

**Aus der Universitätsklinik  
für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderchirurgie, Klinikum Schnarrenberg  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs**

**Untersuchungen zur Zytotoxizität des  
Farnesyltransferaseinhibitors FTI-277 im Knochenmarks-  
Stammzell-Assay CFUc**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Kathrin Katja Schäffer  
aus Leonberg**

**2003**

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Schweizer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

Für meine Eltern Gabriele und Peter

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungen

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Allgemeine Gesichtspunkte zur Chemotherapie maligner Erkrankungen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ziele und Probleme der Zytostatikatherapie.....	1
1.1.2	Neue Ansätze und Möglichkeiten einer selektiveren Therapie.....	2
1.2	<b>p21 ras-Protoonkogene.....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die Familie der Ras-Gene.....	3
1.2.2	Struktur und Eigenschaften der Ras-Proteine.....	4
1.2.3	Pathophysiologie der Ras-Proteine.....	5
1.2.4	Posttranslationelle Modifikationen und Ras-Signaltransduktionswege.....	6
1.3	<b>Die Familie der Rho-Proteine.....</b>	<b>7</b>
1.4	<b>Das Enzym Farnesyltransferase.....</b>	<b>8</b>
1.4.1	Die Prenylierung von Proteinen.....	8
1.4.2	Charakterisierung der Farnesyltransferase.....	9
1.5	<b>Inhibitoren der Farnesyltransferase.....</b>	<b>9</b>
1.5.1	Allgemeines.....	9
1.5.2	Die FTI-Rho-Hypothese.....	11
1.5.3	Effekte von Farnesyltransferaseinhibitoren auf Tumorzellen in vitro und in vivo.....	13
1.5.4	Toxizität der FTIs.....	14
1.5.5	FTI-277.....	16
1.6	<b>Fragestellung.....</b>	<b>17</b>

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	<b>Material.....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Arbeitsmaterialien und Laborbedarf.....	19
2.1.3	Chemikalien.....	20
2.1.4	Zellen.....	20
2.2	<b>Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Leukapheresatgewinnung.....	21
2.2.2	Vorbereiten des Leukapheresats.....	21
2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	22
2.2.4	Methylzellulosemedium.....	22
2.2.5	Herstellung der Stammlösung des Farnesyltransferaseinhibitors.....	23
2.2.6	CFUc-Assay mit hämatopoetischen Knochenmarkszellen.....	23
2.2.6.1	Durchführung der CFUc-Assays.....	24
2.2.6.2	Auswertung der CFUc-Assays.....	24
2.2.7	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	24
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Koloniewachstum und –morphologie.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Beschreibung der unterschiedlichen Koloniemorphologien.....	26
3.1.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das Koloniewachstum.....	31
3.1.3	Koloniewachstum im Methylzellulosemedium aus Leukapheresen unterschiedlicher Spender.....	31
3.2	<b>Einfluss von FTI-277 in DMSO auf das Koloniewachstum.....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Effekt von DMSO auf das Koloniewachstum.....	32
3.2.2	Antiproliferativer Effekt von FTI-277 auf das Koloniewachstum im CFUc-Assay.....	33

<b>3.3</b>	<b>Einfluss von FTI-277 in Ethanol auf das Koloniewachstum...</b>	<b>37</b>
3.3.1	Effekt von Ethanol auf das Koloniewachstum.....	37
3.3.2	Antiproliferativer Effekt von FTI-277 in Ethanol.....	38
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>40</b>
4.1	Auswirkungen verschiedener Lösungsmittel im CFUc- Assay.....	40
4.2	Einfluss von FTI-277 auf das Koloniewachstum im CFUc- Assay.....	42
4.3	Vergleich der Empfindlichkeit von hämatopoetischen Stammzellen und Tumorzellen.....	44
4.4	Ausblick.....	45
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
BFU	burst-forming-unit
BFU-E	burst-forming-unit-erythroid
b.i.d.	bis in die (zweimal täglich)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CD34 <sup>+</sup>	CD34-positiv
CFU	colony-forming-unit
CFUc	colony-forming-unit-culture
CFU-E	colony-forming-unit-erythroid
CFU-G	colony-forming-unit-granulocyte
CFU-GEMM	colony-forming-unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte
CFU-GM	colony-forming-unit-granulocyte-macrophage
CFU-M	colony-forming-unit-macrophage
CML	chronisch myeloische Leukämie
DLT	dosislimitierende Toxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
GAP	GTPase aktivierendes Protein
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GGTase	Geranylgeranyltransferase
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HSA	humanes Serumalbumin
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration mit halbmaximaler Hemmung
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
i.v.	intravenös
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
NF	Neurofibromatose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
rh	rekombinant human
Rho	Ras homolog
RhoB-F	farnesylierte Form von RhoB
RhoB-GG	geranylgeranylierte Form von RhoB
U	Units



## **1. Einleitung**

### **1.1 Allgemeine Gesichtspunkte zur Chemotherapie maligner Erkrankungen**

Die Chemotherapie stellt neben der chirurgischen Intervention und der Radiotherapie die dritte Säule in der Behandlung maligner Erkrankungen dar. Dabei umfasst sie definitionsgemäß alle Verfahren der pharmakologischen Therapie, die in der Lage sind, Tumorleiden zu beeinflussen. Sie ist die einzig mögliche Intervention mit systemischer Wirksamkeit (Schmitt, 1999). Eingesetzt werden eine Vielzahl verschiedener Substanzen, sogenannte Zytostatika, meist in Form einer Kombinations-Chemotherapie aus Präparaten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und Angriffspunkten im Zellzyklus sowohl der malignen als auch der gesunden Zellen der Patienten.

#### **1.1.1 Ziele und Probleme der Zytostatikatherapie**

Ziel der Chemotherapie ist die Zerstörung oder Reduzierung der Anzahl maligner Tumorzellen bzw. die Verhinderung eines weiteren Tumorwachstums. Im Gegensatz zu anderen Bereichen der Pharmakotherapie ist hierbei allerdings hervorzuheben, dass die Zytostatika wegen ihrer im Allgemeinen geringen therapeutischen Breite und linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung häufig bis an die Grenze der Toxizität dosiert werden müssen, um eine ausreichende Wirksamkeit sicherzustellen (Huhn et Herrmann, 2001). Dadurch treten weit mehr und häufiger unerwünschte Wirkungen auf als bei der Therapie mit Medikamenten aus anderen Arzneimittelgruppen.

Die Mehrzahl der bisher eingesetzten Chemotherapeutika entfaltet ihre Wirkung nicht selektiv und schädigt daher nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die gesunden Zellen eines Organismus. So führen beispielsweise Substanzen aus der Gruppe der Antimetabolite (z.B. Methotrexat oder 5-Fluorouracil) zu einer

Störung der DNA- oder RNA-Synthese bzw. -Funktion und schädigen dadurch vor allem schnell proliferierende Gewebe. Gewünscht ist diese Wirkung in bezug auf die Tumorzellen, die eine erhöhte Mitoserate aufweisen. Unvermeidlich mitbetroffen werden dabei aber sogenannte Wechselgewebe, deren Zellen ebenfalls eine hohe Teilungsrate besitzen. Es resultieren typische unerwünschte Wirkungen wie eine meist dosisabhängige Knochenmarksdepression mit Leuko- und Thrombozytopenien oder auch Schleimhautveränderungen im Gastrointestinaltrakt mit Entzündung und Ulzeration.

Ein anderer Wirkungsmechanismus liegt den Arzneimitteln aus der Gruppe der Alkylantien zugrunde. Sie gehen eine kovalente Bindung mit der DNA ein. In deren Folge kommt es zu Synthesestörungen, Einzelstrangbrüchen und auch zur Reduplikation von DNA. Alkylierende Substanzen (z.B. Cyclophosphamid oder Busulfan) verhalten sich somit im gesamten Zellzyklus zytotoxisch und sind deshalb als potentiell mutagen und karzinogen anzusehen (Huhn, 2001).

Die Liste der unerwünschten Wirkungen ließe sich an weiteren Beispielen erheblich verlängern, nahezu alle Organfunktionen können durch die verschiedenen Chemotherapeutika beeinträchtigt werden. Teilweise sind diese unerwünschten Nebenwirkungen für die Patienten sehr gefährlich oder gar lebensbedrohlich und demzufolge oft dosislimitierend. Ist eine notwendige weitere Dosissteigerung der sich bereits im Hinblick auf die Tumorerkrankung als wirksam erwiesenen Chemotherapie nicht mehr möglich und gleichwertige andere Therapien sind nicht verfügbar, bedeutet dies für den Patienten in der Regel eine deutliche Prognoseverschlechterung.

### **1.1.2 Neue Ansätze und Möglichkeiten einer selektiveren Therapie**

Ein Ziel der Forschung auf dem Gebiet der Chemotherapeutika ist es daher, neue Medikamente, Substanzen oder Verfahren zu finden, die eine höhere Selektivität für Tumorzellen aufweisen, und dadurch geringere systemische Nebenwirkungen zeigen.

Dieser Ansatz findet beispielsweise Umsetzung in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die speziell gegen tumorspezifische oder zumindest tumorassoziierte Oberflächenmerkmale gerichtet sind und so über die Aktivierung von immunologischen Mechanismen eine relativ spezifische Zelltoxizität vermitteln (Daniel et al., 1999).

Auch verschiedene gentherapeutische Konzepte sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Es wurden sogenannte Suizidgen-Strategien entwickelt. Dabei werden in die Tumorzellen selektiv Gene eingebracht, deren Aktivierung zur Selbstzerstörung der transduzierten Zelle führt, nicht entartete Zellen bleiben weitgehend unbeeinflusst.

Eine am ehesten als „kausale Krebstherapie“ zu bezeichnende Möglichkeit ist die „Reparatur“ an Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Gelingt es, die Funktion eines Tumorsuppressorgens wiederherzustellen bzw. Veränderungen von Onkogenen rückgängig zu machen oder nicht entstehen zu lassen, kann die molekulargenetische Ursache für die Entstehung bzw. für das Wachstum der Tumoren beseitigt werden.

Zur Gruppe der Onkogene, die in der Lage sind die Tumorentstehung zu induzieren, zählt auch das im nachfolgenden beschriebene Ras-Gen, welches somit ein geeigneter Angriffspunkt für neuere und vor allem selektivere Therapien gegen maligne Erkrankungen ist.

## **1.2 p21 ras-Protoonkogene**

### **1.2.1 Die Familie der Ras-Gene**

Ras-Gene kommen in allen Eukaryonten vor und sind neben ihrer Rolle in Neoplasien wichtige Regulatoren zahlreicher physiologischer Zellprozesse. Sie nehmen u.a. Einfluss auf Differenzierung, Zellwachstum, Apoptose und Organisation des Zytoskeletts.

Bisher konnten drei verschiedene Ras-Gene in menschlichen Genomen identifiziert werden: H-Ras, K-Ras und N-Ras (Barbacid, 1990). Das H-Ras-Gen wurde im Harvey-Sarkoma-Virus erstmals entdeckt und beschrieben. Lokalisiert ist es auf dem kurzen Arm von Chromosom 11. In einem Virus mit ähnlichen Eigenschaften, dem Kirsten-Sarkoma-Virus, wurde etwas später K-Ras entdeckt. Es liegt als größtes der drei Gene auf Chromosom 12, während N-Ras auf Chromosom 1 zu finden ist (Barbacid, 1987). Letzteres wurde erstmals aus einer Neuroblastomzelllinie (SK-N-SH) isoliert (Shimizu et al., 1983).

### **1.2.2 Struktur und Eigenschaften der Ras-Proteine**

Die Proteine, die durch die drei verschiedenen Ras-Gene kodiert werden, haben ein Molekulargewicht von jeweils 21 kDa, weshalb sie auch als p21-Ras-Proteine bezeichnet werden (Barbacid, 1987). Man unterscheidet vier Proteine: H-Ras, K-Ras A, K-Ras B und N-Ras, wobei die beiden K-Ras-Proteine zwei unterschiedlich gesplicete Genprodukte darstellen. Alle p21-ras-Proteine sind an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert (Rowinsky et al., 1999).

Ras-Proteine umfassen 188 oder 189 Aminosäuren und weisen eine sehr große Sequenzhomologie auf, die ersten 86 Aminosäuren sind identisch. Eine große Variabilität zeigen lediglich die letzten 25 Aminosäuren (Lowy und Willumsen, 1993). Von besonderer Bedeutung ist hier die sogenannte CAAX-Box, eine charakteristische Aminosäuresequenz am Carboxylende. Hierbei steht das C an viertletzter Stelle für Cystein, gefolgt von zwei Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten (A) und „X“ für verschiedene Aminosäuren (Koblan et al., 1996). Die entsprechenden Sequenzen dieser Tetrapeptide sind somit Cys-Val-Leu-Ser (H-Ras), Cys-Ile-Ile-Met (K-Ras-A), Cys-Val-Ile-Met (K-Ras B) und Cys-Val-Val-Met (N-Ras) (Reiss et al., 1991). Auf die entscheidende Aufgabe und Funktion der C-terminalen CAAX-Box im Hinblick auf posttranslationelle Modifikationen am Ras-Protein wird später eingegangen.

Die Funktion und die biochemischen Eigenschaften der Ras-Proteine sind mit denen von G-Proteinen (Guaninnucleotid-bindende Proteine) sehr gut zu vergleichen. Sie übertragen eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Signale über Rezeptoren an der Zelloberfläche ins Zytoplasma, in dem sie zahlreiche Kaskaden von Proteinkinasen, die letztendlich sowohl Prozesse im Zytoplasma als auch im Zellkern steuern, initiieren (Rowinsky et al., 1999). Ras-Proteine besitzen eine GTP-Bindungsstelle, eine GTPase-Aktivität und eine GDP/GTP-Austauschfunktion (Barbacid, 1987). Aktivierte Ras-Proteine tragen eine gebundene Guanosin triphosphatgruppe (GTP). Mithilfe der intrinsischen GTPase-Aktivität gelingt es den Ras-Proteinen, über die hydrolytische Spaltung von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) in einen inaktiven (GDP-gebundenen) Konformationszustand überzugehen. Die endogene GTPase-Aktivität wird über verschiedene Wechselwirkungen gesteuert, u.a. wird sie über einen allosterischen Aktivator, das GTPase aktivierende Protein (GAP), sowie durch das Genprodukt des Neurofibromatose 1 (NF-1)-Gens erhöht (Martin et al., 1990). Physiologischerweise liegen Ras-Proteine bevorzugt in der GDP-gebundenen, inaktiven Form vor (Cox und Der, 1997).

### **1.2.3 Pathophysiologie der Ras-Proteine**

Ras-Gene können z.B. nach Exposition mit physikalischen oder chemischen Karzinogenen über Punktmutationen innerhalb ihrer kodierenden Sequenzen (oft reicht die Substitution einer einzigen Aminosäure aus) onkogene Aktivität erlangen (Barbacid, 1990). Sie gehören zu den Onkogenen für die die Fähigkeit, Zellen in einen malignen Phänotyp zu transformieren, als erstes beschrieben wurde (Koblan et al., 1996). Ras-Mutationen wurden in ca. 30% aller beim Menschen vorkommender Malignome (darunter zahlreiche solide Tumoren und auch hämatopoetische Tumorerkrankungen) nachgewiesen, insbesondere in einer Vielzahl von kolorektalen- (50%) bzw. Pankreas-Karzinomen (90%). Damit ist Ras das am häufigsten mutierte Onkogen (Barbacid,

1990; Bos, 1989). In der Überzahl der Fälle ist dabei K-Ras betroffen, gefolgt von N-Ras, während H-Ras-Mutationen in menschlichen Tumoren nur selten vorkommen (Bos, 1989; Lowy und Willumsen, 1993).

Die Mutationen, die am häufigsten in den Codons 12, 13, 59 und 60 auftreten, führen dazu, dass eine Wechselwirkung zwischen dem allosterischen Aktivator und der GTPase-Aktivität der Ras-Proteine nicht mehr möglich ist (Bos, 1989; Trahey und McCormick, 1987; Polakis und McCormick, 1992). Anstatt in den GDP-gebundenen Zustand überzugehen, aktiviert das mutierte Ras weiter seine nachfolgenden Effektoren, obwohl die Stimulation durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren längst nicht mehr besteht (Rowinsky et al., 1999). Es stimuliert so fortwährend das Zellwachstum und trägt dadurch zur Tumorgenese bei.

### **1.2.4 Posttranslationelle Modifikationen und Ras-Signaltransduktionswege**

Ras-Proteine sind an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Dorthin gelangen sie nach einer Serie posttranslationeller Modifikationen, die an einer im Zytoplasma synthetisierten Vorstufe (Pro-Ras) erfolgen (Manne et al., 1995). Diese Modifikationen finden hintereinander in mehreren Abschnitten der CAAX-Box am C-terminalen Ende der Proteine statt. Der wichtigste Einzelschritt ist hierbei die Übertragung eines Isoprenrestes auf den Cystein-Rest unter Bildung eines Thioethers (Casey et al., 1989). Anschließend wird das AAX-Peptid proteolytisch abgespalten und das neue C-terminale Ende des Proteins methyliert. Alle Proteine außer K-Ras4B werden zudem noch palmitoyliert (Hancock et al., 1991).

