammalian ras proteins have conserved biochemical properties. *Nature*, 1985, 313: 700-703.

Theodorescu, D., Cornil, I., Fernandez, B. J., Kerbel, R. S., Overexpression of normal and mutated forms of HRAS induces orthotopic bladder invasion in a human transitional cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 9047-9051.

Theodorescu, D., Cornil, I., Sheehan, C., Man, M. S., Kerbel, R. S., Ha-ras induction of the invasive phenotype results in upregulation of epidermal growth factor receptors and altered responsiveness to epidermal growth factor in human papillary transitional cell carcinoma cells, *Cancer Research*, 1991, 51: 4486-4491.

Theodorescu, D., Cornil, I., Sheehan, C., Man, S., Kerbel, R. S., Dominance of metastatically competent cells in primary murine breast neoplasms is necessary for distant metastatic spread. *Int J Cancer*, 1991, 47: 118-123.

Thompson, C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456-1462.

Trahey, M., McCormick, F., A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, 1987, 238: 542-545.

Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 1989, 245: 301-305.

van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Salomons, G. S., Voûte, P. A., Pieters, R., Baylin, S. B., Herman, J. G., Versteeg, R., Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res.*, 2002, 62: 2157-2161.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Scoffer, D., Dobe, T., et al., Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 1998, 9: 267-276.

Vaux, D. L., Korsmeyer, S. J., Cell death in development. *Cell*, 1999, 96: 245-254.

Vogt, C., Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). Solothurn, 1842.

Literaturverzeichnis

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., et al., Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 1994, 78: 343-352.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S., Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992, 356: 314-317.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S., The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*, 1992, 148: 1274-1279.

Whiteside, T. L., The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol Invest*. 2007; 36: 25-46.

Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., Lowy, D. R., The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, 1984, 310: 583-586.

Winqvist, E., Moore, M. J., Chi, K. N., Ernst, D. S., Hirte, H., North, S., Powers, J., Walsh, W., Boucher, T., Patton, R., Seymour, L., A multinomial Phase II study of onafarnib (SCH 66336) in patients with refractory urothelial cancer. *Urol. Oncol.*, 2005, 23: 143-149.

Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., Korsmeyer, S. J., Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 1999, 400: 886-891.

Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1989, 169: 1747-1756.

Literaturverzeichnis

Yu, K. Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., Kwon, B. S., A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13733-13736.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. R., The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 1993, 75: 641-652.

Zhang, B., Prendergast, G. C., Fenton, R. G., Farnesyltransferase Inhibitors Reverse Ras-mediated Inhibition of Fas Gene Expression. *Cancer Research*, 2002, 62: 450-458.

Zhang, F. L., Casey, P. J., Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 241-269.