Obwohl all diese posttranslationellen Modifikationen zu einer gesteigerten Hydrophobie des Proteins führen, die eine Assoziation an die Zellmembran erleichtert, ist die initiale Farnesylierung der entscheidende Schritt, ohne den eine Membranverankerung nicht möglich ist (Rowinsky et al., 1999). Unfar-

nesylierte Proteine verbleiben im Zytosol und haben ihre wachstumsregulierende Funktion verloren (Garcia et al., 1993).

Hieraus ergibt sich die Überlegung, durch Hemmung des Farnesylierungsschrittes übermäßig aktivierte Ras-Proteine zu inaktivieren und die transformierten Zellen zu normalem Wachstum zurückzuführen (Gibbs et al., 1993; Kohl et al., 1993).

### **1.3 Die Familie der Rho-Proteine**

Ras homologe (=Rho)-Proteine gehören zur Superfamilie der Ras-Gene und sind ebenfalls GTP-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kD. Die Rho-Familie umfasst die Proteine RhoA-E, RhoG, Rac1, Rac2, TC10, TTF und Cdc42 (Kaibuchi et al., 1999; Fritz et al., 1999).

Diese sind u.a. an der Regulation von Adhäsion, Morphologie und Motilität von Zellen beteiligt. Des weiteren nehmen sie über verschiedene Signaltransduktionswege auch Einfluss auf die Gen-Transkription im Zellkern (Hall, 1999). In malignen Zellen kommt es häufig zur Akzentuierung oder Überexpression der Rho-Proteine. Diese Ereignisse korrelieren zum einen mit Tumorprogression und der steigenden Fähigkeit zur Invasivität (Fritz et al., 1999; Yoshioka et al., 1999), zum anderen konnte auch eine deutlich höhere Expression der Rho-Proteine in Metastasen beobachtet werden (Nakamori et al., 1996).

Obwohl die Homologie innerhalb der verschiedenen Rho-Isoformen sehr hoch ist, gibt es Hinweise dafür, dass die physiologischen Aufgaben doch recht unterschiedlich sind. Unterstützt wird diese These dadurch, dass sich RhoB von RhoA beispielsweise hinsichtlich der Prenylierung am C-terminalen Ende und der intrazellulären Lokalisation unterscheidet (Adamson et al., 1992).

In zahlreichen neueren Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass neben den strukturellen Ähnlichkeiten die Rho- und Ras-Genfamilien auch funktionell betrachtet eng miteinander verknüpft sind. Über einen bestimmten Signaltransduktionsweg ist das Ras-Onkogen in der Lage, Rac und Rho zu

aktivieren, weshalb besonders RhoA, RhoB und Rac als essentielle Faktoren der Ras-vermittelten malignen Transformation gelten (Qiu et al., 1995; Rowinsky et al., 1999).

## **1.4 Das Enzym Farnesyltransferase**

### **1.4.1 Die Prenylierung von Proteinen**

Im Jahre 1989 konnte durch mehrere Arbeitsgruppen der endgültige biochemische, genetische und pharmakologische Beweis erbracht werden, dass neben zahlreichen anderen Proteinen, darunter auch Rho, Lamin A, Lamin B und G-Protein-Untereinheiten, auch Ras-Proteine eine spezielle posttranslationelle Modifikation, die sogenannte Prenylierung, durchlaufen. Diese chemische Reaktion ist essentiell für die Funktionalität der Proteine (Casey et al., 1989; Hancock et al., 1989; Schafer et al., 1989) und betrifft insgesamt ca. 0,5-2% aller zellulären Proteine in vivo (Epstein et al., 1991).

Die Übertragung eines Isoprenoids auf die verschiedenen Proteine wird von drei verschiedenen Enzymen katalysiert: Farnesyltransferase (FTase), Geranylgeranyltransferase (GGTase) I und II. Es handelt sich jeweils um Heterodimere mit einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Casey, 1992), die ihr zu prenylierendes Protein an der CAAX-Box am C-terminalen Ende erkennen. Stehen an letzter Stelle dieses Tetrapeptids die Aminosäuren Serin, Methionin oder Glutamin erfolgt eine Farnesylierung, handelt es sich hingegen um Leucin, katalysiert die GGTase I die Prenylierung (Glomset et al., 1991; Casey et al., 1991). Proteine mit CC oder CXC als endständige Aminosäuresequenz werden durch die GGTase II modifiziert (Gibbs und Oliff, 1997). Diese Substratspezifität ist allerdings nicht absolut, sondern nur präferenziell, so können beispielsweise Methionin tragende Proteine auch durch die GGTase I und Leucin tragende Substrate durch die FTase prenyliert werden (Casey und Seabra, 1996).

Die FTase überträgt eine C<sub>15</sub>-Prenylgruppe, die GG-Tasen jeweils ein C<sub>20</sub>-Prenylgruppe auf das zu prenylierende Protein. Die Isoprenoide werden dabei von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat, beides Zwischenprodukte der Cholesterin-Biosynthese, bereitgestellt.

### **1.4.2 Charakterisierung der Farnesyltransferase**

Für die Ras-Proteine katalysiert die FTase die Übertragung des Prenylrestes auf die CAAX-Box. Das zytoplasmatische Enzym bindet dabei zunächst Farnesylpyrophosphat (FPP) und erst danach das zu farnesylierende Protein. Anschließend wird die C<sub>15</sub>-Prenylgruppe unter Abspaltung eines Diphosphatrestes übertragen.

Die endständige Aminosäure beeinflusst dabei die Affinität des Substrates zu seinem Enzym. Handelt es sich um Serin, wie z.B. bei H-Ras, wird das Protein weniger stark an die FTase gebunden. Die Affinität der anderen Ras-Proteine ist 10-20fach höher (Reiss et al., 1991).

## **1.5 Inhibitoren der Farnesyltransferase**

### **1.5.1 Allgemeines**

Durch Hemmung der Proteinprenylierung verliert das Ras-Onkogen sein Potential zur malignen Transformation, da die für seine Funktion notwendige Verankerung in der Zellmembran nicht möglich ist. Auf der Grundlage dieser Tatsache und im Hinblick auf eine neue wirksame Chemotherapie, die für eine Vielzahl von Tumoren einsetzbar wäre, wurden FTase-Inhibitoren entwickelt.

Sie lassen sich drei verschiedenen Kategorien zuordnen:

1. FPP-Analoga: sie konkurrieren mit dem Substrat Farnesylpyrophosphat um das Enzym FTase
2. Tetrapeptid-Analoga oder auch Peptidomimetika: sie konkurrieren mit der CAAX-Region des zu prenylierenden Proteins um die FTase; zu dieser Gruppe zählt auch FTI-277
3. Bisubstratanaloga, bei deren Herstellung die Eigenschaften beider zuvor genannter Klassen kombiniert wurden.

Obwohl Farnesyltransferaseinhibitoren seit 1993 in vielen verschiedenen in vitro und in vivo Studien gegen Tumorzellen eingesetzt werden, ist der genaue Wirkmechanismus bis heute noch ungeklärt. Gesichert ist lediglich, dass FTIs in der Lage sind, sowohl die Farnesylierung von Ras zu verhindern als auch den transformierten Ras-Phänotyp (durch Transfektion mit einem mutierten Ras-Gen bezüglich Morphologie und Wachstumsverhalten veränderte Zellen) zu blockieren (Lebowitz und Prendergast, 1998).

Zunächst nahm man an, dass diese beiden Effekte, entsprechend der Grundidee aufgrund derer die Substanzen entwickelt wurden, auch direkt kausal miteinander verknüpft sind und sich so die vielfach beobachtete Wachstumshemmung von Tumoren bei Behandlung mit verschiedenen FTIs erklären ließe. Es zeigte sich wenig später jedoch, dass bei Tumoren, bei denen die Mutation K-Ras betraf, K-Ras stattdessen über die GGTase I geranylgeranyliert wurde und so die onkogene Aktivität von Ras erhalten blieb. Dennoch konnte das Wachstum dieser Tumorzellen durch FTI-Behandlung verhindert werden, so dass ein anderer Wirkmechanismus als bisher angenommen dafür verantwortlich sein musste (Lerner et al., 1997). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen zur Kinetik der FTI-induzierten phänotypischen Veränderung Ras-transformierter Zellen, dass diese bereits nach 24-stündiger Behandlung voll-

kommen abgeschlossen war. Bei einer Halbwertszeit des fertig modifizierten Ras-Proteins von 24 Stunden (Prendergast et al., 1994) kann dieser Effekt rein rechnerisch allerdings nicht nur durch einen simplen Funktionsverlust von Ras erklärt werden. Außerdem reagierten auch andere Tumoren ohne onkogene Ras-Aktivität auf eine Hemmung der Farnesyltransferase mit einem Rückgang des Tumorwachstums.

Das Vorhandensein einer Ras-Mutation ist daher keine unabdingbare Voraussetzung für die Sensitivität eines Tumors gegenüber Farnesyltransferaseinhibitoren (Nagasu et al., 1995; Sepp-Lorenzino et al., 1995). Es gilt mittlerweile sogar als gesichert, dass die Funktion des Ras-Proteins nicht unbedingt durch FTIs gehemmt werden muss, um das Wachstum maligner Tumorzellen zu verhindern (Lebowitz und Prendergast, 1998; Prendergast und Du, 1999). Für die beobachtete Wirkung auf Tumoren muss demnach die Inaktivierung eines anderen Substrats der Farnesyltransferase verantwortlich sein.

### **1.5.2 Die FTI-Rho-Hypothese**

Aber welches Protein kommt als sogenanntes „Target X“ in Frage ? Es muss sich dabei um ein Protein handeln, das zum einen farnesyliert wird und dessen Funktion von dieser Modifikation abhängt und zum anderen muss es in der Lage sein, die Ras-Transformierung zu antagonisieren, entweder auf direktem oder auf indirektem Wege (Cox und Der, 1997).

Diskutiert werden in diesem Zusammenhang derzeit mehrere Proteine. Zu den möglichen Kandidaten gehören auch einige Proteine aus der Rho-Familie. Sie werden ebenfalls posttranslationell farnesyliert, entweder durch die FTase oder die GGTase I und spielen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation durch Ras (Prendergast et al., 1995; Qiu et al., 1995).

Der bis heute am häufigsten untersuchte und bisher vielversprechendste Kandidat aus dieser Genfamilie ist RhoB, ein endosomal lokalisiertes Protein, das u.a. an der Regulation von Zellzyklus und Zellproliferation beteiligt ist

(Jahner und Hunter, 1991; Zalcmann et al., 1995). Es existiert in vivo sowohl in einer geranylgeranylierten (RhoB-GG) als auch in einer farnesylierten Form (RhoB-F), wobei sich diese beiden Isoformen im Hinblick auf ihre jeweiligen Funktionen bei der Regulation des Zellwachstums unterscheiden (Du und Prendergast, 1999; Lebowitz et al., 1997). FTIs hemmen die FTase-vermittelte Prenylierung, wodurch der Anteil an RhoB-F abnimmt. Stattdessen werden die neu synthetisierten Rho-Proteine durch die GGase I geranylgeranyliert, so dass vermehrt die Form RhoB-GG in der Zelle vorliegt. Dieser neue Zustand geht im Fibroblastenmodell mit einer Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle und dem Verlust der wachstumsstimulierenden Funktion von RhoB einher (Lebowitz et al., 1995 und 1997). RhoB-GG hat demnach selbst anti-neoplastische Wirkung und liefert eine mögliche Erklärung dafür, wie FTIs auch bei nicht Ras-mutierten Tumoren zu einer Wachstumshemmung führen können (Du et al., 1999; Prendergast und Du, 1999). Über die Aktivitätsminderung von RhoB durch Abnahme von RhoB-F oder durch Zunahme von RhoB-GG in der Zelle kommt es außerdem zum Verlust der onkogenen Ras-Aktivität (Lebowitz et al., 1995 und 1997).

Auch ein Blick auf die Kinetik bestätigt RhoB als geeigneten Kandidaten, über den sich die FTI-Wirkung auf Tumoren erklären lässt. Das Rho-Endprodukt hat eine Halbwertszeit von nur 2-4 Stunden. Durch Behandlung mit FTIs gelingt es daher sehr schnell, den funktionellen RhoB-Level in der Zelle zu reduzieren. Dementsprechend lässt sich auch die bereits nach 24-stündiger FTI-Behandlung abgeschlossene phänotypische Veränderung von Ras-transformierten Fibroblasten auf die Aktivitätsminderung von RhoB zurückführen (Lebowitz und Prendergast, 1998).

Neben RhoB zählen noch weitere Proteine aus derselben Familie (z.B. RhoD oder RhoE), aber auch viele andere zu farnesylierende Proteine weiterhin zu den möglichen Angriffspunkten für FTIs. RhoB bzw. RhoB-GG ist allerdings bisher das einzige Protein, für das es handfeste biochemische und biologische Hinweise gibt, die durch FTI-Behandlung hervorgerufenen antineoplastischen Effekte zu vermitteln oder zumindest ein essentieller Bestandteil des Wirkmechanismus zu sein (Liu et al., 2000).

### **1.5.3 Effekte von Farnesyltransferaseinhibitoren auf Tumorzellen in vitro und in vivo**

Über viele Jahre intensiver Forschung bewiesen FTIs im Rahmen von in vitro, in vivo und inzwischen auch ersten klinischen Studien eine hohe Wirksamkeit gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Tumoren.

In einer bereits 1995 durchgeführten größeren experimentellen Studie waren 70% der 42 getesteten menschlichen Tumorzelllinien, die unterschiedlichste genetische Alterationen aufwiesen, FTI-sensitiv. Sensitivität wurde dabei als mindestens 50%-ige Hemmung der Koloniebildung bei einer Hemmstoffkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  definiert (Sepp-Lorenzino et al., 1995). Die hier für den FTI L-744,832 gefundenen Ergebnisse korrelierten gut mit den später untersuchten Effekten von R115777, einem neueren FTI (End et al., 2001).

Auch das Koloniewachstum maligner hämatopoetischer Vorläuferzellen lässt sich durch FTIs verhindern (Emanuel et al., 2000; Mahgoub et al., 1999). So wurden u.a. entartete Progenitorzellen, die für das Krankheitsbild der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML) verantwortlich sind, durch FTI L-739,749 bzw. FTI L-744,832 erfolgreich dosisabhängig bis zum kompletten Wachstumsstillstand ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  FTI gehemmt (Emanuel et al., 2000).

Dass nicht nur Ras-mutierte Tumoren auf die FTI-Behandlung ansprechen, war ein weiteres Ergebnis der beiden bereits oben erwähnten Versuche von Sepp-Lorenzino et al. (1995) und End et al. (2001). Letzterer zeigte für den Hemmstoff R114777, dass ca. 80% der 53 nicht Ras-mutierten menschlichen Tumorzelllinien auf eine FTI-Behandlung mit einem mindestens 50%-igen Rückgang der Zellzahl bei einer Konzentration von  $<10$  nM reagierten (End et al., 2001). Auch verschiedene Astrozytomzelltypen, bei denen ebenfalls keine Ras-Mutationen vorkommen, sind FTI-sensibel. Die hier beobachteten  $\text{IC}_{50}$  lagen zwischen 5,3 und 17,4  $\mu\text{M}$ . Der verwendete Hemmstoff FTI L-744,832 hatte dabei sowohl zytostatische als auch zytotoxische Effekte.

FTIs wirken über verschiedene Wirkmechanismen. In Abhängigkeit von der vorliegenden Zellpopulation hemmen die Substanzen Zellproliferation und/oder

Angiogenese, führen zu einer gesteigerte Apoptoserate und/oder beeinflussen den Zellzyklus (End et al., 2001; Feldkamp et al., 1999; Nørgaard et al., 1999) In den Zellzyklus greifen sie beispielsweise über eine Verhinderung der bipolaren Spindelzellformierung ein. Dadurch kam es nach FTI-Behandlung bei zwei menschlichen Lungentumorzelllinien zum Zellzyklusarrest in der Prometaphase des Mitosezyklus (Crespo et al., 2001). Vogt et al. (1997) konnten außerdem zeigen, dass der Stop des Zellzyklus an unterschiedlichen Stellen stattfinden kann, je nach Tumorzelltyp z.B. in der  $G_0/G_1$ - oder  $G_2/M$ -Phase. Teilweise laufen Zellzyklusarrest und Apoptoseeinleitung nebeneinander in den Zellen ab, dabei ist die apoptotische Antwort p53-unabhängig und nicht bei allen FTIs an der Tumorregression beteiligt (Barrington et al., 1998; Lebowitz et al., 1997; Miquel et al., 1997).

In einigen Studien wurde beobachtet, dass die FTI-Effekte eher zytostatisch sind und damit auch reversibel, denn die behandelten Zellen zeigten nach Absetzen des FTI wieder ihren transformierten Phänotyp (Prendergast et al., 1994; Nagasu et al., 1995). Bei Allgemeingültigkeit würde diese Beobachtung die Notwendigkeit einer chronischen Therapie der Malignome implizieren und eventuell einen höheren Therapieerfolg von FTIs bei Verwendung in Kombination mit anderen Zytostatika vermuten lassen (Cox und Der, 1997; Gibbs und Oliff, 1997; Sebti und Hamilton, 1997).

### **1.5.4 Toxizität der FTIs**

Ein weiterer Pluspunkt der Farnesyltransferaseinhibitoren ist der bis dato fehlende Hinweis auf eine wesentliche Toxizität gegenüber gesunden Zellen (Sepp-Lorenzino et al., 1995). Dies konnte so nicht erwartet werden, da bekannt ist, dass der Prozess der Farnesylierung bei vielen Proteinen physiologischerweise stattfindet und man daher annahm, dass sich daraus Nebenwirkungen ergeben würden.

Zunächst durchgeführte Mausversuche mit Tumoren aus verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien erbrachten jedoch diesbezüglich einheitlich erste

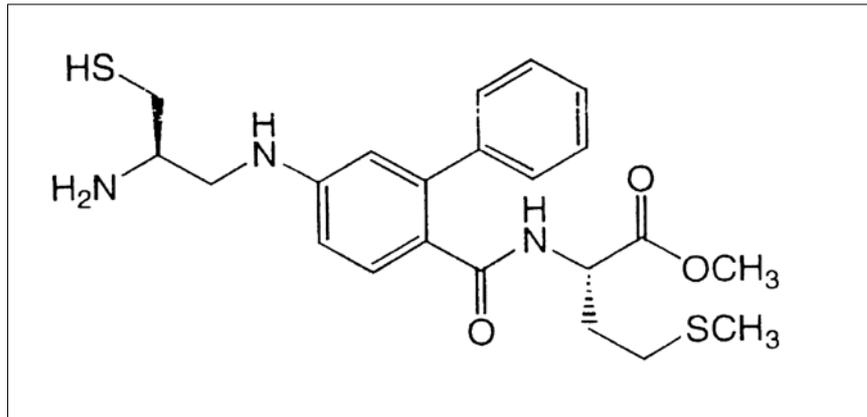
erfreuliche Erkenntnisse. Das Peptidomimetikum B956 bzw. dessen Prodrug B1086 zeigte nach 18-tägiger Anwendung bei ausreichender Hemmung des Tumorzellwachstums keine toxischen Effekte auf verschiedene Gewebe der behandelten Mäuse (Nagasu et al., 1995).

In einem weiteren Tiermodell wurden nach Verabreichung einer Tagesdosis des FTI-276 von 50 mg/kg KG über einen Zeitraum von 36 Tagen bei den behandelten Nacktmäusen, die Zellen eines Bronchialkarzinoms trugen, makroskopisch ebenfalls nicht die geringsten Zeichen von Toxizität gefunden. Selbst eine Dosissteigerung auf einmalig 180 mg/kg KG führte hier zu keinerlei Veränderungen (Sun et al., 1995). Auch Versuchsmodelle mit anderen FTIs bestätigten das Fehlen schwerwiegender Nebenwirkungen. Selbst histologische Untersuchungen zahlreicher Organe von mit dem FTI L-744,832 (40 mg/kg KG über maximal elf Wochen) behandelten Mäusen, darunter auch das Knochenmark, Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, Hirngewebe und Subkutangewebe aus dem Bereich der Injektionsstelle des Chemotherapeutikums, offenbarten keine Gewebsschäden, die auf die Behandlung zurückgeführt werden konnten. Weiterhin kam es unter der Behandlung weder zu Diarrhöen oder Gewichtsabnahme, so das insgesamt gesehen sogar eine chronische Therapie im Tierversuch äußerst verträglich zu sein scheint (Kohl et al., 1995).

In kürzlich durchgeführten ersten klinischen Studien (Phase I) wurden allerdings doch substanzbedingte Nebenwirkungen festgestellt. Bei der Behandlung von 20 Patienten, die histologisch oder zytologisch gesicherte solide Tumoren aufwiesen, kam es nach siebentägiger Verabreichung einer oralen Tagesdosis von 50, 200 oder 400 mg SCH66336, einem neuen trizyklischen FTI, zu deutlichen Beeinträchtigungen mehrerer Organsysteme. Diese erstreckten sich u.a. von Leukopenien und Neutropenien über gastrointestinale Symptome (Nausea, Diarrhö und Erbrechen) als häufigste nicht hämatologische Nebenwirkung bis hin zur moderaten reversiblen Niereninsuffizienz (Adjei et al., 2000).

### 1.5.5 FTI-277

FTI-277 gehört zur Gruppe der CAAX-Analoga der dritten Generation, es stellt den Methylester von FTI-276 dar. Durch diese Modifizierung erhält der zentrale Anteil eine höhere Hydrophobie und damit eine bessere Membrangängigkeit.



*Abb. 1: Strukturformel des FTI-277*

FTI-277 erwies sich als potenter Hemmstoff der H-Ras-Prozessierung ( $IC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ ). Auch N-Ras ist sehr sensitiv, seine Prenylierung konnte durch FTI-Konzentrationen von nur  $5 \mu\text{M}$  bereits vollständig verhindert werden (Lerner et al., 1995). Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit auch die Modifizierung von K-RasB zu hemmen mit einer  $IC_{50}$  von  $20 \mu\text{M}$  nur sehr gering (Sebti und Hamilton, 1996) bzw. gar nicht vorhanden (Sun et al., 1995). Es stellte sich heraus, dass für eine Hemmung der K-Ras-Prozessierung bei einigen Tumorzelllinien eine Kombinationsbehandlung bestehend aus FTI-277 und einem GGTI notwendig ist. In Mausmodellen dagegen reicht FTI alleine aus, um das Wachstum von K-Ras-mutierten Tumoren zu stoppen (Sun et al., 1998). Dies weist wiederum daraufhin, dass neben K-Ras auch andere zu prenylierende Proteine für das Tumorzellüberleben eine entscheidende Rolle spielen.

FTI-277 besitzt eine hohe Selektivität für die Farnesyltransferase und wirkt bereits in einem Konzentrationsbereich, in dem die Prozessierung von

Proteinen durch die GGtasen noch nicht beeinflusst wird (Lerner et al., 1995). Bei in vitro-Versuchen mit einer myeloischen Leukämie-Zelllinie (NB-4) bzw. menschlichen Tumorzellen eines pulmonalen Adenokarzinoms (A549), führte die Behandlung mit FTI-277 zu einem Zellzyklusstop in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Eine gesteigerte Apoptoserate wurde in diesen Zellen nach FTI-Behandlung nicht beobachtet (Morgan et al., 2001; Miquel et al., 1997 ).

### 1.6 Fragestellung

Farnesyltransferaseinhibitoren gehören zu einer Gruppe neuerer und vor allem selektiverer Substanzen, die das Spektrum der Chemotherapien zur Behandlung maligner Tumoren erweitern sollen. Ein besonderer Vorteil dieser Wirkstoffe, der sich erst im Laufe der ersten in vitro Versuche mit verschiedenen Tumorzelllinien herausstellte, sind die Hinweise auf das Fehlen einer wesentlichen Toxizität gegenüber gesunden Zellen. Dieses Merkmal steht im starken Gegensatz zu nahezu allen bisher bekannten Substanzen, die gegen Neoplasien eingesetzt werden, da deren Nebenwirkungen oft so stark sind, dass sie die Dosis limitieren. Am häufigsten wird das Knochenmark substanzspezifisch geschädigt; da dessen Zellen aufgrund ihrer hohen Teilungsrate auf zytotoxische Substanzen besonders empfindlich reagieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, dieses günstige Nebenwirkungsprofil genauer zu untersuchen. Ließe sich bestätigen, dass bei FTI-Behandlung gesunde hämatopoetische Zellen nicht oder nur unwesentlich geschädigt werden, wäre dies im Hinblick auf die spätere Anwendung des Chemotherapeutikums besonders vielversprechend und günstig.

- Mit Hilfe des Knochenmarks-Stammzell-Assays CFUc sollten daher in den nachfolgend beschriebenen Versuchen die direkten Auswirkungen des Peptidomimetikums FTI-277 auf CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder Spender

konzentrationsabhängig anhand des Wachstums der hämatopoetischen Kolonien beobachtet werden.

- Eine zweite Aufgabenstellung ergab sich, weil die verwendete Substanz FTI-277 laut Herstellerangaben in DMSO gelöst werden muss. Da dieses Lösungsmittel selbst zellschädigend wirkt, sollten die beobachteten Effekte auch daraufhin untersucht werden, ob sie allein durch die Farnesylierungshemmung oder auch durch DMSO ausgelöst werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank: Modell B 5060 EC-CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Mikroskope: Leitz Fluovert FS Olympus CX 40	Leitz, Wetzlar Olympus, Japan
Neubauer Zählkammer	
Pipettiergeräte: Pipetboy Plus verstellbare Eppendorfpipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Integra Biosciences, Fernwald Eppendorf, Hamburg
Sterilbank: HLB 2472 GS Heraeus LaminAir	Heraeus, Hanau
Wasserbad: Typ 1803	GFL, Burgwedel
Zentrifuge: Variofuge K	Heraeus-Christ, Osterode

#### 2.1.2 Arbeitsmaterialien und Laborbedarf

Petrischalen (10 x 35 mm)	Falcon, Heidelberg
Petrischalen (20 x 145 mm) sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Greiner, Nürtingen
sterile Plastikröhrchen (12 x 75 mm) Plastikröhrchen (15 ml)	Greiner, Nürtingen

sterile Pipettenspitzen für Eppendorf-pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
--	---------------------

### 2.1.3 Chemikalien

Kulturmedium Methocult SF H4436 Verdünnungsmedium Myelocult M5300	Cell Systems, St. Katharinen
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
FTI-277	Calbiochem, Heidelberg
EDTA-Puffer 0,25 Mol/l, pH 8,0	Universitätsapotheke Tübingen
Albumin-Lösung 20 BaWü	DRK Blutspendedienst, Baden-Baden
Trypanblau (0,4%)	Sigma, München
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Zellen

Für die Anfertigung von CFUc-Assays stellte die Kinderklinik Tübingen jeweils wenige Milliliter Leukapheresat aus dem peripheren Blut von insgesamt 16 allo-genen Stammzellspendern zur Verfügung. Dabei handelte es sich um sogenannte „zu verwerfende Proben“, die zur Zellzählung separiert wurden und anschließend dem Empfänger nicht mehr zugeführt werden können.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Leukapheresatgewinnung**

Zur allogenen Stammzellspende vorgesehene Spender wurden zunächst sechs Tage lang mit 10 µg G-CSF (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor) pro kg KG/d behandelt, um die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren und in das periphere Blut auszuschwemmen. Die eigentliche Leukapheresatgewinnung erfolgte an den Tagen fünf und sechs nach Beginn der G-CSF-Verabreichung mittels Zentrifugation des Spenderblutes in einem Zellseparator (Cobe Spectra, Planegg). Dabei wurden dem Spenderblut die Antikoagulanzen ACD-A (maximales Blut/ACD-A-Verhältnis 12:1, minimales Blut/ACD-A-Verhältnis 24:1 je nach individuellen Gegebenheiten) und Heparin (600 Einheiten/100ml) zugesetzt, die sich damit auch in der später gewonnenen Zellsuspension befanden.

### **2.2.2 Vorbereiten des Leukapheresats**

Das Leukapheresat wurde mit PBS gewaschen. Diese PBS-Lösung war mit humanem Serumalbumin (2%-ig) sowie EDTA-Puffer (0,8%-ig) supplementiert worden, um eine spätere Gerinnung zu verhindern. Der Überstand wurde nach zehnminütiger Zentrifugation bei 400 g abgesaugt und das Zellpellet in ein Verdünnungsmedium (Myelocult M5300) aufgenommen.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,4%-igem Trypanblau gemischt und in die Neubauer Zählkammer eingefüllt. Abgestorbene Zellen färben sich mit Trypanblau an, während Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt bleiben und so unterschieden werden können. Bei 100facher Vergrößerung werden mehrere Quadranten der Zählkammer (je 16 Quadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt und aus den Einzelwerten der Mittelwert gebildet. Multipliziert man den Mittelwert der Zellzahlen in den Quadranten mit  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor, so erhält man die Zellzahl pro ml.

### 2.2.4 Methylzellulosemedium

Das für die CFUc-Assays verwendete Methylzellulosemedium (Methocult SF H4436) beinhaltet folgende Bestandteile:

1%	Methylzellulose in IMDM
1%	BSA
10 ng/ml	Rinderinsulin
200 ng/ml	Eisen-gesättigtes humanes Transferrin
3 U/ml	rh Erythropoetin
$10^{-4}$ M	2-Mercaptoethanol
2 mM	L-Glutamin
50 ng/ml	rh Stammzell-Faktor
20 ng/ml	rh IL-3
20 ng/ml	rh IL-6
20 ng/ml	rh G-CSF

Das gefrorene Medium wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, unter sterilen Bedingungen in 3,5 ml-Aliquote überführt und bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

### **2.2.5 Herstellung der Stammlösung des Farnesyltransferase-inhibitors (FTI)**

Dazu wurden 250 µg des FTI-277 in 112 µl DMSO bzw. Ethanol aufgelöst. Dies entspricht einer 5 mM Stammlösung, deren Lagerung bis zur Verwendung bei –20°C erfolgte.

### **2.2.6 CFUc-Assay (Colony-Forming-Unit-Culture-Assay) mit hämatopoetischen Knochenmarkszellen**

Bereits 1977 beschrieb D. Metcalf Methodik und Möglichkeiten der Kultivierung von hämatopoetischen Zellen in vitro (Metcalf, 1977). Die damals von ihm je nach angestrebtem Kolonietyp zum Wachstum erforderlichen Zusatzfaktoren mischte er zu seinem Grundmedium hinzu. In Anlehnung an diese Maßgaben und Hinweise wurden die Versuche mit dem bereits vorgefertigten speziellen Nährmedium für hämatopoetische Zellen, Methocult SF H4436 der Fa. Cell Systems, durchgeführt.

### **2.2.6.1 Durchführung der CFUc-Assays**

Die einzelnen Versuche wurden als Dreifachbestimmung vorbereitet und steril durchgeführt.

Nach Auftauen der Medialiquote im Wasserbad bei 37°C wurde zu je 3,5 ml Methylzellulosemedium zunächst pro Ansatz die entsprechende Menge der FTI-Stammlösung bzw. des Lösungsmittels, DMSO oder Ethanol, zugegeben und mit einer 2 ml Einmalpipette gründlich durchmischt. Anschließend wurde zu den Aliquoten jeweils das Volumen der Zellsuspension gegeben, das 700 000 Zellen enthält und dies erneut vermischt.

Jeweils 1 ml des entstandenen Ansatzes wurde in Petrischalen (10 x 35 mm) ausplattiert und anschließend für elf Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

### **2.2.6.2 Auswertung der CFUc-Assays**

Nach elf Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Koloniezahlen der einzelnen Petrischalen unter dem Mikroskop bei 32facher Vergrößerung bestimmt. Dabei wurden Zellansammlungen ab einer Größe von 50 Zellen als Kolonie gewertet, lag die Zellzahl darunter, handelte es sich um sogenannte „Cluster“, die im Rahmen der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

### **2.2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Um eine Aussage über die Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse treffen zu können, wurden Kovarianzanalysen durchgeführt.

Dabei wurde zunächst untersucht, ob der Wert von „log<sub>10</sub> (Kol+1)“ (mathematischer Ausdruck der sich ergebenden Koloniezahlen in den CFUc-Assays) durch die Variable „Spender“ (nominal; als zufälliger Effekt modelliert) beeinflusst wird, da Proben von insgesamt 16 unterschiedlichen Stammzellspendern verwendet wurden. Außerdem wurde der Einfluss der jeweiligen Haupteffekt-Variablen FTI-, DMSO- oder Ethanolkonzentration (alle kontinuierlich) auf die Zielvariable „Koloniezahl“ (log<sub>10</sub> (Kol+1); kontinuierlich) überprüft. Zudem wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen Hemmstoff (FTI-277) und Lösungsmittel (DMSO oder Ethanol) untersucht und ggf. berücksichtigt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Koloniewachstum und –morphologie**

##### **3.1.1 Beschreibung der unterschiedlichen Koloniemorphologien**

Aus dem Knochenmark mobilisierte Blutstammzellen bilden unter dem Einfluss von verschiedenen Zytokinen in halbflüssigem Medium (Methylzellulose) nach 7-14 Tagen charakteristische Kolonien reifer Blutzellen, die als colony-forming-units (CFU) und burst-forming-units (BFU) bezeichnet werden. Sie lassen sich weiter in folgende Subklassen unterteilen, die in den Kulturen morphologisch differenziert werden konnten (Metcalf, 1977; Eaves und Lambie, 1995):

##### Erythropoetische Kolonien:

Erythropoetische Vorläuferzellen generieren Kolonien, die aus einer variablen Anzahl von Clustern aus hämoglobinierten Erythroblasten bestehen. Abb. 2 zeigt eine typische Kolonie, die aufgrund ihrer charakteristischen roten Färbung und der kompakten Zellformation gut zuzuordnen ist. Häufig besteht allerdings eine „Gesamt-Kolonie“ aus mehreren dieser kompakten Zellansammlungen, die etwas verstreut im Methylzellulosemedium liegen (siehe auch Abb. 3).

Die erythropoetischen Kolonien lassen sich weiter in CFU-E und BFU-E subklassifizieren.

##### **1. CFU-E:**

So werden die Vorläuferzellen der kleinsten und am schnellsten reifenden erythroiden Kolonien bezeichnet. Die Kolonien bestehen aus nur wenigen Clustern mit insgesamt zwischen 100 und 200 Erythroblasten und gehören zu denjenigen, die in vitro als erste zu lysieren beginnen.

### 2. BFU-E:

Die „burst-forming-units-erythroid“ sind im Vergleich zu den CFU-E die primitivere Subklasse der Vorläuferzellen aus der roten Zelllinie. Wegen ihrer größeren Proliferationsfähigkeit entstehen aus ihnen größere Kolonien. Zwischen einem und 16 Cluster können zu einer Kolonie beitragen und dementsprechend bis zu  $10^4$  oder mehr einzelne Erythroblasten enthalten (Abb. 2 und 3).

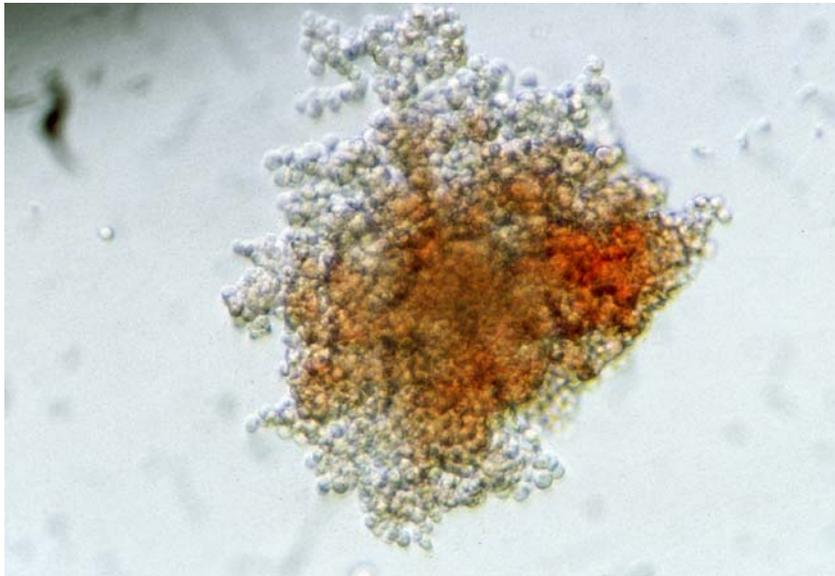
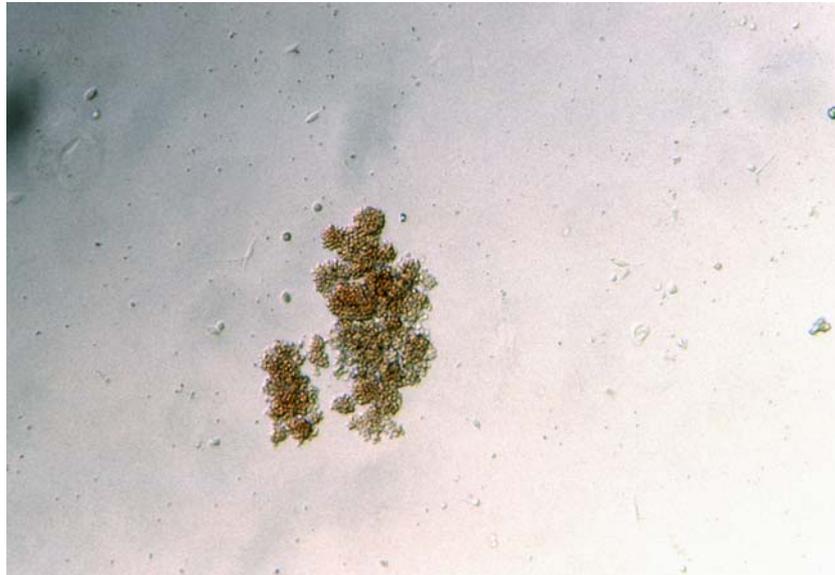


Abb. 2:

**BFU-E-Kolonie aus mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen:**  
*Inkubationszeit in Methocult SF H4436: 11 Tage bei 37°C; 200fache Vergrößerung*



**Abb. 3:** **Verstreuter angeordnete BFU-E-Kolonie mit zwei deutlich voneinander abgrenzbaren großen Zellansammlungen:**  
*Inkubationszeit der mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen: 11 Tage bei 37°C; Vergrößerung: 63fach*

#### Myeloische Kolonien:

Dazu zählt man die Vorläuferzellen von Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M) oder von beiden zugleich (CFU-GM). Unter den granulozytären Kolonien findet man in Methylzelluloseansätzen vor allem Neutrophilen-Vorstufen, während Basophile äußerst selten in Routine-Assays beobachtet werden können. Kolonien mit eosinophilen Vorläuferzellen sind wiederum etwas häufiger, besonders wenn, wie in den vorliegenden Versuchen, Zellen aus dem peripheren Blut für die Ansätze verwendet werden.

Wie die Abb. 4 und 5 veranschaulichen, stellen sich die Zellen der myeloischen Kolonien im Vergleich zu Kolonien aus der roten Zelllinie, nicht als dichte, dunkle Zellen dar, sondern als rundliche Strukturen mit hellem Zentrum und dunklem Rand.

Im Assay zeigen Granulozyten und Makrophagen eine sehr ähnliche Morphologie. An einigen spezifischen Merkmalen sind sie dennoch leicht zu

unterscheiden. Granulozyten sind kleine Zellen, die sehr kompakte Kolonien bilden. Makrophagen dagegen sind deutlich größer als Granulozyten und liegen innerhalb ihrer Kolonie nicht so dicht beieinander.

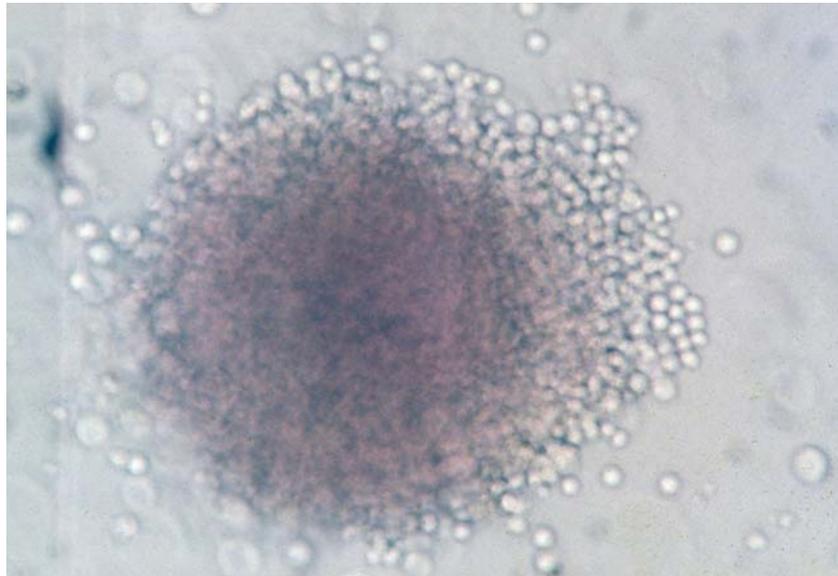


Abb. 4: **CFU-GM aus mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen:**  
*Inkubationszeit in Methocult SF H4436: 11 Tage; Vergrößerung: 200fach*

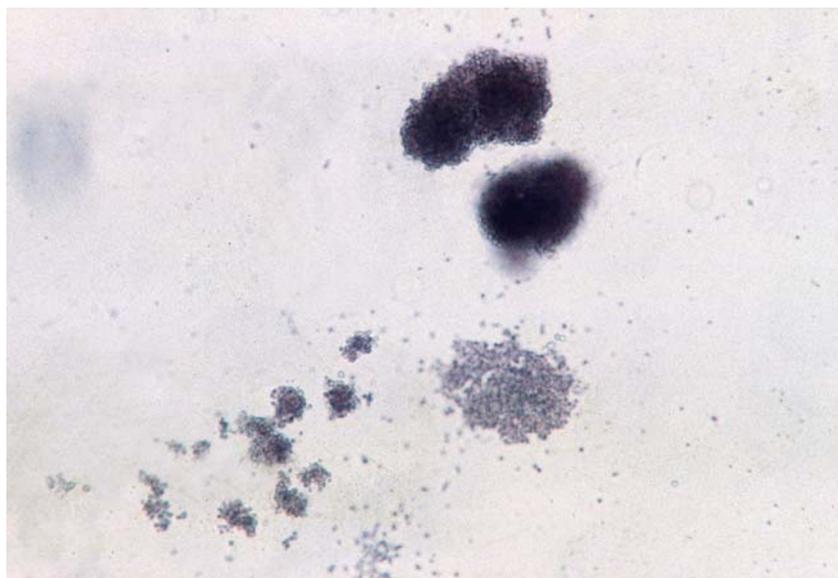


Abb. 5: **Hämatopoetische Kolonien aus mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen:**  
*In der Bildmitte erkennt man eine CFU-G, darüber stellt sich eine BFU-E und in Richtung des linken unteren Bildrandes eine CFU-E dar; 63fache Vergrößerung*

### Multi-lineage Kolonien:

Diese sogenannten CFU-GEMM sind sehr frühe Vorläuferzellen, aus denen noch viele verschiedene Zelltypen hervorgehen können, in der Regel auch erythroide Zellen. Teilweise findet man nur wenige Granulozyten und Makrophagen am Rand um einen dichten Kern von Erythroblasten, wodurch diese Kolonien leicht mit reinen BFU-E bzw. CFU-E verwechselt werden können. Zwei solche CFU-GEMM zeigt Abb. 6.

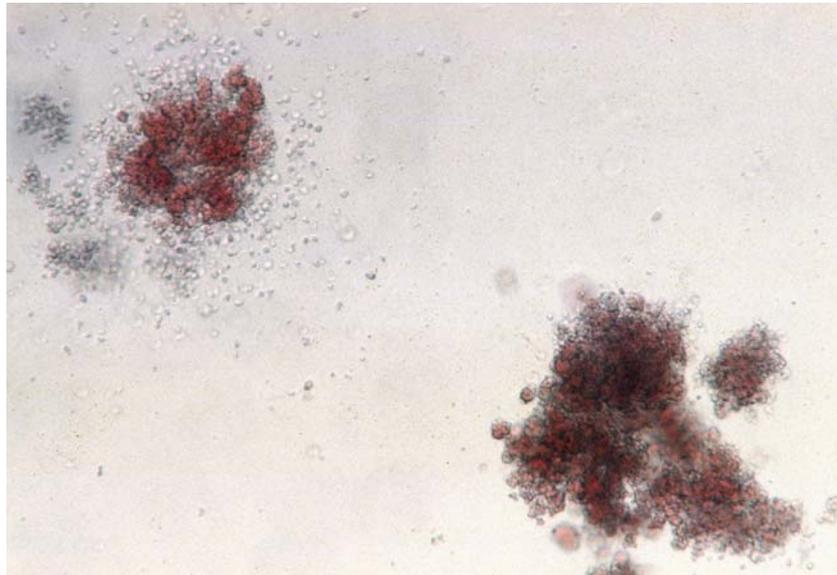


Abb. 6:

**Zwei CFU-GEMM:**

*Inkubationszeit der mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen in Methocult SF H4436: 11 Tage bei 37°C; Vergrößerung 100fach*

### **3.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das Koloniewachstum**

In Vorversuchen wurden die Leukapheresezellen von sechs verschiedenen Spendern unterschiedlich lange im Brutschrank inkubiert und anschließend die Koloniezahl pro Petrischale wie beschrieben unter dem Mikroskop nach 7, 9, 11 bzw. 14 Tagen ausgezählt. Erfolgte die Auswertung nach sieben oder neun Tagen, waren vor allem CFU-E/BFU-E zu finden, die teilweise noch nicht hämoglobinisiert waren und daher mit CFU-GM verwechselt werden konnten. Bei einer Inkubationszeit von mehr als elf Tagen, begannen einige erythrozytäre Kolonien bereits zu lysieren. Nach weiteren drei Tagen waren manche granulozytäre Kolonien so groß, dass sie untereinander zu konfluieren begannen bzw. andere, kleinere Kolonien durch ihre Größe überdeckten, was zu einem verfälschten Auszählungsergebnis führen würde. Die optimale Inkubationszeit wurde daher für die folgenden Versuche auf elf Tage festgelegt.

### **3.1.3 Koloniewachstum im Methylzellulosemedium aus Leukapheresen unterschiedlicher Spender**

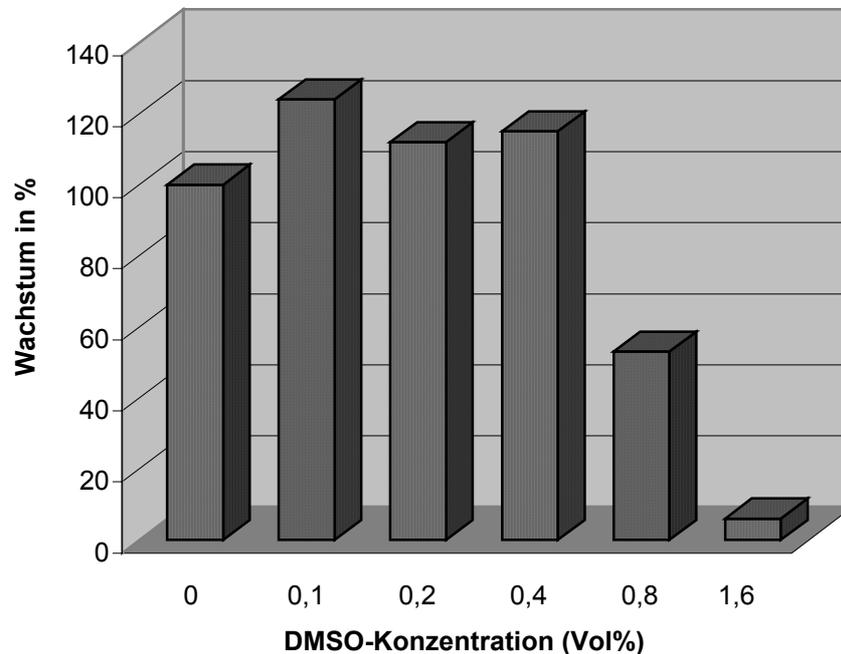
Aus Leukapheresen zehn gesunder Stammzellspender wurden CFUc-Assays als Kontrolle für die unten beschriebenen Versuche mit FTI-277 durchgeführt. Je  $7 \times 10^5$  Zellen wurden als Zellsuspensionen ohne weitere Zusätze in das Methylzellulosemedium überführt. Nach elftägiger Inkubation erfolgte die mikroskopische Auszählung. Aus den als Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen wurden zunächst die Mittelwerte für die einzelnen Spender berechnet. Aus diesen zehn Werten wiederum ergab sich dann ein mittleres Koloniewachstum von 73,6 Kolonien je  $7 \times 10^5$  Zellen. Dabei waren große interindividuelle Unterschiede in den verschiedenen Leukapheresaten zu beobachten, der Gehalt an koloniebildenden Zellen variierte zwischen 14 und 197 Kolonien pro  $7 \times 10^5$  Zellen der Leukapheresate.

### **3.2 Einfluss von FTI-277 in DMSO auf das Koloniewachstum**

Für diese Versuchsreihe wurden dem Methylzellulosemedium neben dem berechneten Volumen der Zellsuspension, das  $7 \times 10^5$  Zellen enthielt, aufsteigende Konzentrationen der mit DMSO hergestellten Stammlösung des Farnesyltransferaseinhibitors 277 zugegeben. Je drei Petrischalen wurden mit 3,5  $\mu$ l, 7  $\mu$ l, 14  $\mu$ l, 28  $\mu$ l bzw. 56  $\mu$ l des Hemmstoffes angesetzt, dies entspricht Endkonzentrationen von 5  $\mu$ M - 80  $\mu$ M FTI-277. Parallel dazu wurden mit den selben Mengen des reinen Lösungsmittels DMSO eigene Assays angesetzt, um den Effekt des Lösungsmittels auf die Koloniebildung zu ermitteln. Bei der Auswertung aller folgenden Versuche wurden zunächst aus den drei Einzelwerten der Dreifachbestimmung jedes Spenders für jede Konzentration Mittelwerte gebildet. Die unten aufgeführten Ergebnisse verstehen sich dann als aus diesen Werten errechneter Gesamtmittelwert für alle beschriebenen Versuche.

#### **3.2.1 Effekt von DMSO auf das Koloniewachstum**

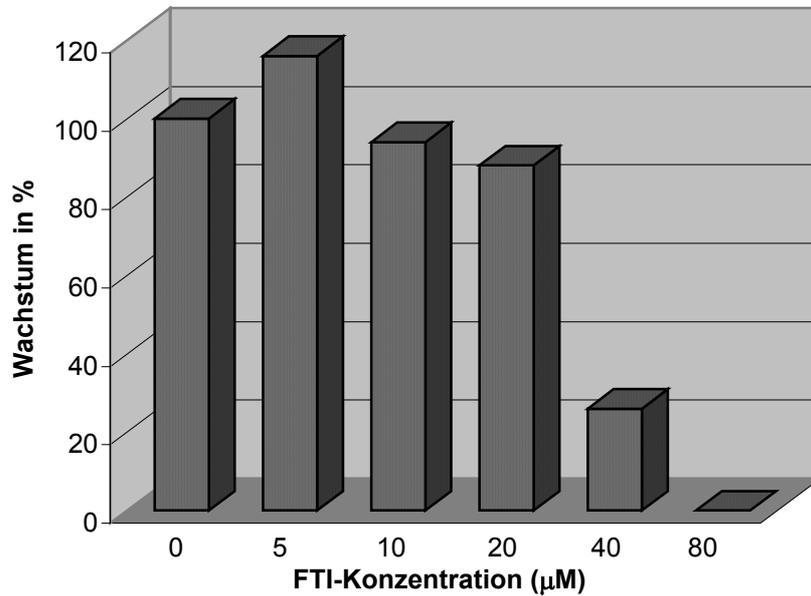
Die Inkubation der Stammzellen nur in Gegenwart des Lösungsmittels zeigte, dass DMSO selbst bereits starke Effekte auf das Koloniewachstum hatte. Wie Abb. 7 verdeutlicht, kam es bei niedrigen Konzentrationen durch die Zugabe von DMSO zu einer Stimulation der Koloniebildung. Bei 0,1 Vol%, 0,2 Vol% sowie bei 0,4 Vol% DMSO lag das Wachstum der Kolonien mit 124%, 112% bzw. 115% etwas über dem unbehandelten und als 100% festgelegten Kontrollassay, der zum Vergleich ohne Zugabe von Hemmstoff oder Lösungsmittel inkubiert wurde. Bei Zellen, die mit 0,8 Vol% Lösungsmittel behandelt wurden, erniedrigte sich das Koloniewachstum auf 53%, bei der nächst höheren Lösungsmittel-Zugabe (1,6 Vol%) sogar auf 6%, so dass der Mittelwert der ausgezählten Koloniezahl nur noch drei pro Schale betrug.



**Abb. 7:** *Effekt von DMSO (ohne Hemmstoffzugabe) auf das Koloniewachstum im CFUc-Assay: Mittelwerte aus sieben Versuchen*

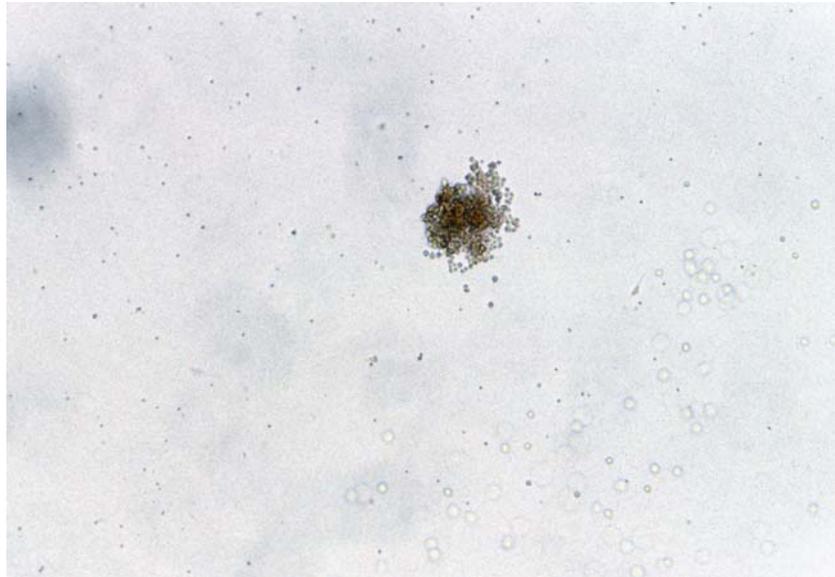
### 3.2.2 Antiproliferativer Effekt von FTI-277 auf das Koloniewachstum im CFUc-Assay

Die Anzahl der Kolonien konnte nach Inkubation der Zellen mit FTI bei der niedrigen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle auf 116% stimuliert werden. Bei der nächst höheren Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) setzte im Gegensatz zum oben beschriebenen Lösungsmittelversuch bereits ein leichter Hemmeffekt ein. Die Anzahl der Kolonien sank bei 20  $\mu\text{M}$  auf 88% und auf nur noch 26% bei 40  $\mu\text{M}$  ab. Bei einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  waren nur noch in zwei von sechs Schalen vereinzelt Kolonien in den Assays auszählbar, was der maximalen Wachstumshemmung entsprach. Abb. 8 veranschaulicht diese Ergebnisse.

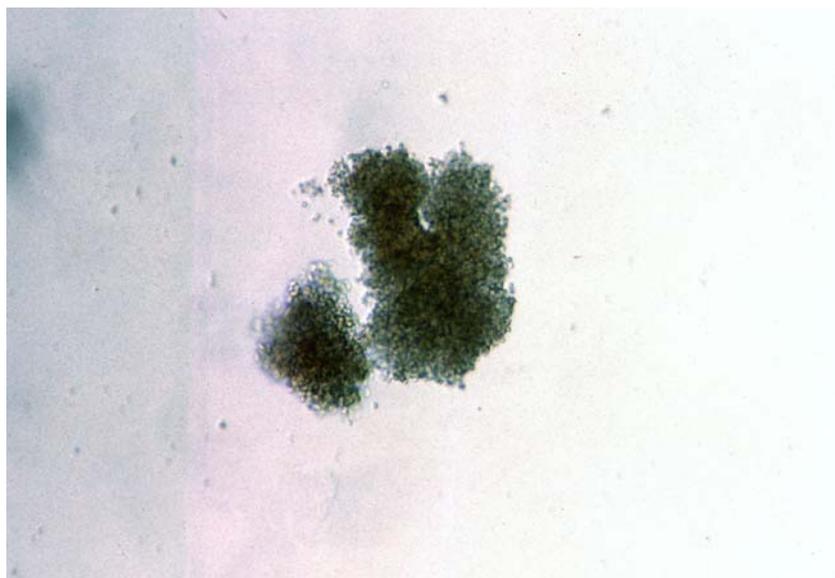


**Abb. 8:** *Antiproliferativer Effekt von FTI-277 auf das Koloniewachstum: Mittelwerte aus sieben Versuchen*

Auch morphologisch betrachtet sah man deutliche FTI-induzierte Effekte. So waren die Kolonien der mit FTI behandelten Zellen regelmäßig kleiner als die Kolonien der Zellen, die unbehandelt blieben oder nur dem Lösungsmittel ausgesetzt worden waren (vgl. Abb. 9 und 10).



**Abb. 9:** ***Einfluss der FTI-Behandlung auf die Größe der Kolonien:***  
*BFU-E-Kolonie nach Behandlung mit 20  $\mu$ M FTI; Inkubationszeit in Methocult SF H4436 mit FTI-277: 11 Tage bei 37°C; Vergrößerung: 63fach*



**Abb. 10:** ***Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Größe der Kolonien:***  
*BFU-E-Kolonie nach elftägiger Behandlung mobilisierter Knochenmarks-Stammzellen mit 20  $\mu$ M DMSO in Methocult SF H4436; Vergrößerung 63fach*

Da die in 3.2.1 beschriebenen Versuche mit DMSO einen sehr deutlichen Effekt des Lösungsmittels auf das Koloniewachstum zeigten, DMSO ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  sogar eindeutig zytotoxisch auf die Knochenmarks-Stammzellen wirkte, können diese Effekte nicht als ausschließlich durch den Hemmstoff ausgelöste Inhibition der Koloniebildung gewertet werden. Der Anteil des Hemmstoffes am Gesamteffekt lässt sich zumindest annäherungsweise aus dem Quotienten der Koloniezahl bei Behandlung mit FTI und derjenigen bei Zugabe von DMSO bei jeweils gleicher Konzentration ermitteln. Demnach machte sich erst ab einer FTI-Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  ein deutlicher Hemmstoff induzierter Rückgang der Koloniezahl bemerkbar. Bei den niedrigeren Konzentrationen erscheint die Wachstumshemmung vor allem durch den zytotoxischen Effekt des DMSO bedingt zu sein (siehe Abb. 11).

Nach Durchführung einer Kovarianzanalyse erwiesen sich die beobachteten Effekte von DMSO und FTI in den vorliegenden Versuchsreihen als höchst signifikant mit  $p < 0,0001$ .

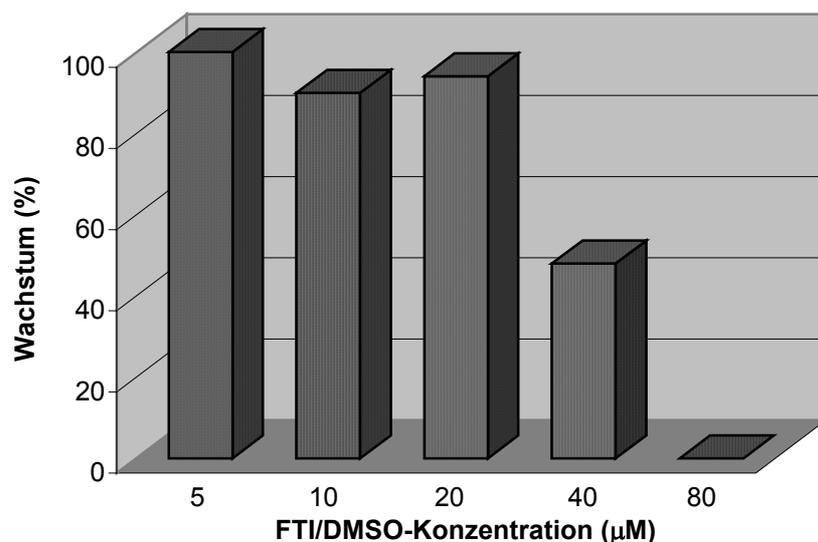


Abb. 11:

**Koloniebildungsrate von mobilisierten Knochenmarks-Stammzellen nach Behandlung mit FTI bezogen auf die als 100% festgelegte Lösungsmittelkontrolle:**  
Mittelwerte aus sieben Versuchen.

Der Versuch durch die Bildung dieses Quotienten den additiven Effekt von DMSO auf die Hemmung durch FTI auszuschalten ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn zwischen beiden Agenzien keine Wechselwirkungen im Sinne einer Verstärkung oder Abschwächung der Potenz des einen Partners in Gegenwart des anderen, zu erwarten sind. Solche waren zwar nach statistischer Prüfung eher unwahrscheinlich, konnten aber dennoch nicht ausgeschlossen werden.

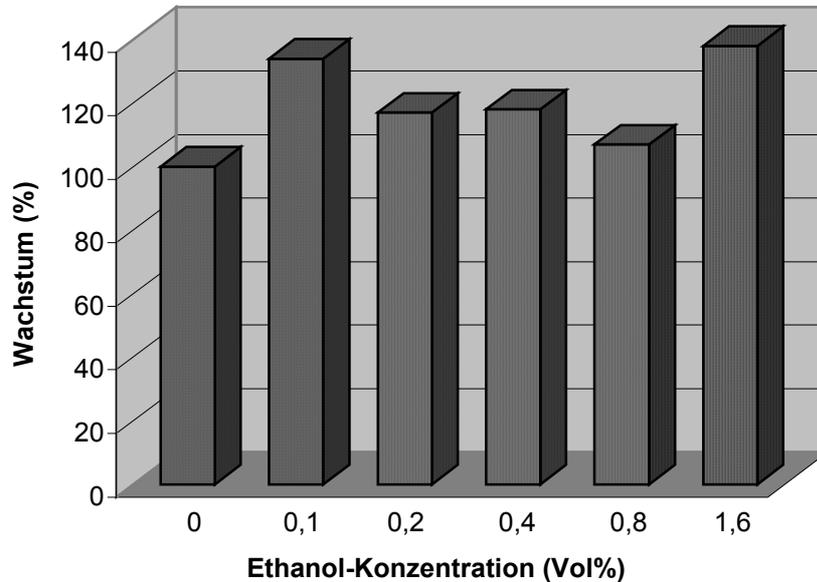
Um diese Möglichkeit zu überprüfen und um den Effekt des Lösungsmittels zu reduzieren, wurde bei den folgenden Versuchen auf die Verwendung von Ethanol zur Herstellung der FTI-Stammlösung umgestellt. Aus Zellmaterial von drei Leukapheresen wurden nach dem gleichen Arbeitsprotokoll wie zuvor bei Verwendung von DMSO erneut CFUc-Assays angesetzt. Dementsprechend wurden zur Ermittlung des Einflusses von Ethanol analog zu den obigen Versuchen ebenfalls die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol) mitinkubiert.

### **3.3 Einfluss von FTI-277 in Ethanol auf das Koloniewachstum**

#### **3.3.1 Effekt von Ethanol auf das Koloniewachstum**

Wie schon zuvor bei den Versuchen mit DMSO beobachtet werden konnte, kam es auch bei Zugabe von Ethanol bei der niedrigsten Hemmstoff- bzw. Lösungsmittelkonzentration zu einer Zunahme der Koloniezahl, die allerdings nicht besonders stark ausgeprägt war (siehe Abb. 12). Im Gegensatz zu den Versuchen mit DMSO zeigte sich aber auch für alle weiteren Konzentrationen eine Steigerung der Wachstumsrate um zwischen 7% bei 0,8 Vol% Ethanol und 38% bei der höchsten Ethanol-Konzentration (1,6 Vol%). Eine statistische Kovarianzprüfung ergab allerdings keine Signifikanz für die beobachtete gesteigerte Koloniebildung. Dies bestätigte insgesamt betrachtet, dass sich

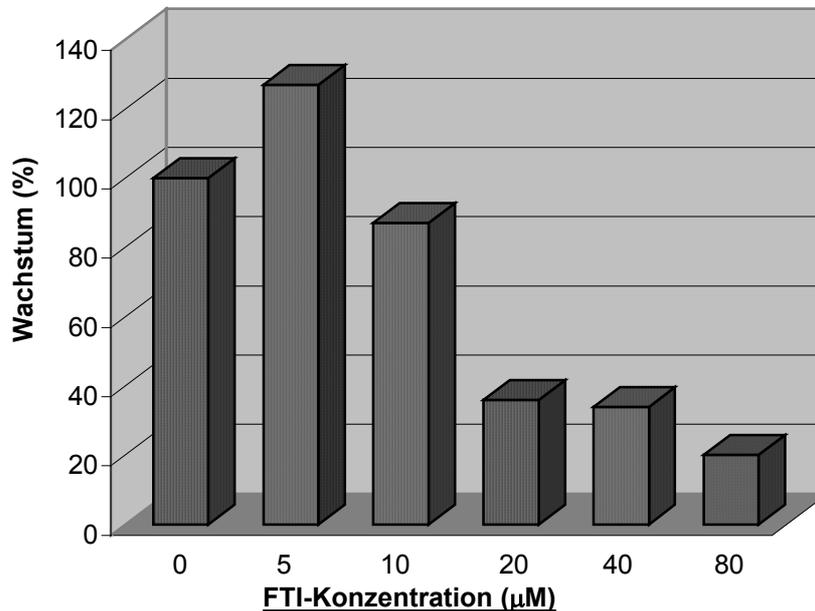
Ethanol verglichen mit DMSO besser als Lösungsmittel eignet, insbesondere da kein zytotoxischer Effekt auf die Koloniebildung im CFUc-Assay erkennbar war.



*Abb. 12: Effekt von Ethanol auf das Koloniewachstum im CFUc-Assay (ohne Hemmstoffzugabe): Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (jeweils Dreifachbestimmung)*

### 3.3.2 Antiproliferativer Effekt von FTI-277 in Ethanol

Auch der in Ethanol gelöste Farnesyltransferaseinhibitor zeigte einen deutlichen Effekt auf die Koloniebildung. Bei 10  $\mu$ M FTI-277 kam es in diesen Versuchen zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung auf zunächst 77%. Bei Zugabe von 20 bzw. 40  $\mu$ M sank das Wachstum weiter auf 42% bzw. 38% ab, der maximale Effekt der Enzyminhibition zeigte sich bei der höchsten FTI-Konzentration (80  $\mu$ M), hier betrug die Koloniezahl nur noch 25% der ungehemmten Kontrolle (siehe auch Abb. 13). Da die Lösungsmittelkontrollen verdeutlichten, dass Ethanol selbst keine zytotoxischen Effekte hatte, ließ sich der hier beobachtete Rückgang der Koloniebildung allein auf die Wirkung des Farnesyltransferaseinhibitors zurückführen.



**Abb. 13:** *Antiproliferativer Effekt von FTI-277 auf das Koloniewachstum: Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (jeweils Dreifachbestimmung)*

Auch zu diesem Versuch wurde eine statistische Prüfung auf das Vorhandensein von Wechselwirkungen zwischen Ethanol und FTI durchgeführt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit DMSO ist die Wahrscheinlichkeit dafür hier sehr groß. Ethanol führte zu einer deutlichen Abschwächung der Potenz der Enzyminhibition durch FTI und damit zu einer verminderten Hemmung der Koloniebildung. Besonders deutlich war diese Wechselwirkung bei der höchsten Konzentration FTI zu erkennen, für die sich bei in DMSO gelöstem FTI eine absolute Wachstumshemmung (100%) im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ergeben hatte, während bei Zugabe von 80 µM in Ethanol gelöstem FTI noch 22% der Kolonien im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle wuchsen (entsprach einer Hemmung von nur 78%). Der Einfluss von FTI auf hämatopoetische Stammzellen war somit bei Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel deutlich geringer.

## **4. Diskussion**

Farnesyltransferaseinhibitoren sind neue therapeutische Substanzen, die in der Lage sind, das Wachstum vieler verschiedener Tumore des Menschen zu verhindern (End et al., 2001; Sepp-Lorenzino et al., 1995). Eine besonders hervorzuhebende Eigenschaft der FTIs ist das Fehlen einer wesentlichen Toxizität in den bisher durchgeführten in vitro und in vivo Studien (Nagasu et al., 1995; Skrzat et al., 1998). Da die meisten derzeit verwendeten Chemotherapeutika dagegen auch erhebliche Effekte auf gesunde Zellen zeigen, wobei das hämatopoetische System besonders häufig betroffen ist, wurde in den vorliegenden Versuchen der Einfluss von FTI-277 auf Knochenmarks-Stammzellen untersucht. Dieser Hemmstoff aus der Untergruppe der Tetrapeptidanaloga hatte sich in vitro und in vivo bereits als potenter Hemmstoff der Ras-Prozessierung erwiesen (Lerner et al., 1995; Sun et al., 1998).

### **4.1 Auswirkungen verschiedener Lösungsmittel im CFUc-Assay**

Die CFUc-Assays mit Knochenmarkszellen aus dem Leukapheresat gesunder Spender wurden, wie bereits beschrieben, mit FTI-277 inkubiert. Dabei wurde der Hemmstoff nach Empfehlung des Herstellers in DMSO gelöst. Da dieses Lösungsmittel allerdings selbst zytotoxisch wirken kann, wurden, um diese Effekte quantifizieren zu können, neben den FTI-Assays gleichzeitig auch Schalen mit der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration ohne Hemmstoffzugabe angesetzt. Die beobachteten DMSO-Wirkungen waren beträchtlich, denn das Koloniewachstum ging ab einer Lösungsmittelkonzentration von 0,8 Vol% deutlich zurück (47%-ige Hemmung der Koloniebildung). Bei 1,6 Vol% betrug die Koloniezahl nur noch 6% im Vergleich zur völlig unbehandelten Kontrolle. Diese DMSO-Konzentration entspricht der Menge Lösungsmittel, die zur Herstellung einer 80 µM FTI-Lösung notwendig ist. In den unteren Konzen-

trationsbereichen (0,1 - 0,4 Vol%) wurde das Koloniewachstum ebenfalls durch DMSO beeinflusst, allerdings kam es hier zu einer Stimulation bis zu 124%.

Auch Morgan et al. (2001) untersuchten den Effekt von DMSO in einem ähnlichen Assay mit aufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen. Das Koloniewachstum war hier ebenfalls bis zu der DMSO-Konzentration, die zur Herstellung einer 20 µM-FTI-Lösung benötigt wurde, zunächst stärker, um dann bei weiterer Verdopplung der DMSO-Konzentration auf 80% abzufallen. Ein stimulatorischer Effekt von DMSO wurde auch bei den von A. Janessa (2002) durchgeführten Koloniebildungs-Assays mit einer Neuroblastomzelllinie (Kelly) beobachtet. In Gegenwart von niedrig konzentriertem DMSO fanden sich auch hier mehr Kolonien als in der unbehandelten Kontrolle.

Aufgrund dieses nachgewiesenen erheblichen Einflusses von DMSO auf die Knochenmarkszellen, wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten weiteren Versuchen (siehe 3.3.1) ein anderes Lösungsmittel für FTI-277 verwendet. Ausgetestet wurde Ethanol, das in der verwendeten Konzentration keinen zytotoxischen Einfluss auf das Koloniewachstum hatte. Die in allen Konzentrationsbereichen gefundene leichte Wachstumsstimulation war statistisch nicht signifikant. Ethanol eignet sich als Lösungsmittel für FTI-277 somit eindeutig besser, da nur ein Lösungsmittel, das selbst keine Effekte zeigt, eine quantitative Beurteilung der Hemmung durch FTIs erlaubt. Zudem zeigte sich sowohl in den CFUc-Assays als auch in den im selben Labor durchgeführten Versuchen mit der Neuroblastomzelllinie Kelly (Janessa, 2002), dass die FTI-Wirksamkeit durch den Wechsel des Lösungsmittels nicht signifikant verändert wurde.

Als weitere mögliche Alternative bietet sich auch Methanol als Lösungsmittel an, das in den Untersuchungen von Emanuel et al. (2000) ähnlich wie Ethanol das Koloniewachstum von Knochenmarkszellen nicht signifikant beeinflusste. Allerdings verwendete diese Arbeitsgruppe in ihren Versuchsreihen einen anderen FTI, so dass die gefundenen Ergebnisse keine zuverlässige Aussage über die Wirksamkeit von FTI-277 bei Verwendung von Methanol als Lösungsmittel erlauben.

#### **4.2 Einfluss von FTI-277 auf das Koloniewachstum im CFUc-Assay**

Die im Abschnitt 3.2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum der Kolonien im CFUc-Assay durch FTI-277 konzentrationsabhängig unterdrückt wird. Die genaueste Aussage über die Wirkung von FTI-277 lässt sich aus der Abb. 11 herleiten, da hier über eine Quotientenbildung aus  $[FTI]/[DMSO]$  die zuvor beschriebenen deutlichen Effekte des DMSO rechnerisch annähernd eliminiert werden konnten. Dies ist möglich, da Wechselwirkungen zwischen DMSO und FTI statistisch zwar nicht auszuschließen, aber äußerst unwahrscheinlich sind. Demzufolge ergab sich bei Zugabe von FTI-277 in Konzentrationen von 5-20  $\mu\text{M}$  lediglich eine Reduktion der Koloniebildung auf ca. 90%. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 40  $\mu\text{M}$  ergab eine 50%-ige Hemmung. 80  $\mu\text{M}$  verhinderten die Koloniebildung nach elftägiger Inkubation vollständig.

Andere Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit den Auswirkungen verschiedener FTIs auf hämatologische Zellen gesunder Spender beschäftigten, kamen zu folgenden Ergebnissen: Morgan et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen von in DMSO gelöstem FTI-277 und anderen FTIs auf 19 verschiedene Leukämiezelllinien (AML und CML). Um die Spezifität der Inhibitoren beurteilen zu können, verglichen sie diese Ergebnisse mit den Beobachtungen in Assays, in denen gesunde aufgereinigte  $CD34^+$ -Zellen mit den selben Substanzen behandelt wurden. Dabei fiel vor allem für FTI-277 eine starke Toxizität auf. Die  $IC_{50}$  lag bei 10  $\mu\text{M}$ . Eine weitere Verdoppelung der FTI-Konzentration auf 20  $\mu\text{M}$  hemmte die Koloniebildung bereits zu 80%. Damit reagierten die  $CD34^+$ -Zellen wesentlich empfindlicher als die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten nicht weiter separierten peripheren Blutstammzellen (Leukapheresat).

Andere Substanzen zeigten ähnlich starke toxische Effekte. Nach Behandlung von Knochenmarkszellen mit dem bei Tumorzellen hochpotenten FTI SCH66336 reduzierte sich die Koloniezahl bereits bei 5  $\mu\text{M}$  auf 60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Peters et al., 2001). Für die Substanz L-

744,832 zeigten Maghoub et al. (1999), dass bereits ab 10  $\mu\text{M}$  keine CFU-GMs im Assay mit hämatologischen Zellen (mononukleäre Zellen aus der fetalen Mäuseleber) wachsen.

Bei den beiden Peptidomimetika L-739,749 und L-744,828 kam es im Soft-Agar bei ca. 10  $\mu\text{M}$  zur halbmaximalen Hemmung des Wachstums der aus dem Knochenmark gesunder Erwachsener gesammelten Stammzellen, dies ebenfalls nach vorausgegangener GM-CSF-Stimulation. Eine weitere Dosisverdopplung führte dann bereits zur 75%-igen Hemmung der Koloniebildung (Emanuel et al., 2000). Anzumerken ist allerdings, dass diese Arbeitsgruppe nicht DMSO, sondern Methanol zur Herstellung der FTI-Stammlösung verwendete.

Somit stimmen die Ergebnisse aus Versuchen mit verschiedenen anderen FTIs verglichen mit den von Morgan et al. (2001) beschriebenen Beobachtungen zu FTI-277 weitgehend überein. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen betrug die  $\text{IC}_{50}$  für FTI-277 hingegen etwa das Vierfache, die Knochenmarkszellen waren hier also deutlich weniger empfindlich.

Die im Zuge dieser Dissertation durchgeführten Versuche zeigten außerdem, dass die mit FTI-277 behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten oder nur im Lösungsmittel inkubierten Leukapheresezellen nicht nur weniger, sondern auch kleinere Kolonien hervorbrachten (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies ist als antiproliferativer Effekt des Farnesyltransferaseinhibitors anzusehen und ein Phänomen, das auch von anderen Arbeitsgruppen sowohl für mit FTI-inkubierte leukämische als auch für gesunde hämatologische Zellen beschrieben wurde (Emanuel et al., 2000; Maghoub et al., 1999). Aber auch die Kolonien von 14 nicht hämatologischen Tumorzelllinien waren nach Behandlung mit einem Farnesyltransferaseinhibitor (B956) nicht nur weniger zahlreich, sondern erreichten eine deutlich geringere Größe (Nagasu et al., 1995). Insgesamt gesehen ist daher zu befürchten, dass dieser FTI-induzierte Effekt bei vielen verschiedenen Zelltypen auftreten würde und somit potentiell auch gesundes Gewebe geschädigt werden könnte.

### **4.3 Vergleich der Empfindlichkeit von hämatopoetischen Stammzellen und Tumorzellen**

Zur Beurteilung einer klinischen Anwendbarkeit der FTIs ist es nun wichtig, diese Ergebnisse für gesunde Knochenmarkszellen mit den Effekten der FTIs auf maligne hämatologische Zellen zu vergleichen.

Für verschiedene AML-Zelllinien wurden für FTI-277  $IC_{50}$  zwischen ca. 5 und 30  $\mu M$  und für den Inhibitor FPT-3 zwischen 10 und 30  $\mu M$  ermittelt (Morgan et al., 2001). Bei Knochenmarkszellen von an JMML erkrankten Patienten reichten bereits 10  $\mu M$  der FTIs L-739,749 bzw. L-744,828 aus, um das Koloniewachstum der Tumorzellen vollständig zu unterbinden (Emanuel et al., 2000). Außerordentlich hochpotent konnte der Hemmstoff SCH66336 bei Peters et al. (2001) das Wachstum  $CD34^+$ -Zellen von Patienten mit bekannter CML hemmen. Es genügten hier bereits zwischen 0,5 und 1  $\mu M$  für eine halbmaximale Hemmung der Koloniebildung, die 100%ige Inhibition gelang bei einer FTI-Konzentration von 5  $\mu M$ . Die für hämatopoetische Zellen gesunder Spender gefundenen  $IC_{50}$  liegen somit im Vergleich zu leukämischen Zellen für die FTIs SCH66336, L-739,749 und L-744,828 um bis zu Faktor zehn höher. Für FTI-277 ist das therapeutische Fenster allerdings kleiner.

Die zahlreichen in vitro-Versuche mit nicht-hämatologischen Tumorzellen ergaben in Abhängigkeit von Tumorzelltyp, dessen Status der Ras-Mutation, Versuchsaufbau und verwendetem Hemmstoff eine große Bandbreite für die  $IC_{50}$  von 0,05 bis 80  $\mu M$  (End et al., 2001; Nagasu et al., 1995; Sepp-Lorenzino et al., 1995). Für den auch in den vorliegenden Versuchen verwendeten FTI-277 werden in der Literatur in vitro geltende halbmaximale Inhibitorkonzentrationen von 0,1 bis 10  $\mu M$  angegeben (Miquel et al., 1997; Sun et al., 1995). Etwas höher lag die  $IC_{50}$  allerdings in einem ebenfalls im Labor der Kinderchirurgie in Tübingen durchgeführten Versuch mit den Neuroblastomzelllinien IMR5 und Kelly. Hier zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Wachstumshemmung durch FTI-277, allerdings ging die Zahl der Tumorkolonien erst bei 20  $\mu M$  auf 45% (Kelly) bzw. 38% (IMR5) und bei 40  $\mu M$

schließlich auf 15% (Kelly) bzw. 9% (IMR5) im Vergleich zur nur mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrolle zurück (Janessa, 2002). Damit liegen die Konzentrationen an FTI-277, die zur Tumorreduktion notwendig sind, unter denjenigen, bei denen starke toxische Effekte an Knochenmarkszellen zu beobachten sind. Für andere FTIs ist diesbezüglich leider keine Aussage möglich, denn es fehlen passend zu den gefundenen  $IC_{50}$  für nichthämato-logische Tumorzellen (0,05 - 80  $\mu$ M) die direkten Vergleichsdaten der jeweiligen Hemmstoffe aus Versuchen mit gesunden hämatologischen Zellen.

In vivo-Modelle bestätigten zum einen die hohe Wirksamkeit der neuen Substanzen gegen unterschiedliche Tumore, darunter u.a. Malignome des Pankreas, Kolons sowie der Harnblase, Brust, Lunge und Prostata (Liu et al., 1998; Kohl et al., 1995; Sun et al., 1995), zum anderen wurde über makroskopische und in einem Fall auch histologische Untersuchungen eine äußerst geringe Toxizität der Farnesyltransferaseinhibitoren beobachtet (Kohl et al., 1995; Pollack et al., 1999; Sun et al., 1995). In der Zwischenzeit wurden auch erste klinische Studien mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Hier zeigten sich allerdings doch auch substanzspezifische Nebenwirkungen, die häufig das blutbildende System betrafen.

Britten et al. (2001) führten eine Phase I-Studie mit einem Peptidomimetikum an 25 Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren durch. Dabei verabreichten sie den FTI L-778,123 in insgesamt 51 Zyklen über je sieben Tage in dreiwöchigem Rhythmus als kontinuierliche i.v.-Infusion. Absolut dosislimitierende Toxizitäten (DLT) traten bei einer Tagesdosis von 2240 mg auf. Sie umfassten schwere Thrombozytopenien (Grad 4), Müdigkeit und eine deutliche QT-Strecken-Verlängerung im EKG. Durch eine Dosisreduktion auf 1120 mg waren die Nebenwirkungen bei allen bis auf sieben Patienten akzeptabel und beherrschbar. Die Myelosuppression war zwar weiterhin vorhanden, aber nur noch mild bis mäßig. Gleichzeitig durchgeführte pharmakokinetische Untersuchungen zeigten, dass die Plasmakonzentration im steady-state einer FTI-Konzentration von  $8,09 \pm 3,11 \mu$ M entsprach und damit nur gering über der in präklinischen Studien ermittelten  $IC_{50}$  von bis zu 5,35  $\mu$ M lag.

Zwei andere Arbeitsgruppen behandelten Patienten mit pathologisch gesicherten soliden Tumoren (u.a. Karzinome der Lunge, Leber, Brust und des Dickdarms) mit dem FTI SCH66336 und verabreichten zwischen 25 und 400 mg b.i.d. entweder kontinuierlich (bis zu 280 Tage lang) oder intermittierend (alle drei Wochen für sieben Tage). Es traten jeweils bei einer Dosis von 400 mg b.i.d. dosislimitierende Nebenwirkungen auf. Diese betrafen in beiden Fällen das blutbildende System, die Spannweite reichte von viertgradigen bis hin zu kurzen, milden Neutro- und Thrombozytopenien. Darüber hinaus traten vor allem Müdigkeit und gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöen auf (Adjei et al., 2000; Eskens et al., 2001). Selbst eine Dosisreduktion auf 300 mg führte bei Eskens et al. (2001) weiterhin zu schweren Neutropenien (Grad 4), Müdigkeit, Übelkeit und Diarrhö. Keiner der mit 300 oder 400 mg b.i.d. behandelten Patienten konnte aufgrund dieser toxischen Nebeneffekte länger als 28 Tage mit SCH66336 im Rahmen der Studie therapiert werden. Die empfohlene Tagesdosis für Phase II-Studien wurde von dieser Arbeitsgruppe demzufolge auf 2 x 200 mg herabgesetzt, da hier selbst bei neunmonatiger Behandlung keine Myelosuppression mehr auftrat. Leider wurde nur in der Studie von Adjei et al. (2000) ein Therapieansprechen der Tumore beobachtet. Bei einem Patienten kam es zum Rückgang der Metastasengröße und bei sieben konnte eine Progression für einen Zeitraum von 5-10 Behandlungszyklen verhindert werden.

Ähnliche Nebenwirkungen ergaben sich auch aus den Phase I-Studien mit R115777. Auch hier schien die Myelosuppression, die bei einer Tagesdosis von 600 mg begann, vorrangige DLT zu sein. Besonders zum Tragen kam sie bei kontinuierlichem Behandlungsschema. Sie erwies sich allerdings stets als reversibel und im Rahmen der Studie beherrschbar. Weitere häufige Nebenwirkungen waren wiederum Müdigkeit und gastrointestinale Störungen, aber auch Dyspnoe, Neuropathien, Hypotension und Kopfschmerzen, so dass die empfohlene Dosis für weitere Studien auf 300 mg b.i.d. bei kontinuierlicher und 300 bis 500 mg b.i.d. bei intermittierender Therapie festgelegt wurde. Auch für R115777 wurde im Zuge dieser Untersuchungen nicht über zufriedenstellende Tumorantworten berichtet (Punt et al., 2001; Zujewski et al., 2000).

Karp et al. (2001) veröffentlichten weitere Therapieergebnisse mit diesem Farnesyltransferaseinhibitor. Sie untersuchten allerdings an Leukämie erkrankte Patienten (AML, ALL oder CML) und verabreichten ihnen zwischen 100 und 1200 mg zweimal täglich über 21 Tage mit anschließender 28 bis 31-tägiger Therapiepause in bis zu vier Gesamtzyklen. Eine Myelosuppression war hier zwar nicht dosislimitierend, trat aber dennoch regelmäßig und dosisabhängig auf. Ebenso dosisabhängig war auch die antileukämische Wirkung von R115777 und es wurde bestätigt, dass die Substanz das Knochenmark bereits in kleinen Dosen erreicht. Zudem ergaben pharmakokinetische Untersuchungen, dass sich der FTI bei höheren Konzentrationen (600 bis 900 mg) unter steady-state Bedingungen sogar im Knochenmark anreichert, da die hier gemessenen FTI-Konzentrationen über den zugehörigen Plasmakonzentrationen lagen.

Deutlich wurde also, dass die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gefundenen toxischen Effekte auf Knochenmarks-Stammzellen durchaus klinische Relevanz besitzen und die in ersten Phase I-Studien häufig beobachtete Myelosuppression zumindest teilweise erklären können. Würde die von Karp et al. (2001) beschriebene Substanzanreicherung im Knochenmark auch für andere Hemmstoffe bestätigt werden, ließe dies zwar vor allem bei Langzeitbehandlung auf eine höhere Ansprechrate von leukämischen Zellen hoffen, würde aber gleichzeitig auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer verstärkten Knochenmarkstoxizität beim Einsatz gegen solide Tumoren beinhalten.

#### 4.4 Ausblick

Farnesyltransferaseinhibitoren werden weiterhin Gegenstand der Forschung bleiben. Dies nicht nur, weil die bisherigen Ergebnisse in weiteren Studien bestätigt werden müssen, sondern beispielsweise auch, um doch noch den Wirkmechanismus dieser Substanzen und deren Angriffspunkte in der Zelle zu verstehen.

Parallel zu den momentan stattfindenden Phase I-Studien haben auch schon erste Untersuchungen im Hinblick auf eine spätere Anwendung der FTIs in Kombination mit anderen bereits etablierten Chemotherapeutika begonnen. Über synergistische Wirkungen mit Taxanen bzw. eine Sensitivierung Paclitaxel-resistenter Tumore durch den FTI SCH66336 *in vitro* sowie in Versuchen mit Mäusen wurde bereits berichtet (Moasser et al., 1998; Shi et al., 2000). Ebenfalls additiv oder synergistisch waren die Effekte von SCH66336 und Cisplatin bei zwei verschiedenen Tumorzelllinien (Adjei et al., 2001).

Vermutlich wird sich auch das Anwendungsgebiet der FTIs weiter ausdehnen, denn bereits jetzt ist die Chemotherapie bei weitem nicht mehr der einzig denkbare Einsatzbereich. Ebenfalls im Rahmen der Therapie maligner Erkrankungen könnten sie darüber hinaus in der Radiotherapie eingesetzt werden. Mehrere FTIs (darunter auch FTI-277) konnten die Radiosensitivität verschiedener Tumore *in vitro* und in Tierversuchen steigern, höchstwahrscheinlich da besonders strahlenresistente Tumore aktivierte Onkogene, u.a. auch Ras, vermehrt exprimieren (Bernhard et al., 1996; Cohen-Jonathan et al., 2001; Jones et al., 2001).

Nachdem sich herausstellte, dass einige Parasiten, wie Trypanosomen, Plasmodien oder Leishmanien, auf FTasen angewiesen sind, könnten FTIs auch als neue Therapieoption im Kampf gegen die durch diese Erreger verursachten Erkrankungen in Frage kommen (Chakrabati et al., 1998; Ohkanda et al., 2001; Yokoyama et al., 1998).

Nicht zuletzt scheint es auch in der Ophthalmologie bei der Behandlung kornealer Wunden (z.B. nach Verätzung) Anwendungsmöglichkeiten für FTIs zu

geben. Im Tierversuch konnten Farnesyltransferaseinhibitoren die Einwanderung von Entzündungszellen (v.a. Makrophagen) selektiv inhibieren. Auch Ödembildung, Neovaskularisierung und Hornhauttrübung waren als Folge der Behandlung mit FTIs bei guter Epithelialisierung der Kornea deutlich geringer (Sonoda et al., 1998).

Im Hinblick auf die Toxizität der FTIs bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse die derzeit noch laufenden Studien mit anderen Substanzen, darunter auch FTI-277, bezüglich der substanzspezifischen Nebenwirkungen liefern und ob die jetzt ausgetesteten Tagesdosen ausreichen, um bei der Behandlung von Tumorpatienten eine Tumorreduktion zu erzielen. Ebenso gespannt kann man auf die in nächster Zukunft folgenden Phase II- und dann auch Phase III-Studien schauen. Es bleibt zu hoffen, dass die vielversprechenden Ergebnisse aus den präklinischen Studien bestätigt werden können und damit die Farnesyltransferaseinhibitoren einerseits aufgrund ihrer guten Wirksamkeit gegen eine Vielzahl verschiedener Malignome und andererseits aufgrund ihres im Vergleich zu bisher eingesetzten Substanzen günstigen Nebenwirkungsprofils auch in anderen Bereichen, vielleicht sogar mehr als nur eine therapeutische Alternative darstellen werden.

## 5. Zusammenfassung

Farnesyltransferaseinhibitoren repräsentieren eine neue Gruppe selektiver Chemotherapeutika. Sie erwiesen sich im Einsatz gegen unterschiedliche Malignome in bisher durchgeführten präklinischen Studien als hochpotent. Ihre antineoplastische Wirkung erklärt sich über die Hemmung der in vielen Zellen stattfindenden Farnesylierungsreaktionen, welche für eine Vielzahl von zellulären Proteinen ein entscheidender Schritt im Rahmen posttranslationeller Modifikationen darstellen. Die ausbleibende Farnesylierung führt letztlich u.a. dazu, dass aktivierte Onkogene ihre Funktion verlieren oder sogar in ihren nicht transformierten Phänotyp zurückversetzt werden. Entwickelt wurden die FTIs als Ras-Inhibitoren. Inzwischen weiß man allerdings, dass dieses in menschlichen Tumoren am häufigsten mutierte Onkogen nur ein Angriffspunkt unter vielen ist und vermutlich eher am Ende einer durch FTIs ausgelösten Kaskade inaktiviert wird, an deren Anfang ein bisher noch nicht identifiziertes anderes Protein steht.

Neben ihrem breiten Wirkspektrum machten FTIs vor allem wegen ihrer im Rahmen von in vitro- und in vivo (Mausmodelle)-Untersuchungen beobachteten sehr geringen Toxizität auf sich aufmerksam. Diese Eigenschaft unterscheidet sie wesentlich von der Mehrzahl der bisher eingesetzten antineoplastischen Wirkstoffe, bei denen vor allem eine Myelosuppression häufig als dosislimitierende Nebenwirkung auftritt.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die geringe Zytotoxizität nicht wie bisher im Rahmen der Behandlung von Tumor-tragenden Mäusen, sondern an intakten Knochenmarkszellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender zu überprüfen. Dazu wurden die Zellen in CFUc-Assays mit dem peptidomimetischen FTI-277 inkubiert und die Zahl der aus hämatologischen Vorläuferzellen entstandenen Kolonien anschließend nach elftägiger Inkubation ausgezählt.

Durch den Vergleich des Koloniewachstums der allein mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen mit völlig unbehandelten Kontrollassays zeigte sich, dass DMSO selbst zytotoxisch wirkt und ab einer Konzentration von 0,8 Vol% zu einem deutlichen Rückgang der Koloniebildung im Assay führte. DMSO ist

daher als Lösungsmittel für FTI-277 eher ungeeignet. Für weitere Versuche wurde deshalb Ethanol als Lösungsmittel ausgetestet. Im Gegensatz zu DMSO ergaben sich hier keine signifikanten Lösungsmittel-induzierten Effekte, so dass Ethanol für Untersuchungen der FTI-Wirksamkeit eher zu empfehlen ist.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Zytotoxizität von FTI-277 auf Knochenmarkszellen zeigte sich in den CFUc-Assays im Bereich von 5-80  $\mu\text{M}$  eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Koloniebildung mit einer  $\text{IC}_{50}$  von 40  $\mu\text{M}$ . Eine weitere Dosisverdopplung auf 80  $\mu\text{M}$  reichte aus, um die Bildung hämatopoetischer Kolonien vollständig zu inhibieren. Außerdem waren die einzelnen Kolonien in Gegenwart des FTIs kleiner als diejenigen der unbehandelten Kontrollassays (DMSO oder Ethanol).

Die im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellten Effekte von FTI-277 auf gesunde Knochenmarkszellen wurden zwischenzeitlich auch in ersten Phase I-Studien mit verschiedenen FTIs bestätigt.

## 6. Literaturverzeichnis

Adamson, P.; Paterson, H.F.; Hall, A. (1992)  
Intracellular localization of the P21rho proteins  
J. Cell. Biol., 119, 617-627

Adjei, A.A.; Davis, J.N.; Bruzek, L.M.; Erlichman, C.; Kaufmann, S.H. (2001)  
Synergy of the Protein Farnesyltransferase Inhibitor SCH66336 and Cisplatin in  
Human Cancer Cell Lines  
Clin. Cancer Res., 7, 1438-1445

Adjei, A.A.; Erlichman, C.; Davis, J.N.; Cutler, D.L.; Sloan, J.A.; Marks, R.S.;  
Hanson, L.J.; Svingen, P.A.; Atherton, P.; Bishop, W.R.; Kirschmeier, P.;  
Kaufmann, S.H. (2000)  
A Phase I Trial of the Farnesyl Transferase Inhibitor SCH66336: Evidence for  
Biological and Clinical Activity  
Cancer Res., 60, 1871-1877

Barbacid, M. (1987)  
ras genes  
Ann. Rev. Biochem., 56, 779-827

Barbacid, M. (1990)  
ras oncogenes: their role in neoplasia  
Eur. J. Clin. Invest., 20, 225-235

Barrington, R.E.; Subler, M.A.; Rands, E.; Omer, C.A.; Miller, P.A.; Hundley,  
J.E.; Koester, S.K.; Troyer, D.A.; Bearss, D.J.; Conner, M.W.; Gibbs, J.B.;  
Hamilton, K.; Koblan, K.S.; Mosser, S.D.; O'Neill, T.J.; Schaber, M.D.;  
Senderak, E.T.; Windle, J.J.; Oliff, A.; Kohl, N.E. (1998)  
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., 18, 85-92

Bernard, E.J.; Kao, G.; Cox, A.D.; Sebti, S.M.; Hamilton, A.D.; Muschel, R. J.;  
McKenna, W. G. (1996)  
The Farnesyltransferase Inhibitor FTI-277 Radiosensitizes H-ras-transformed  
Rat Embryo Fibroblasts  
Cancer Res., 56, 1727-1730

Bos, J.L. (1989)  
ras Oncogenes in Human Cancer: A Review  
Cancer Res., 49, 4682-4689

Britten, C.B.; Rowinsky, E.K.; Soignet, S.; Patnaik, A.; Yao, S.L.; Deutsch, P.; Lee, Y.; Lobell, R.B.; Mazina, K.E.; McCreery, H.; Pezzuli, S.; Spriggs, D. (2001)

A phase I and pharmacological study of the farnesyl protein transferase inhibitor L-778,123 in patients with solid malignancies

Clin. Cancer Res., 7, 3894-3903

Casey, P. J. (1992)

Biochemistry of protein prenylation

J. Lipid. Res., 33, 1731-1740

Casey, P.J.; Seabra, M.C. (1996)

Protein prenyltransferases

J. Biol. Chem., 271, 5289-5292

Casey, P.J.; Solski, P.A.; Channing, J.D.; Buss, J.E. (1989)

p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8323-8327

Casey, P.J.; Thissen, J.A.; Moomaw, J.F. (1991)

Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8631-8635

Chakrabarti, D.; Azam T.; DeVecchio, C.; Qiu, L.; Park, Y.I.; Allen, C.M. (1998)

Protein prenyl transferase activities of Plasmodium falciparum

Mol. Bioch. Parasitol., 94, 175-184

Cohen-Jonathan, E.; Evans, S.M.; Koch, C.J.; Muschel, R.J., McKenna, W.G.; Wu, J.; Bernhard, E.J. (2001)

The Farnesyltransferase Inhibitor L744,832 Reduces Hypoxia in Tumors Expressing Activated H-ras

Cancer Res., 61, 2289-2293

Cox, A.D.; Der, C.J. (1997)

Farnesyltransferase Inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras?

Biochemica et Biophysica Acta, 1333, F51-71

Crespo, N.C.; Ohkanda, J.; Yen, T.J.; Hamilton, A.D; Sebti, S.M. (2001)

The Farnesyltransferase Inhibitor FTI-2153 Blocks Bipolar Spindle Formation and Chromosome Alignment and Causes Prometaphase Accumulation during Mitosis of Human Lung Cancer Cells

J. Bio. Chem., 276, 16161-16167

Daniel, P.T.; Pezzutto, A., Dörken, B. (1999)

Humoral immunotherapy and the use of monoclonal antibodies, 425-461

In: Degos, L; Linch, D.C.; Löwenberg, B.: Textbook of Malignant Haematology  
Martin Dunitz Ltd., London

Du, W.; Lebowitz, P. F.; Prendergast, G. C. (1999)  
Cell Growth Inhibition by Farnesyltransferase Inhibitors Is Mediated by Gain of Geranylgeranylated RhoB  
Mol. Cell. Biol., 19, 1831-1840

Du, W.; Prendergast, G. C. (1999)  
Geranylgeranylated RhoB Mediates Suppression of Human Tumor Cell Growth by Farnesyltransferase Inhibitors  
Cancer Res., 59, 5492-5496

Eaves, A.C.; Lambie, K. (1995)  
Atlas of Human Hematopoietic Colonies  
StemCell Technologies Inc.

Emanuel, P.D.; Snyder, R.C.; Wiley, T.; Gopurala, B.; Castleberry, R.P. (2000)  
Inhibition of juvenile myelomonocytic leukemia cell growth in vitro by farnesyltransferase inhibitors  
Blood, 95, 639-645

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. (2001)  
Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro  
Cancer Res., 61, 131-137

Epstein, W.W.; Lever, D.; Leining, L.M.; Bruenger, E.; Rilling, H.C. (1991)  
Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9668-9670

Eskens, F.A.; Awada, A.; Cutler, D.L.; deJonge, M.J.; Luyten, G.P.M.; Faber, M.N.; Statkevich, P.; Sparreboom, A.; Verweij, J.; Hanauske, A.R.; Piccart, M. (2001)  
Phase I and Pharmacokinetic Study of the Oral Farnesyl Transferase Inhibitor SCH66336 Given Twice Daily to Patients With Advanced Solid Tumors  
J. Clin. Oncol., 19, 1167-1175

Feldkamp, M.M.; Lau, N.; Guha, A. (1999)  
Growth inhibition of astrocytoma cells by farnesyl transferase inhibitors is mediated by a combination of anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-angiogenic effects  
Oncogene, 18, 7514-7526

Fritz, G.; Just, I.; Kaina, B. (1999)  
Rho GTPases are overexpressed in human tumors  
Int. J. Cancer, 81, 682-687

Garcia, A.M.; Rowell, C.; Ackermann, K; Kowalczyk, J.J.; Lewis, M.D. (1993)  
Peptidomimetic Inhibitors of Ras Farnesylation and Function in Whole Cells  
J. Biol. Chem., 268, 18415-18418

Gibbs, J.B.; Oliff, A. (1997)  
The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37, 143-166

Gibbs, J.B.; Pompliano, D.L.; Mosser, S.D.; Rands, E.; Lingham, R.B.; Singh, S.B.; Scolnick, E.M.; Kohl, N.E.; Oliff, A. (1993)  
Selective Inhibition of Farnesyl Protein Transferase Blocks Ras Processing in Vivo  
J. Biol. Chem., 268, 7617-7620

Glomset, J.; Gelb, M.; Farnsworth, C. (1991)  
The prenylation of proteins  
Curr. Opinion Lipidol., 2, 118-124

Hall, A. (1999)  
Signal transduction pathways regulated by the Rho family of small GTPases  
Brit. J. Cancer, 80, 25-27

Hancock, J.F.; Cadwallader, K.; Marshall, C.J. (1991)  
A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins  
EMBO J., 10, 4033-4039

Hancock, J.F.; Magee, A.I.; Childs, J.E.; Marshall, C.J. (1989)  
All ras Proteins Are Polyisoprenylated But Only Some Are Palmitoylated  
Cell, 57, 1167-1177

Huhn, D. (2001)  
Alkylantien, 25-37  
In: Huhn, D.; Herrmann, R.: Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen  
4.Auflage, Urban & Fischer, München

Huhn, D.; Herrmann, R. (2001)  
Allgemeine Richtlinien der Zytostatikatherapie, 1-5  
In: Huhn, D.; Herrmann, R.: Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen  
4.Auflage, Urban & Fischer, München

Janessa, A. (persönliche Mitteilung, 2002)  
Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung für Kinderchirurgie

Jahner, D.; Hunter, T. (1991)  
The Ras-related gene RhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in ras fibroblasts  
Mol. Cell. Biol., 11, 3682-3690

- Jones, H.A.; Hahn, S.M.; Bernhard, E.; McKenna, W.G. (2001)  
Ras inhibitors and radiation therapy  
*Semin. Radiat. Oncol.*, 11, 328-337
- Kaibuchi, K.; Kuroda, S.; Amano, M. (1999)  
Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells  
*Annu. Rev. Biochem.*, 68, 459-486
- 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.; Hohl, R.J.; Rybak, M.E.; Thibault, A.; Rosenblatt, J. (2001)  
Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial  
*Blood*, 97, 3361-3369
- Koblan, K.S.; Kohl, N.E.; Omer, C.A.; Anthony, N.J.; Conner, M.W.; deSolms, S.J.; Williams, T.M.; Graham, S.L.; Hartman, G.D.; Oliff, A.; Gibbs, J.B. (1996)  
Farnesyltransferase Inhibitors: a new class of cancer chemotherapeutics  
*Biochem. Soc. Trans.*, 24, 688-692
- Kohl, N.E.; Mosser, S.D.; deSolms, S.J.; Giuliani, E.A.; Pompliano, D.L.; Graham, S.L.; Smith, R.L.; Scolnick, E.M.; Oliff, A.; Gibbs, J.B. (1993)  
Selective Inhibition of ras-Dependent Transformation by a Farnesyltransferase Inhibitor  
*Science*, 260, 1934- 1937
- Kohl, N.E.; Omer, C.A.; Conner, M.W.; Anthony, N.J.; Davide, J.P.; deSolms, S.J.; Giuliani, E.A.; Gomez, R.P.; Graham, S.L.; Hamilton, K.; Handt, L.K.; Hartman, G.D.; Koblan, K.S.; Kral, A.M.; Miller, P.J.; Mosser, S.D.; O'Neill, T.J.; Rands, E.; Schaber, M.D.; Gibbs, J.B.; Oliff, A. (1995)  
Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice  
*Nat. Med.*, 1, 792-797
- Lebowitz, P.F.; Casey, P.J.; Prendergast, G.C.; Thissen, J.A. (1997)  
Farnesyltransferase Inhibitors Alter the Prenylation and Growth-stimulating Function of RhoB  
*J. Biol. Chem.*, 272, 15591-15594
- Lebowitz, P.F.; Davide, J.P.; Prendergast, G.C. (1995)  
Evidence that Farnesyltransferase Inhibitors Suppress Ras Transformation by Interfering with Rho Activity  
*Mol. Cell. Biol.*, 15, 6613-6622

- Lebowitz, P.F.; Prendergast, G.C. (1998)  
Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho  
*Oncogene*, 17, 1439-1445
- Lerner, E.C.; Qian, Y.; Blaskovich, M.A.; Fossum, R.D.; Vogt, A.; Sun, J.; Cox, A.D.; Der, C.J.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M. (1995)  
Ras CAAX Peptidomimetic FTI-277 Selectively Blocks Oncogenic Ras Signaling by Inducing Cytoplasmic Accumulation of Inactive Ras-Raf Complexes  
*J. Biol. Chem.*, 270, 26802-26806
- Lerner, E.C.; Zhang, T.T.; Knowles, D.B.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M. (1997)  
Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines  
*Oncogene*, 15, 1283-1288
- Liu, A.; Du, W.; Liu, J.-P.; Jessel, T.M.; Prendergast, G.C. (2000)  
RhoB Alteration Is Necessary for Apoptotic and Antineoplastic Responses to Farnesyltransferase Inhibitors  
*Mol. Cell. Biol.*, 20, 6105-6113
- 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.; Nomeir, A.A.; Lin, C.C.; Wang, L.; Taveras, A.G.; Doll, R.F.; Njoroge, F.G.; Mallams, A.K.; Remiszewski, S.; Catino, J.J.; Girijavallabhan, V.M.; Kirschmeier, P.; Bishop, W.R. (1998)  
Antitumor Activity of SCH66336, an Orally Bioavailable Tricyclic Inhibitor of Farnesyl Protein Transferase, in Human Tumor Xenograft Models and Wap-ras Transgenic Mice  
*Cancer Res.*, 58, 4947-4956
- Lowy, D.R.; Willumsen, B.M. (1993)  
Function and regulation of Ras  
*Ann. Rev. Biochem.*, 62, 851-891
- Mahgoub, N.; Taylor, B.R.; Gratiot, M.; Kohl, N.E.; Gibbs, J.B.; Jacks, T.; Shannon, K.M. (1999)  
In Vitro and In Vivo Effects of a Farnesyltransferase Inhibitor on Nf1-Deficient Hematopoietic Cells  
*Blood*, 94, 2469-2476

Manne, V.; Yan, N.; Carboni, J.M.; Tuomari, A.V.; Ricca, C.S.; Brown, J.G.; Andahazy, M.L.; Schmidt, R.J.; Patel, D.; Zahler, R.; Weinmann, R.; Der, C.J.; Cox, A.D.; Hunt, J.T.; Gordon, E.M.; Barbacid, M.; Seizinger, B.R. (1995)

Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells

Oncogene, 10, 1763-1779

Martin, G.A.; Viskochil, D.; Bollag, G.; McCabe, P.C.; Crosier, W.J.; Haubruck, H.; Conroy, L.; Clark, R.; O'Connell, P.; Cawthon, R.M.; Innis, M.A.; McCormick, F. (1990)

The GAP-Related Domain of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Interacts with ras p21

Cell, 63, 843-849

Metcalf, D. (1977)

Hemopoietic Colonies: In Vitro Cloning of Normal and Leucemic Cells

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Miquel, K.; Pradines, A.; Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M., Favre, G. (1997)

GGTI-298 Induces G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> Block and Apoptosis Whereas FTI-277 Causes Enrichment in A549 Cells

Cancer. Res., 57, 1846-1850

Moasser, M.M.; Sepp-Lorenzino, L.; Kohl, N.E.; Oliff, A.; Balog, A.; Su, D.; Danishefsky, S.J.; Rosen, N. (1998)

Farnesyl transferase inhibitors cause enhanced mitotic sensitivity to taxol and epothilones

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1369-1374

Morgan, M.A.; Dolp, O.; Reuter, C.W. M. (2001)

Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signalling

Blood, 97, 1823-1834

Nagasu, T.; Yoshimatsu, K.; Rowell, C.; Lewis, M.D.; Garcia, A.M. (1995)

Inhibition of Human Tumor Xenograft Growth by Treatment with the Farnesyl Transferase Inhibitor B956

Cancer Res., 55, 5310-5314

Nakamori, S.; Tamura, S.; Arai, I.; Kameyama, M.; Furukawa, M.; Ishikawa, O.; Imaoka, S.; Yoshioka, K.; Mukai, M.; Shinkai, K., Akedo, H. (1996)

Increased expression of RhoAp21 protein is involved in progression and metastasis of colorectal carcinoma

Rec. Adv. Gastroenterol. Carcinogenesis, 1, 901-904

Nørgaard, P.; Law, B.; Joseph, H.; Page, D.L.; Shyr, Y.; Mays, D.; Pietenpol, J.A.; Kohl, N.E.; Oliff, A.; Coffey, R.J. jr.; Poulson, H.S.; Moses, H.L. (1999)  
Treatment with Farnesyl-Protein Transferase Inhibitor Induces Regression of Mammary Tumors in Transforming Growth Factor (TGF)  $\alpha$  and TGF  $\alpha$ /neu Transgenic Mice by Inhibition of Mitogenic Activity and Induction of Apoptosis  
*Clin. Cancer. Res.*, 5, 35-42

Ohkanda, J.; Lockman, J.W.; Yokoyama, K.; Gelb, M.H.; Croft, S.L.; Kendrick, H.; Harrell, M.I.; Feagin, J.E.; Blaskovich, M.A.; Sebti, S.M.; Hamilton, A.D (2001)  
Peptidomimetic inhibitors of protein farnesyltransferase show potent antimalarial activity  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 761-764

Peters, D.G.; Russel, R.H.; Gerkach, M.J.; Koh, E.Y.; Zhang, H.; Choe, K.; Kirschmeier, P.; Bishop, W.R.; Daley, G.Q. (2001)  
Activity of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 against BCR/ABL-induced murine leukemia and primary cells from patients with chronic myeloid leukemia  
*Blood*, 97, 1404-1412

Polakis, P.; McCormick, F. (1992)  
Interactions between p21 ras Proteins and Their GTPase Activating Proteins  
*Cancer Surveys*, 12, 25-42

Pollack, I.F.; Bredel, M.; Erff, M.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M. (1999)  
Inhibition of Ras and Related Guanosine Triphosphate-dependent Proteins as a Therapeutic Strategy for Blocking Malignant Glioma Growth: II-Preclinical Studies in a Nude Mouse Model  
*Neurosurgery*, 45, 1208-1214

Prendergast, G.C.; Davide, J.P.; deSolms, S.J.; Giuliani, E.A.; Graham, S.L.; Gibbs, J.B.; Oliff, A.; Kohl, N.E. (1994)  
Farnesyltransferase Inhibition Causes Morphological Reversion of ras-Transformed Cells by a Complex Mechanism That Involves Regulation of the Actin Cytoskeleton  
*Mol. Cell. Biol.*, 14, 4193-4202

Prendergast, G.C.; Du, W. (1999)  
Targeting farnesyltransferase: is Ras relevant?  
*Drug Resist. Update*, 2, 81-84

Prendergast, G.C.; Khosravi-Far, R.; Solski, P.A.; Kurzawa, H.; Lebowitz, P.F.; Der, C.J. (1995)  
Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras  
*Oncogene*, 10, 2289-2296

Punt, C.J.A.; van Maanen, L.; Bol, C.J.J.G.; Seifert, W.F.; Wagener, D.J.T. (2001)

Phase I and pharmacokinetic study of the orally administered farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced solid tumors  
Anti-Cancer Drugs, 12, 193-197

Qiu, R.; Chen, J.; McCormick, F.; Symons, M. (1995)

A role for Rho in Ras transformation  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11781-11785

Reiss, Y.; Stradley, S.J.; Gierasch, L.M.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. (1991)  
Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21<sup>ras</sup> protein farnesyltransferase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 732-736

Rowinsky, E.K.; Windle, J.J.; von Hoff, D.D. (1999)

Ras Protein Farnesyltransferase: A Strategic Target for Anticancer Therapeutic Development  
J. Clin. Oncol., 17, 3631-3652

Schafer, W.R.; Kim, R.; Sterne, R.; Thorner, J.; Kim, S.-H.; Rine, J. (1989)

Genetic and Pharmacological Suppression of Oncogenic Mutations in RAS Genes of Yeast and Humans  
Science, 245, 379-385

Schmitt, G. (1999)

Grundlagen der Chemotherapie, 40-41  
In: Schmitt, G.: Onkologie systematisch  
1.Auflage, Uni-Med Verlag, Bremen

Sebti, S.M.; Hamilton, A.D. (1996)

Rational design of Ras prenyltransferase inhibitors as potential anticancer drugs  
Biochem. Soc. Trans., 24, 692-699

Sebti, S.M.; Hamilton, A.D. (1997)

Inhibition of Ras Prenylation: a novel approach to cancer chemotherapy  
Pharmac. Ther., 74, 103-114

Sepp-Lorenzo, L.; Ma, Z.; Rands, E.; Kohl, N.E.; Gibbs, J.B.; Oliff, A.; Rosen, N. (1995)

A Peptidomimetic Inhibitor of Farnesyl Protein Transferase Blocks the Anchorage dependent and -independent Growth of Human Tumor Cell Lines  
Cancer Res., 15, 5302-5309

Shi, B.; Yaremko, B.; Hajian, G.; Terracina, G.; Bishop, W.R.; Liu, M.; Nielsen, L.L. (2000)

The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 synergizes with taxanes in vitro and enhances their antitumor activity in vivo  
Cancer Chemother. Pharmacol., 46, 387-393

Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Suard, Y.; Perucho, M.; Li, Y.; Kamata, T.; Freamisco, J.; Stavnezer, E.; Fogh, J.; Wigler, M.H. (1983)

Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2112-2116

Skrzat, S.; Angibaud, P.; Venet, M.; Sanz, G.; Bowden, C.; End, D. (1998)

R115777 a novel imidazole farnesyl protein transferase inhibitor with potent oral antitumor activity  
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 39, 2169 (Abstract)

Sonoda, K.; Sakamoto, T.; Yoshikawa, H.; Ashizuka, S.; Ohshima, Y.; Kishihara, K.; Nomoto, K.; Ishibashi, T.; Inomata, H. (1998)

Inhibition of corneal inflammation by the topical use of Ras farnesyltransferase inhibitors: selective inhibition of macrophage localization  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 39, 2245-2251

Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebt, S.M. (1995)

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., 55, 4243-4247

Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebt, S.M. (1998)

Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts  
Oncogene, 16, 1467-1473

Trahey, M.; McCormick, F. (1987)

A Cytoplasmatic Protein Stimulates Normal N-ras p21 GTPase, But Does Not Affect Oncogenic Mutants  
Science, 238, 542-545

Vogt, A.; Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A.D.; Sebt, S.M. (1997)

The Geranylgeranyltransferase-I Inhibitor GGTI-298 Arrests Human Tumor Cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and Induces p21<sup>WAF1/CIP1/SDI1</sup> in a p53-independent Manner  
J. Biol. Chem., 272, 27224-27229

Yokoyama, K.; Trobridge, P.; Buckner, F.S.; Scholten, J.; Stuart, K.D.; Van Voorhis, W.C.; Gelb, M.H. (1998)

The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth  
Mol. Biochem. Parasitol., 94, 87-97

Yoshioka, K.; Nakamori, S.; Itoh, K. (1999)  
Overexpression of Small GTP-binding Protein RhoA Promotes Invasion of  
Tumor Cells  
Cancer Res., 59, 2004-2010

Zalcman, G.; Closson, V.; Linares-Cruz, G.; Lerebours, F.; Honore, N.; Tavitian,  
A.; Olofsson, B. (1995)  
Regulation of the Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle  
Oncogene, 18, 1935-1945

Zujewski, J.; Horak, I.D.; Bol, C.J.; Woestenborghs, R.; Bowden, C.; End, D.W.;  
Piotrovsky, V.K.; Chiao, J.; Belly, R.T.; Todd, A.; Kopp, W.C.; Kohler, D.R.;  
Chow, C.; Noone, M.; Hakim, F.T.; Larkin, G.; Gress, R.E.; Nussenblatt, R.B.;  
Kremer, A.B.; Cowan, K.H. (2000)  
Phase I and Pharmacokinetic Study of Farnesyl Protein Transferase Inhibitor  
R115777 in Advanced Cancer  
J. Clin. Oncol., 18, 927-941

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. med. P. Schweizer für die Überlassung des Themas, die Korrektur der vorliegenden Arbeit sowie seine freundliche Art und Unterstützung als mein Doktorvater.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn PD Dr. Rainer Girgert, der mich sowohl im Labor als auch beim „Zusammenschreiben der Arbeit“ umfassend betreute und stets ein offenes Ohr für alle aufkommenden Fragen und Sorgen hatte.

Auch den beiden Mitarbeiterinnen des wissenschaftlichen Labors der Kinderchirurgie Tübingen, Frau Andrea Janessa und Frau Claudia Treuner, möchte ich für die nette Zusammenarbeit und auch ihre Bereitschaft, mir bei allen anfallenden Problemen und Herausforderungen des Laboralltags mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, danken.

Darüber hinaus möchte ich besonders Herrn Dr. Michael Schumm aus dem KMT-Labor der Kinderklinik Tübingen erwähnen, der mir nicht nur die Proben für die Versuche zur Verfügung stellte, sondern mich auch in die Methodik der CFUc-Assays einführte. Er war ebenso wie die MTAs Christine, Olga, Ulrike und alle anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des KMT-Labors jederzeit sehr hilfsbereit und freundlich. Vielen Dank für die Unterstützung.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von Herrn Dr. Eichner vom Institut für Medizinische Biometrie, der sich ebenfalls viel Zeit nahm und jederzeit für weitere Fragen zur Verfügung stand.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die die mühevollen Aufgabe des Korrekturlesens übernahmen oder durch Kritik und Diskussionsbereitschaft ihr Interesse an dieser Arbeit zeigten. Dabei möchte ich insbesondere auch meine Eltern nennen, die mir außerdem das Medizinstudium finanziell ermöglichen und auf deren liebevolle Unterstützung ich jederzeit zählen kann.



## Lebenslauf

Kathrin Katja Schäffer

Geburtsdatum: 02. Januar 1977  
Geburtsort: Leonberg  
Eltern: Peter Schäffer  
Gabriele Schäffer, geb. Thielmann

### Schulbildung:

1983 – 1987	Schelling-Grundschule in Leonberg
1987 – 1996	Johannes-Kepler-Gymnasium in Leonberg
06/1996	Abitur

### Freiwilliges Soziales Jahr:

09/1996 - 03/1997	Mobiler Sozialer Dienst des Deutschen Roten Kreuzes in Leonberg
-------------------	---

### Hochschulausbildung:

seit 04/1997	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
03/1999	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
08/2001	Erster Abschnitt des Amerikanischen Staats-examen (USMLE Step 1) in München
08/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
18.11.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen