

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der
Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Präklinische Evaluation
des Farnesyltransferase Inhibitors
Tipifarnib
in Hodgkin-Lymphom Zelllinien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anna Lang
aus Odessa /Ukraine

promoviert am 12. März 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der
Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Präklinische Evaluation
des Farnesyltransferase Inhibitors
Tipifarnib
in Hodgkin-Lymphom Zelllinien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anna Lang
aus Odessa /Ukraine

promoviert am 12. März 2014

Aktivcopy, Köln

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischer Fakultät
der Universität zu Köln, 2014

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. A. Engert

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. R.Büttner

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsarbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 15 Oktober 2013

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Experimente
sind nach entsprechender Anleitung
von Herrn Dr.med Bastian von Tresckow von mir
selbst durchgeführt worden.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Michael Hallek, Direktor der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Promotionsschrift in seiner Klinik danken.

Herrn Prof. Dr. med. A. Engert danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in dem von ihm geleiteten Labor für Immuntherapie anzufertigen.

Besonders danke ich Herrn Dr. med. Bastian von Tresckow für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die intensive Betreuung.

Ebenso gilt mein aller herzlichster Dank Herrn Dr. med Boris Böll.

Des Weiteren bedanke ich mich für die stete Hilfsbereitschaft bei allen Mitarbeitern des Labors für Immuntherapie.

Gewidmet in Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	6
1. EINLEITUNG	9
1.1. Epidemiologie	9
1.2 Aktuelle Therapiestrategien: Probleme und Ziele	10
1.2.1 Doxorubicin-induzierte Toxizität	11
1.2.2 <i>Multidrug</i> -Resistenz.	13
1.3 Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms	15
1.3.1 Die konsekutive Aktivierung von NF- κ B	19
1.3.2 <i>Bystander</i> -Zellen und TNF-Familie-Moleküle.	23
1.3.3 Inhibierung der proapoptotischen TNFR-Familie durch C-FLIP	25
1.3.4 Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs	26
1.3.5 Aktivierung des mTOR-Signalwegs	27
1.3.6 Angiogenese durch VEGF	28
1.4 Farnesyltransferase-Inhibitoren	29
1.4.1 Das Enzym Farnesyltransferase	29
1.4.2 Zielstrukturen der Farnesyltransferase	31
1.4.3 Aktuelle klinische Anwendung von FTIs in	37

lymphatischen Malignitäten	
1.5 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	38
1.6 Fragestellung der Arbeit	40
2. MATERIAL UND METHODEN	43
2.1 Chemikalien und Materialien	43
2.2 HL-Zelllinien	46
2.3 Geräte	46
2.4. Verbrauchsmaterialien	47
2.5 Zellkultur	48
2.6 Auftauen von Zellen.	49
2.7 Einfrieren von Zellen	50
2.8 Bestimmung der Zellzahl	50
2.9 Plattieren der Zellen	51
2.10 Applikation und Inkubation der Pharmaka	52
2.11 Messung der Zellviabilität: Zellproliferationstest XTT	54
2.12 Durchflusszytometrische Untersuchungen	55
2.13 Statistische Analyse	58

3. ERGEBNISSE	62
3.1 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Simvastatin	62
3.2 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Tipifarnib	72
3.3 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Doxorubicin	79
3.4 Proliferationshemmung der Zelllinien unter simultaner Einwirkung von Doxorubicin und Simvastatin...	85
3.5 Proliferationshemmung der Zelllinien unter sequentieller Einwirkung von Doxorubicin und Simvastatin	91
3.6 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Doxorubicin und Tipifarnib	99
3.7 Auswirkungen von Tipifarnib auf die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration in Zelllinien	106
3.8 Wirkung von Tipifarnib auf murine Kardiomyozyten	111
4. DISKUSSION	121

Inhaltsverzeichnis _____

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.	121
4.2 Proliferationshemmung von Zelllinien durch Simvastatin	122
4.3 Proliferationshemmung von Zelllinien durch Tipifarnib	125
4. 4 Proliferationshemmung von Zelllinien durch Kombination von Simvastatin oder Tipifarnib mit dem konventionellen Chemotherapeutikum Doxorubicin.	127
4.4.1 Proliferationshemmung von Zelllinien durch Doxorubicin.	127
4.4.2 Überwiegend antagonistische Effekte bei Koinkubation von Zelllinien mit Doxorubicin und Simvastatin	128
4.4.3 Additiv bis synergistische Effekte bei Koinkubation von Zelllinien mit Tipifarnib und Doxorubicin	129
4.5 Toxizität von Doxorubicin und Tipifarnib in murinen Kardiomyozyten	135

Inhaltsverzeichnis _____

5. ZUSAMMENFASSUNG	140
6. LITERATURVERZEICHNIS.	142
7. LEBENSLAUF	180

Abkürzungsverzeichnis:

AP-1	engl. <i>activator protein 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zellrezeptor
BD	Becton Dickinson
Bim	engl. <i>B-cell leukemia/lymphoma-2 interacting mediator of cell death</i>
BOB1	engl. <i>B-cell Oct binding protein</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CDKN1A	engl. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CENP	Zentromer-assoziiertes Protein
C-Flip	engl. <i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
cHL	klassisches HL
CI	Kombinationsindex
DISC	engl. <i>death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr virus
EBER1	engl. <i>Epstein-Barr virus encoded small RNA 1</i>
ERK	engl. <i>extracellular regulated protein kinase</i>
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	engl. <i>fas-Associated protein with death domain</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FDC	engl. <i>follicular dendritic cell</i>

Abkürzungsverzeichnis _____

FLICE	engl. <i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
HL	Hodgkin-Lymphom
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRS-Zellen	Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen
IC50	Mittlere Inhibitorische Konzentration
ICAM-1	eng. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IF-RT	Involved-Field-Radiotherapie
IM	infektiöse Mononukleose
JAK	Janus kinase
LD-HL	das lymphozytenarme HL (engl. <i>lymphocyte depleted HL</i>)
LFA-3	eng. <i>lymphocyte function-associated antigen 3</i>
LMP1 und LMP2a	engl. <i>latent membrane protein 1 and 2a</i>
LP	engl. <i>lymphocyte predominant</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC-HL	das gemischtzellige HL (engl. <i>mixed cellularity HL</i>)
MDR	engl. <i>multi drug resistance</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MRP	engl. <i>multidrug resistance protein</i>
mTOR	engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>
NFkB	nuclear factor kappa B
NLPHL	das noduläre Lymphozyten-prädominante HL
NS-HL	das nodulär-sklerosierende HL

Abkürzungsverzeichnis _____

OCT2	engl. <i>octamer binding factor 2</i>
PGP	P-Glycoprotein
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PMS	N-Methyl Dibenzopyrazine Methylsulfat
PU1	engl. <i>purine-rich GGAA binding site</i>
RANK	engl. <i>receptor activator of NF-kappa-B</i>
Rheb	engl. <i>Ras-homolog-enriched-in-brain</i>
RL-cHL	das lymphozytenreiche HL (engl. <i>lymphocyte rich classical HL</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	engl. <i>roswell park memorial institute medium</i>
STAT	engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TARC	engl. <i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TIA-1	T-Zell intrazelluläres Antigen -1
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
XTT	engl. <i>the tetrazolium salt sodium 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate</i>

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Hodgkin-Lymphom (HL) macht 10-15% aller Lymphome in den westlichen Ländern aus, was 0,5% aller Krebsneuerkrankungen entspricht. Die Inzidenz von HL, basierend auf Daten aus Deutschland liegt bei 2,9 pro 100.000 Männer und 2,2 pro 100.000 Frauen (Robert Koch Institut 2007/2008). Somit ist das HL zwar eine seltene Erkrankung, jedoch eines der häufigsten Lymphome der westlichen Welt (Landgren et al 2007). Die Epidemiologie des HL in Deutschland folgt einer bimodalen Alters-Inzidenz-Kurve: Ein erster Gipfel ergibt sich im Alter von 15-34 Jahren, dem nach einer Plateauphase ein zweiter im späteren Erwachsenenalter (55 - 59 Jahre) folgt (Müller et al 2007). Das HL macht 15% aller Krebserkrankungen in der Bevölkerung im Alter von 15-24 Jahren (Caposaro et al 2009) aus. Da es sich beim Hodgkin-Lymphom um eine potentiell heilbare Erkrankung handelt, ist die Ausschöpfung aller therapeutischen Möglichkeiten geboten. Durch die Wahl

der adäquaten Therapie sollen therapiebedingte Spätfolgen verhindert werden, die aufgrund von zunehmenden Heilungsraten und hoher Inzidenz bei junger Bevölkerung an Bedeutung gewinnen.

Die geschätzte 5-Jahres-Überlebensrate ist aktuell zwar hoch und liegt in Deutschland bei allen HL Patienten bei etwa 90% (Wilmanns et al 2000). Diese sinkt aber bei älteren Patienten (> 65 Jahre) auf 53% (Parkin et al 2005).

1.2 Aktuelle Therapiestrategien: Probleme und Ziele

Die Therapie des Hodgkin-Lymphoms richtet sich nach dem Krankheitsstadium und den prognostischen Faktoren. Zum Einsatz kommt heute vor allem die kombinierte Strahlen- und Chemotherapie (Heimpel et al 1996). In Deutschland werden in der Ersttherapie aktuell folgende Schemata eingesetzt: das ABVD-Schema (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin) und das BEACOPP-Schema (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin und Prednison). Sowohl ABVD als auch BEACOPP-Schema können mit einer Strahlentherapie kombiniert

werden. In Rahmen dieser erfolgt meist die Involved-Field-Bestrahlung befallener Lymphknotenareale (Wilmanns et al 2000; Behringer et al 2006; Heinz et al 2006; Rank et al 2008). Beide der obengenannten Schemata enthalten Adriamycin (Doxorubicin), ein Pharmakon dessen Einsatz durch das kardiotoxische Potenzial bis heute limitiert ist.

1.2.1. Doxorubicin-induzierte Toxizität

Durch die verbesserte Polychemotherapie und moderne strahlentherapeutische Verfahren wird mittlerweile für über 80% aller Hodgkin-Lymphom-Patienten eine langanhaltende komplette Remission und für über 90% langzeitiges Überleben erreicht (Engert et al 2010; von Tresckow et al 2012; Engert et al 2012). Dadurch wurden im Laufe der Jahre zunehmend therapieinduzierte Nebenwirkungen bekannt (Diehl et al 2002). Da vor allem junge Menschen erkranken - 70% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 20 - 35 Jahren alt - müssen Langzeitnebenwirkungen minimiert werden (Diehl et al 2002; Dempke et al 2006). Die Intensivierung der Strahlen- und Chemotherapie muss daher immer vor

dem Hintergrund eines eventuellen Gewinns an Lebenserwartung des Patienten abgewogen werden.

Nach Beginn des Einsatzes von Anthracyclinen im onkologischen Alltag wurde bald bekannt, dass Anthracycline kumulativ und dosisabhängig irreversible Herzfunktionsstörungen verursachen können. Um Spätschaden zu minimieren ist die Einhaltung einer kumulativen Höchstdosis von maximal 400-450 mg/m² Doxorubicin unabdingbar (Swain et al., 2003). Diese Dosierung wird als Kompromiss zwischen antineoplastischer Wirksamkeit und einem noch akzeptablen Risiko für Herzfunktionsstörungen angesehen. Die publizierten Inzidenzen von Kardiomyopathie unter Einhaltung dieser Vorgabe betragen ca. 5%. Eine asymptotische Einschränkung der ventrikulären Funktion tritt sogar bei bis zu 50% der Behandelten auf (Goethals et al 2002). Dabei zeigen neuere Studien dass Anthracyclin-induzierte kardiale Toxizität wahrscheinlich sogar häufiger als bisher angenommen auftritt (Swain et al 2003). Trotz seiner schweren Kardiotoxizität bleibt Doxorubicin eines der

Hauptkomponenten von HL Chemotherapie-Regimen aufgrund seiner hohen Antitumoraktivität.

Nachdem unter den modernen Antitumorthérapien teilweise deutliche Überlebenszeitverlängerungen erreicht wurden, können sich kardiale Langzeitnebenwirkungen zu einem manifesten klinischen Problem für die betroffenen Patienten entwickeln. Daher ist die Entwicklung alternativer Strategien für die kardioprotektive Anthracyclin-basierte Krebstherapie von hoher Bedeutung (Gianni et al 2008).

Bis heute fehlen wirksame Strategien zur Vermeidung von Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität ohne dabei die antineoplastische Wirksamkeit zu reduzieren.

Ein weiteres Problem der aktuellen Therapiestrategien ist eine breite Kreuzresistenz („Multidrug Resistenz“), die die Tumorzellen gegen klinisch wichtige Zytostatika, u.a. auch gegen Doxorubicin, ausbilden können.

1.2.2 Multidrug-Resistenz

Die Multidrug-Resistenz (MDR) ist ein Phänomen, bei dem die Tumorzellen, die einem zytotoxischen Agenten ausgesetzt worden sind, eine Kreuzresistenz gegenüber

einer Reihe von strukturell und funktionell verwandten Verbindungen entwickeln (Gottesman et al 2002). Die MDR ist eines der größten Hindernisse für die erfolgreiche medikamentöse Behandlung von Tumoren (Simon et al 1994; Klohs et al 1988; Sehested et al 1988). Die MDR wird häufig mit der Überexpression des P-Glycoproteins (PGP) und des MDR- assoziierten Proteins (MRP), energieabhängigen Efflux-Pumpen, die zur ATP-bindenden Familie von Transportern gehören, assoziiert. Eine Überexpression dieser integralen Membranproteine führt zur Reduktion von intrazellulären Pharmakakonzentrationen (Krishna et al 2000) und erzeugt dadurch eine Resistenz der Tumorzellen gegen eine Vielzahl von Zytostatika (Gottesman et al 2002). Dieser Effekt scheint mit einer erhöhten Proliferationsaktivität von Tumorzellen und einem negativen prognostischen Wert verbunden zu sein (von Bossanyi et al 1997). Doxorubicin wird in der Therapie von HL verwendet, seine Wirksamkeit ist jedoch oft reduziert, da es ein Substrat sowohl von PGP als auch von MRP ist (Vezmar et al 2000; Shen et al 2007). Der Nachweis, dass die Efflux-Pumpen- insbesondere PGP-

eine bedeutende Rolle in der klinischen Arzneimittelresistenz spielen, hat die Einführung von verschiedenen PGP-Inhibitoren im klinischen Bereich angeregt (Gottesman et al 2002; Thomas et al 2003; Vezmar et al 2000; Aszalos A. et al 2001; Merlin J et al 2000; Volm M et al 1998).

1.3 Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Das charakteristische Merkmal des Hodgkin-Lymphoms sind die malignen einkernigen Hodgkin- und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) (Schmitz R et al 2009). Dabei repräsentieren die malignen Zellen häufig nur ca. 1% der Gesamtzellen des Tumors (Weiss et al 2007). Nach morphologischen und immunphänotypischen Kriterien wird das Hodgkin Lymphom unterteilt in das klassische HL (engl. *classic HL*, cHL, ca. 95% aller HL) und das noduläre Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL, ca. 5%) unterteilt, dessen maligne Zellen als LP-Zellen (für engl. *lymphocyte predominant*) bezeichnet werden (Jaffe E.S. et al 2001). Nach WHO-Klassifizierung werden im cHL anhand von Histologie und des Zell-Phänotyps vier

weitere Untergruppen unterschieden: das nodulär-sklerosierende HL (NS-HL, ca. 60-80% aller HL), das gemischtzellige HL (engl. *Mixed Cellularity* HL, MC-HL, ca. 15-30%), das lymphozytenreiche HL (engl. *lymphocyte rich classical* HL, LR-cHL, ca. 6%) sowie das lymphozytenarme HL (engl. *lymphocyte depleted* HL, LD-HL, ca. 1%) (Harris N. et al 1999).

Die histologische Subklassifikation innerhalb der Diagnose cHL hat bisher keine therapeutischen Konsequenzen. Das cHL wird meist durch eine Kombination von Chemo- und Strahlentherapie behandelt. In frühen Stadien werden 2 Zyklen ABVD gefolgt von 20 Gy Involved-Field-Radiotherapie (IF-RT) eingesetzt; in intermediären Stadien werden 2xBEACOPP eskaliert gefolgt von 2 Zyklen ABVD und 30Gy IF-RT oder als Alternative 4 Zyklen ABVD gefolgt von 30Gy IF-RT eingesetzt; in den fortgeschrittenen Stadien wird Chemotherapie mit 6 Zyklen BEACOPP eskaliert gefolgt von PET-adaptierter Bestrahlung eingesetzt (Engert et al 2012; S3 Hodgkin-Lymphom Leitlinie; Engert et al 2012; von Tresckow et al 2012; Engert et al 2010). Durch eine

Stadien-adaptierte Therapie können heute über 80% cHL-Patienten langfristig geheilt werden.

Das NLPHL wird üblicherweise im Stadium IA durch alleinige Bestrahlung therapiert. In den allen anderen Stadien wird eine kombinierte Stadien-adaptierte Radiochemotherapie analog der Therapie des klassischen HL eingesetzt. Bei Patienten mit Rezidiv kann ggf. aufgrund der CD20 Expression auch ein anti-CD20 Antikörper eingesetzt werden. Das NLPHL hat eine hervorragende Prognose und kann so in ca. 95% aller Fälle erfolgreich behandelt werden.

Die Klärung des zellulären Ursprungs von HRS-Zellen wurde lange Zeit dadurch verhindert, dass die Ausprägung ihrer zellulären Marker sich keinem hämatopoetischen Zelltyp eindeutig zuordnen ließ. Obwohl inzwischen bekannt ist, dass HRS-Zellen in den meisten Fällen von B-Zellen abstammen (Küppers et al 1998), exprimieren sie aber im Gegensatz zu den malignen Zellen des NLPHL (LP-Zellen) keine typischen B-Zellmarker wie z.B. CD20 oder Proteine des B-Zellrezeptors (CD79a und CD79b) (Falini et al 1996). Ebenso werden Immunoglobulin-spezifische Transkriptionsfaktoren wie

B-cell Oct binding protein (BOB), *octamer binding factor 2* (OCT2) und *purine-rich GGAA binding site* (PU1) weder im Primärgewebe, noch in kultivierten HRS-Zellen exprimiert (Stein et al 1997). Hingegen finden sich die Marker anderer hämatopoetischen Zelllinien, so z.B. CD15, ein Granulozyten- und Monozytenmarker (Drexler et al 1992), die dendritischen Zellmarker Restin, *Thymus and Activation Regulated Chemokine* (TARC) und Fascin (Delabie et al 1992; Pinkus et al 1997) sowie in einigen Fällen die zytotoxischen T-Zell-Marker T-Zell intrazelluläres Antigen -1 (TIA-1) und Granzym B (Kanavaros et al 1999; Krenacs et al 1997; Oudejans et al 1996).

Gesunde B-Zellen der Keimzentren verfügen über einen funktionellen B-Zellrezeptor (BCR). Dieser wird in den HRS-Zellen nicht exprimiert. Die B-Zellen mit einem Defekt im B-Zellrezeptor werden normalerweise durch Apoptose aussortiert. Im Folgenden werden einige wichtige Mechanismen dargestellt, die den HRS-Zellen dabei helfen dieser Selektion zu entgehen.

1.3.1 Die konsekutive Aktivierung von NF- κ B

Von zentraler Bedeutung für das Entstehen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist die Interaktion von HRS-Zellen mit umliegenden Zellen des Körpers. Mehrere Publikationen beschreiben eine autokrine bzw. parakrine Sekretion diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren in primären Tumorzellen, sowie in abgeleiteten Zellen (Kapp et al., 1999; Skinnider et al. 2001). Diese deregulierte Sekretion von Botenstoffen ist wahrscheinlich für die konsekutive Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Einer der bekanntesten Transkriptionsfaktoren, die konsekutiv aktiv vorliegen, ist NF κ B (nuclear factor κ B) (Bargou R et al 1997). NF κ B reguliert die Expression einer Reihe anti-apoptotischer und proliferations-fördernder Gene in den Lymphozyten. NF κ B wird durch den Inhibitor κ B (I κ B) im Zytoplasma in inaktivem Zustand festgehalten. Nach einer Stimulation (z. B durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)) werden κ B-Kinasen aktiviert. Diese Kinasen induzieren eine Phosphorylierung des I κ B und damit dessen proteasomalen Abbau. Nach der NF κ B – Freisetzung wandert dieser in den Kern und aktiviert dort

die Transkription seiner Zielgene. In den HRS-Zellen ist die Regulation von NFkB gestört. Diese Störungen entstehen sowohl durch die Infizierung von B-Lymphozyten durch das Epstein-Barr-Virus (EBV), als auch z.B. durch vermehrte Expression von TNF-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

Epstein-Barr-Virus

Weltweit sind mehr als 90% der Menschen mit dem γ -Herpesvirus EBV infiziert. Das Virus befällt vornehmlich Gedächtnis-B-Zellen und entwickelt in diesen eine lebenslange Persistenz (Kutok und Wang, 2006). Die Erstinfektion erfolgt meist im frühen Kindesalter und verläuft im Allgemeinen asymptomatisch. Bei einer verspäteten Infektion im frühen Erwachsenenalter kann es zur Ausbildung einer infektiösen Mononukleose (IM, Pfeiffer'sches Drüsenfieber) kommen (Henle et al. 1968). Eine IM-Erkrankung bedingt ein 2- bis 4-fach erhöhtes Risiko im späteren Leben ein HL zu entwickeln (Munoz et al. 1978). In der westlichen Welt sind die HRS-Zellen in 40% der Fälle mit dem EBV infiziert, wohingegen der Anteil EBV-positiver cHL-Fälle in den

Entwicklungsländern deutlich höher ist (Jarrett und MacKenzie, 1999).

Da das Virusgenom in HRS-Zellen in klonaler Form vorliegt, wird eine Abstammung der Tumorzellen von einer bereits infizierten Vorläuferzelle angenommen, was den Verdacht auf eine pathogenetische Bedeutung des EBV in der Entwicklung des HL erhärtet (Anagnostopoulos et al., 1989; Weiss et al., 1989). Durch jüngere Studien wurde gezeigt, dass das EBV-Virus in der Lage ist die B-Zellen durch Expression von EBV-spezifischen Genen zu immortalisieren (Kuppers *et al.*, 2005).

Die Mehrheit der EBV-infizierten HRS-Zellen prägt die EBV-kodierten Proteine LMP1 und LMP2a (engl. *latent membrane proteine 1 and 2a*) aus. LMP1 imitiert einen aktiven CD40-Rezeptor, der für das Überleben und die Differenzierung der B-Zellen im Keimzentrum notwendig ist, und trägt so vermutlich dazu bei, die HRS-Vorläufer-Zellen ohne funktionalen B-Zell-Rezeptor vor der Apoptose zu bewahren (Kilger et al., 1998). Des Weiteren aktiviert LMP1 den NF- κ B-, den Janus kinase/*Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT)-

und den AP-1 Signalweg (Gires et al; 1999; Gires et al; 1997; Kieser et al 1997). Alle drei Signalwege sind im HL konsekutiv aktiv. Neben LMP1 und -2a prägen EBV-positive HRS-Zellen die Virus-kodierte RNA EBER1 (engl. Epstein-Barr virus encoded small RNA 1) aus, die offenbar an der negativen Regulation von Tumorsuppressorgenen wie CDKN1A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) beteiligt ist. Die genauen Mechanismen wurden jedoch bislang nicht geklärt (Lin et al., 2010).

Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (CD30, CD40, RANK)

Die HRS-Zellen prägen vermehrt verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie aus, wie CD30 und CD40 und RANK (engl. *receptor activator of NF-kappa-B*) (Fiumara et al., 2001; O'Grady et al., 1994; Schwab et al., 1982), deren Stimulation zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt (Skinnider und Mak, 2002).

1.3.2 Bystander-Zellen und TNF-Familie-Moleküle

Wie bereits oben beschrieben, ist eine Besonderheit des HL, dass die malignen Zellen häufig nur ca. 1% der gesamten Tumormasse ausmachen. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Interaktion mit dem zellulären Mikromilieu von zentraler Bedeutung für das Überleben der HRS-Zellen ist. Im Folgenden sollen einige der wichtigsten zellulären Interaktionen von HRS-Zellen mit den Infiltratzellen beschrieben werden.

Normalerweise kommt es in den B-Zellen beim Eintritt in das Keimzentrum zu einer Herunterregulation von anti-apoptotischen und einer Hochregulation von pro-apoptotischen Proteinen (Takahashi et al 2001). Die B-Zellen benötigen zum Überleben Signale, die sie nur bei Expression eines hochaffinen, nicht autoreaktiven BZR erhalten (Falini et al 1996). Die B-Zellen mit mangelhafter BZR Expression gehen durch Apoptose zugrunde. An diesem Vorgang ist CD95-induzierte Apoptose beteiligt (van Eijk et al 2001; Takahashi et al 2001). CD95 wurde zusammen mit FADD (engl. *Fas-associated protein with death domain*) und Caspase-8 in

dem aktivierten CD95-DISC (eng. *death-inducing signalling complex*) nachgewiesen. Aktivierter CD95-DISC scheint für die Apoptoseinduktion verantwortlich zu sein.

Durch verschiedene Stimuli kann aber die Apoptose in den B- Zellen mit mangelhafter BZR Expression unterdrückt werden. Dazu gehört die gemeinsame Kultivierung mit FDCs (eng. *follicular dendritic cells*), die Stimulation des BZR durch quervernetzte Antikörper oder von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie durch den entsprechenden Liganden (siehe auch 1.3.1) (Hennino et al 2001; van Eijk et al 2001a).

Die zugehörigen Liganden stellen das Mikromilieu zur Verfügung. So wird der CD40-Ligand von umliegenden T-Zellen exprimiert, während der CD30-Ligand von mehreren Zelltypen, wie z.B. von Eosinophilen oder Mastzellen, ausgeprägt wird.

1.3.3 Inhibierung von proapoptotischen TNFR-Familie durch C-FLIP

Eines der frühesten Ereignisse in der TNF-Rezeptor-induzierten Apoptose ist die Aktivierung von Caspase-8/-10 (auch FLICE eng. *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme*). Hier kann c-FLIP (engl. *FLICE-inhibitory protein*) die Aktivierung durch seine strukturellen Ähnlichkeiten mit Caspase-8/-10 inhibieren. c-FLIP ist strukturell homolog zur Caspase-8/-10 und wird wie die Caspasen in den DISC (siehe auch 1.3.2) eingebaut (Scaffidi et al 1999; Irmiler et al 1997; Krüger et al 2001; Thome et al 1997). Aufgrund der fehlenden katalytischen Aktivität von c-FLIP findet aber keine oder nur eine unvollständige Aktivierung von DISC statt. Dadurch wird die Apoptose verhindert (Krüger et al 2001). Eine starke c-FLIP-Expression konnte in allen HRS-Zelllinien und in den HRS-Zellen nahezu aller untersuchten primären Hodgkinfälle (Mathas et al 2004) gezeigt werden. Damit ist die Expression von c-FLIP sehr eng mit dem Apoptoseschutz verbunden (Thomas et al 2002).

1.3.4 Aktivierung des MAPK /ERK -Signalwegs

Ein weiterer Signalweg, der in HRS-Zellen konsekutiv aktiv ist, ist der *mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ Extracellular regulated protein kinase (ERK)* Signalweg (Zheng et al., 2003). Die Familie der MAPKs umfasst eine große Gruppe von Enzymen, die aufeinanderfolgend durch Phosphorylierung spezifischer Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste aktiviert werden (Seger und Krebs, 1995). In einem mehrstufigen Signaltransduktionsweg regulieren sie diverse physiologische Prozesse der Zelle wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose (Pearson et al., 2001). Die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs kann durch eine Vielzahl an Stimuli geschehen: u.a.durch Rezeptoren wie CD30, CD40, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Experimente mit MAPK/ERK-Inhibitoren in cHL-Zelllinien deuten auf ihre wichtige Rolle in der Regulation von Überleben und Proliferation in HRS-Zellen hin (Zheng et al., 2003).

1.3.5 Aktivierung des mTOR-Signalwegs

Bei *mammalian target of rapamycin* (mTOR) handelt es sich um eine multifunktionale Kinase, die vor allem für die Proteinsynthese eine entscheidende Rolle spielt (Gingras et al. 2001). mTOR hat eine kritische Funktion bei der Zell-Proliferation, beim Ablauf des Zellzyklus, bei der Apoptose und Zellwachstum.

In HRS-Zellen wurde eine konsekutive Aktivierung des mTOR Signalwegs beschrieben, die vermutlich durch die im HL ebenfalls konsekutive Aktivität des PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/Akt-Signalweges verursacht wird (De und Brown, 2010; Dutton et al., 2005). Sowohl Akt als auch PI3K sind vorgeschaltete Regulatoren des mTOR Signaltransduktionswegs und führen zur sequentiellen Phosphorylierung und damit Aktivierung von mTOR (Brown et al. 1995; Fingar et al. 2002). Einige Studien haben die Auswirkungen von mTOR-Hemmung in HL untersucht. Die mTOR-Hemmer Everolimus und Temsirolimus induzierten Zellzyklusarrest, der von Autophagie in HL-Zelllinien gefolgt wurde (Jundt et al.2005; Georgakis et al.2006).

Eine neuere Studie zeigte Antitumor-Aktivität des mTOR-Hemmers Everolimus bei Patienten mit refraktärem/rezidivierendem HL (Johnson et al 2010). Diese Ergebnisse deuten auf klinische Relevanz und Wirksamkeit von mTOR-Inhibierung in HL-Zelllinien hin.

1.3.6 Angiogenese durch Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Angiogenese ist essentiell für das Wachstum bösartiger Tumoren. Dabei ist es bei soliden Tumoren gut untersucht und basiert auf dem Mechanismus der intratumoralen Hypoxie und Bildung des Hypoxie-induzierten Factors-1 (Kaelin et al 2007). Weniger ist über die genauen Auslösemechanismen von VEGF-Expression in hämato-lymphatischen Tumoren bekannt, wobei die Mechanismen analog zu den in soliden Tumoren beobachteten zu sein scheinen (Dong et al 2007; Frater et al 2008). Auch bei den Lymphomen häufen sich die Hinweise darauf, dass deren Progression von der Induktion der Angiogenese abhängt (Medinger et al 2010; Doussis-Anagnostopoulou et al 2002). Die verfügbaren

Daten zur Angiogenese in Lymphomen weisen neben der Tumervaskularisierung auch auf die Bedeutung der autokrinen und parakrinen VEGF-vermittelten Effekte auf die Proliferation und das Überleben von Lymphomzellen (Ruan et al 2009) hin.

Antiangiogenetische Strategien sind zu einer wichtigen therapeutischen Modalität für solide Tumoren geworden. Mehrere antiangiogene Mittel, die als Target die VEGF-Signalwege verwenden, werden auch in klinischen Studien zur Behandlung von Lymphomen genutzt. In einigen Fällen sind diese Wege zu vielversprechenden therapeutischen Targets geworden (Pro et al 2004; Wiernik et al 2008; Witzig et al 2009).

1.4 Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs)

1.4.1. Das Enzym Farnesyltransferase

Die Farnesyltransferase ist ein Enzym, das die Farnesylierung bestimmter Proteine katalysiert. Dieser Prozess gehört in den Bereich der posttranslationalen Modifikation. Der Begriff „posttranslationale Modifikation“ beschreibt eine Reihe von chemischen

Einleitung

Veränderungen, die ein Protein erfährt, bevor es seine eigentliche Funktion aufnehmen kann. Hierzu gehören zum Beispiel Modifikationen bestimmter Aminosäure-Reste, wie Glykosylierung oder Phosphorylierung, Reaktionen die die Proteinfaltung beeinflussen, die Bildung von Komplexen aus mehreren Untereinheiten, der Proteintransport und –abbau sowie Farnesylierung (Alberts B et al. 2008).

Die Farnesyltransferase ist ein heterodimeres Zink-Metalloenzym, bestehend aus einer α -Untereinheit, welche anhand von den Cofaktoren Mg^{2+} oder Mn^{2+} die Übertragung des Farnesylrestes auf das Protein katalysiert, sowie einer β -Untereinheit, welche für die Bindung des Proteins verantwortlich ist und das aktive Zentrum des Enzyms enthält (Andres DA et al., 1993).

Die Farnesylierung erfolgt als erster Schritt von mehreren posttranslationalen Modifikationen. Hierbei wird die 15-Kohlenstoff Farnesyl-Gruppe kovalent an die Seitenkette der Aminosäure Cystein von den wichtigsten zellulären Polypeptiden geknüpft. Zu denen gehören die kleinen Guanosin Triphosphat-bindende Proteine der Ras, Rho und Rheb Familien; nukleare Lamine, die Kinetochor

Proteine CENP-E und CENP-F und das Chaperon-Protein HDJ-2/Hsp40 (Sebti et al 2005). Durch diese Modifikation gewinnt das Protein lipophile Eigenschaften und kann in die Zellmembran integriert werden.

Die Farnesyltransferase Inhibitoren (FTIs), Substanzen, die diese enzymatische Reaktion verhindern, vermindern Zellproliferation und induzieren Apoptose in verschiedenen präklinischen Modellen (Epling-Burnette et al 2004; Santos et al 2004; Karp et al 2001; Sebti et al 2004).

1.4.2. Zielstrukturen der Farnesyltransferase

- **Inhibierung der Ras-Proteine**

Viele Studien haben gezeigt, dass die Hemmung der Farnesyltransferase (FTase) ein attraktiver Ansatz in der Krebstherapie durch direkte Hemmung des Ras-abhängigen Signalweges darstellt (Adjei, 2001; Ravoet et al 2008). Das onkogene Ras behindert die Expression von Fas (CD95). Die Ras-transformierten Zellen werden dadurch resistent gegenüber Fas-induziertem Tod, welches zum Überleben und Proliferation von

Tumorzellen führt. FTase-Inhibitoren induzieren Wachstumshemmung und Apoptose verschiedener humaner Krebszellen, indem sie die post-translationale Aktivierung von Ras verhindern.

- **Expression von CD95**

Von der Arbeitsgruppe Zhang wurde gezeigt, dass eine Kultur der Ras-transformierten Zellen in Gegenwart des FTI LB42722 zur Hochregulierung von Fas-Expression (CD95) führt. Fibroblasten mit H-ras Mutation zeigen einen Anstieg der CD95-Rezeptoren nach 48-stündiger Inkubation mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor LB42722 hin (Zhang et al., 2002). Weitere Studien belegen einen Anstieg der Rezeptor-Expression, welche die Sensitivität der Zellen gegenüber der Apoptose veränderte (Chan et al., 1999; Fulda et al., 1998).

- **Herunterregulation von VEGF-Sekretion**

FTase-Inhibitoren hemmen die VEGF-Expression und Sekretion von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen durch Überexpression von mutiertem Ras (Rak et al, 2000; Han et al, 2005). Seinerseits

reguliert das onkogene Ras über den MAPK- und den PI3K -Weg VEGF hoch (Chen et al 2001; Berra et al 2000).

Weitere Ras- unabhängige Mechanismen der Herunterregulation von VEGF-Sekretion wurden in neueren Studien beschrieben. Das FTI LB42708 unterdrückt das Tumorwachstum und die Angiogenese sowohl in den Ras-mutierten als auch in den Wildtypzellen. Darüber hinaus unterdrückt es die VEGF-induzierte Ras-Aktivierung und nachfolgend *in vitro* und *in vivo* Angiogenese durch die Blockierung der MAPK- und PI3K/Akt-Wege in Endothelzellen (Chun-Ki Kim et al 2010).

- **Blockierung der Mitose-Polymere**

Die Eingriffe in die bipolare Spindelbildung beim Übergang von der Prophase in die Metaphase bei der Mitose stellen einen weiteren Mechanismus der Wachstumskontrolle von Neoplasien dar.

Die Zentromer-assoziierte Proteine E und F (CENP-E und CENP-F) sind Mediatoren des G2-M-Checkpoints im Zellzyklus (Costa 2005). In diesem Schritt wird das Genom auf Schäden überprüft, bevor es in die Mitose eintritt. Die Farnesylierung der Proteine CENP-E und CENP-F ist notwendig für die Interaktion zwischen den Mikrotubuli und dem Centromer und somit für die Trennung der Schwesterchromatiden während der Mitose. Ist die Farnesylierung dieser Proteine gestört, kommt es zu einer Akkumulation von Zellen in diesem Schritt und somit zu einer verminderten Replikation (Ashar et al., 2000).

Einige Studien beschreiben einen Anstieg der antineoplastischen Aktivität der Kombination von FTIs mit Antimikrotubuli-Agenzien (Zhu et al. 2005).

- **Hemmung des MAPK/ ERK-Signalwegs**

Zytotoxische Effekte von Tipifarnib in mehreren hämatologischen Neoplasien sind auf eine Inhibierung des MAPK-Signalweges zurückzuführen (Sepp-Lorenzino et al. 1995; Epling-Burnette et al. 2004; Dai 2008). Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Inhibierung des MAPK-

Signalwegs seinerseits zur Inhibierung von H-Ras führt, welche ihrerseits zur B-cell leukemia/lymphoma-2 interacting mediator of cell death (Bim)- Hochregulation und zu einer Bim-abhängigen Apoptoseinduktion bei malignen lymphoiden Zelllinien führt (Ding et al. 2011).

- **Die Hemmung von mTOR**

mTOR stellt eine weitere Zielstruktur der FTIs dar (Castro et al.2003). Neuere Arbeiten haben vor allem die Rolle der Rheb (*Ras-homolog-enriched-in-brain*) vermittelten mTOR Inhibition als Mechanismus der FTI-vermittelten Anti-Lymphom Effekte in murinen Lymphomen und Leukämien betont (Mavrakis et al.2008).

Rheb ist ein proximaler Aktivator der mTOR, der die TOR-abhängigen Effekte wie Apoptose und Seneszenz reguliert und somit Behandlungsempfindlichkeit bedingt.

- **Die Hemmung von c-FLIP**

Einige Studien haben eine Hemmwirkung von Farnesyltransferasehemmern auf c-Flip beschrieben. So zum Beispiel beschrieb die Arbeitsgruppe von Takada eine Inhibierung von c-Flip durch den Farnesyltransferasehemmer SCH 66336 in allen

untersuchten Zelllinien (Takada et al., 2004). Eine weitere Studie beschrieb eine Hemmwirkung von Tipifarnib auf c-Flip in Lungenkarzinom-Zelllinien (Yuanzheng et al 2007). Das Protein c-FLIP blockiert über die Bindung am Rezeptor des DISC die Rekrutierung und damit die Aktivierung der Procaspase 8 (Takada et al., 2004). Durch die Inhibierung des c-FLIPs wird das Hemmmechanismus auf dem CD95-Signalweg beseitigt und über Bindung von Caspase 8 wird Apoptose induziert (siehe auch 1.3.3).

- ***Inhibition of multidrug resistance (MDR)-transporters***

Im Laufe der Entwicklung der FTIs fiel ihre Analogie zu den Propafenonderivaten, die als Inhibitoren des humanen MDR funktionieren, auf. Daraufhin haben mehrere Studien die Effekte von Farnesyltransferasehemmern auf MDR-Transporter untersucht. Es wurde gezeigt, dass Tipifarnib ein potenter Hemmer sowohl von *Multidrug resistance* Proteinen 1 und 2 (MRP) als auch von PGP ist (Medeiros et al 2007). Auch SCH66336 zeigte sich als potenter Inhibitor von MRP 1, MRP 2 sowie PGP (Wang et al.2001; Wang et al.2003). Dies ist auch vor dem Hintergrund interessant, dass die Wirksamkeit von

Doxorubicin in der Krebstherapie durch MDR-Transporter reduziert werden kann, da es ein Substrat sowohl von PGP als auch von MRP 1 und 2 ist (siehe auch 1.2.2). Es wäre also denkbar, mit einer kombinierten Anwendung eines MDR-Transporter-Inhibitors wie Tipifarnib und Doxorubicin, die Wirkung von Doxorubicin durch MDR-Transporter-Hemmung zu erhöhen.

1.4.3 Aktuelle klinische Anwendung von FTIs in hämatologischen Malignitäten

Obwohl FTIs ursprünglich entwickelt wurden, um onkogene Ras-Aktivität zu hemmen, zeigen die jüngsten Studien, dass FTIs auch mit anderen Zielstrukturen interagieren (siehe 1.4.2.).

Es gibt zahlreiche Studien über Aktivität von Tipifarnib bei akuter myeloischer Leukämie sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie (Epling – Burnette et al 2010). Derzeit befindet sich Tipifarnib in Phase III Studien bei zuvor unbehandelten älteren Erwachsenen mit

akuter myeloischer Leukämie und bei Patienten im Alter von über 65 Jahren.

Weitere Hinweise auf eine antineoplastische Aktivität von Tipifarnib als Monotherapie liefern die Therapieerfolge beim myelodysplastischen Syndrom und bei Multiplem Myelom in klinischen Studien (Alsina et al., 2004; Beaupre et al., 2004; Yanamandra et al., 2006; Fenaux and Co 2007).

Neuere Studien zeigen darüber hinaus, dass Tipifarnib als Monotherapie über eine antineoplastische Aktivität bei stark vorbehandelten Patienten mit T-Zell-NHL und rezidivierendem/refraktärem HL verfügt (Witzig et al 2011).

FTI verfügen über mehrere Vorteile: sie sind oral verfügbar, nebenwirkungsarm und es existieren bereits Phase-II- und III-Studien mit Lonafarnib und Tipifarnib.

1.5 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) haben lipidsenkende Eigenschaften und verfügen über pleiotrope biologische Effekte (Zhou et al 2010). Diese pleiotrope Effekte sind vermutlich hauptsächlich auf

die Hemmung der Prenylierung von niedrigmolekularen GTPasen zurückzuführen. Diese spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse (Zhou et al 2010; Liao et al 2005; Fritz et al 2009).

Es werden zunehmend mehr Hinweise auf eine präventive Wirkung von Statinen auf eine Vielzahl von Krebsarten dokumentiert (Demierre et al 2005; Harutaka et al 2004). Kürzlich fand die EPILYMPH Studie ein geringeres Risiko von Lymphomen, einschließlich HL, bei mit Statinen behandelten Patienten (Fortuny et al 2006). Außerdem gibt es Hinweise auf eine antineoplastische Aktivität von Simvastatin sowohl in HL-Zelllinien als auch in einem Xenograft-Modell für das menschliche HL (von Tresckow B et al 2007). Diese scheint in HL-Zellen über Förderung von Caspase-verwandter Apoptose und über den Isoprenoidbiosyntheseweg zu laufen. Interessanterweise scheint die Toxizität von Simvastatin in HL-Zelllinien zumindest teilweise durch eine indirekte FTI-Wirkung des Statins bedingt zu sein (von Tresckow B

et al 2007), was eine präklinische Evaluation von FTIs bei HL nahelegt.

Statine erhöhen die Antitumoraktivität zahlreicher Krebsmedikamente *in vitro* und *in vivo* (Fritz et al 2009, Bocci et al.2005). Hohe Dosen von Statinen erhöhen *in vitro* die Aktivität von Chemotherapeutika (Cafforio et al 2005; Agarwal et al.1999) durch die Beeinträchtigung des G1-S-Überganges (Rao et al 1998) und durch das Triggern von Apoptose (Feleszko et al 2000; Dimitroulakos et al 2001). Weiterhin fördern Statine eine TNF-ausgelöste Apoptose (Ahn et al 2007) und tragen zur Überwindung der Chemoresistenz durch Hemmung von NF- κ B bei (Ahn et al 2008).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Heute basiert die HL-Therapie auf Chemotherapeutika. Chemotherapeutika sind „schmutzige“ Drogen: sie sind unspezifisch und haben zahlreiche Nebenwirkungen. Ein weiteres Problem der

aktuellen Chemotherapieregimen ist Multidrug Resistenz. Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte mit alternativen, beim HL bisher nicht eingesetzten Substanzen und Kombinationen ist überfällig. Aus ethischen Gründen müssen vor Tierversuchen und ersten Phase I Studien bei Patienten in einem *in vitro*-Modell erste Wirksamkeitsprüfungen unternommen werden.

Auf der Grundlage der oben aufgeführten Ergebnisse (siehe 1.5) haben wir folgende Hypothese bezüglich der Simvastatin-Wirkung auf HL-Zellen aufgestellt:

- Doxorubicin übt in Anwesenheit von Simvastatin einen stärkeren zytotoxischen Effekt auf HL-Zellen aus.

Ferner haben wir auf der Grundlage von zahlreichen Ähnlichkeiten zwischen den Entstehungsmechanismen von HL und den Zielstrukturen von FTI und aufgrund der bereits bestehenden Berichte über alleinige zytotoxische Aktivität von FTI in hämatologischen Neoplasien (siehe 1.4.3) folgende Hypothesen bezüglich der Tipifarnib-Wirkung auf HL-Zellen aufgestellt:

- Der FTI Tipifarnib besitzt eine alleinige zytotoxische Aktivität in HL-Zellen

- Doxorubicin übt in Anwesenheit von Tipifarnib einen stärkeren zytotoxischen Effekt auf HL-Zellen aus.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, untersuchten wir die Wirkung des FTI Tipifarnib und des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin als alleinige Agenzien auf diverse HL-Zelllinien sowie in Kombination mit Doxorubicin unter Verwendung von *in vitro* Modellsystemen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Materialien

Aqua dest.		Labor für Immuntherapie, Uniklinik Köln
0,9% NaCl-Lösung		Delta-Pharma GmbH
RPMI 1640-Medium		PAA Laboratories GmbH
FCS (<i>fetal calf serum</i>)		PAA Laboratories GmbH
DMSO Dimethylsulfoxid		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Simvastatin		PAA Laboratories GmbH
Doxorubicin		PAA Laboratories

Material und Methode

		GmbH
Trypanblau-Lösung		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenazin		PAA Laboratories GmbH
XTT-Salz		PAA Laboratories GmbH
Tipifarnib		Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, LLC
Gemcitabin		PAA Laboratories GmbH
Piperacillin		PAA Laboratories GmbH
Insulin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Natriumselenit		Sigma-Aldrich

Material und Methode

		Chemie GmbH,
Lithiumchlorid		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Ascorbinsäure		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Apotransferrin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)		PAA Laboratories GmbH
HAMsF12		PAA Laboratories GmbH
FACS Clean,		BD, Heidelberg
FACS Flow		BD, Heidelberg
FACS Cellwash		BD, Heidelberg
FACS Rinse		BD, Heidelberg

2.2 HL-Zelllinien

L428	Hodgkin-Lymphom (freundlicherweise gestellt von Prof. V. Diehl, Köln)
L540CY	Hodgkin-Lymphom (freundlicherweise gestellt von Prof. V. Diehl, Köln)
KMH2	Hodgkin-Lymphom (freundlicherweise gestellt von Prof. V. Diehl, Köln)

2.3 Geräte

Durchflußzytometer (ACS) FACSCalibur	Becton-Dickinson Labware
Falcon-Röhrchen	Becton-Dickinson Labware
Mikrotiterplatte	Becton-Dickinson Labware
Ultrazentrifuge Optima LE 80 K	Beckmann Instruments Inc.
Zellkulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson
Brutschrank	B5060 EK/CO2, Heraus
Ein- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg/BRD
Mikroskop	Axiovert 25 Zeiss, Jena/BRD

LaminAir Sterilarbeitsbank	HB2448	Heraeus Hanau/BRD	Instruments,
Analysewaage		Mettler	
Neubauer-Zellkammer		Faust/Merck, Darmstadt/BRD	
Biofuge		Heraeus Hanau/BRD	instruments,
Durchflußzytometer (ACS) FACSCanto		BD Biosciences	
Vortexgerät		Heidolph, Schwabach/BRD	
Gefrierschränke		Sanyo, München/BRD	
Kühlschränke		Siemens, Berlin/BRD	
Accu-Jet pro		Brand, Wertheim/BRD	

2.4. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	24 x 24 mm, Brand
Einfrierröhrchen	1,5 ml, Sarsted
Kanülen	Microlance 3, 0,9 x 40 mm, BD
Leucosep®- Zentrifugenröhrchen	Leucosep®, Greiner
Nitrozellulose- Membran incl. Filter	LC2000, Invitrogen

Objekträger	76 x 26 mm, Engelbrecht
Pippenzubehör	Standardtips 10-100 μ l, Eppendorf, 100-1000 μ l, Sarstedt
Reaktionsgefäße	1,5 ml, Sarstedt
Sterile Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Costar
Zellkulturflaschen	175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ² , Nunc
Zellkultur Multiwell-Platten	24er-Well, Nunc

2.5 Zellkultur

Die Züchtung der Zellen erfolgte in Schräghalskulturflaschen. Die Effekte der Pharmaka wurden an 3 verschiedenen HL-Zelllinien und an murinen Kardiomyozyten untersucht.

Die ventrikulären und atrialen murinen Kardiomyozyten Zellkulturen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Jochen Müller-Ehmsen zur Verfügung gestellt.

Die HL-Zelllinien wurden in mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 Kulturmedium kultiviert. Die Kardiomyozyten wurden in DHM/HAMsF12 Kulturmedium mit Zusatz von Piperacilin (0,0125%), Insulin (0,025%), Natriumselenit (0,1%), Lithiumchlorid

(0,1%), Ascorbinsäure (0,1%) und Apotransferrin (0,1%) kultiviert. Alle Zelltypen wurden bei 37°Celsius in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Die Hodgkin Lymphom Zellkulturen wurden am Vortag des Versuchs und - bei dessen Ausbleiben jedoch mindestens drei Mal pro Woche - mit frischem Nährmedium, das zuvor auf 37 ° erwärmt wurde, versorgt. Auf gleicher Weise sind die Kardiomyozyten zwei Mal pro Woche versorgt worden. Dabei wurde etwa die Hälfte der Zellsuspension durch frisches Kulturmedium ersetzt.

2.6 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff in 0,5 ml Kryoröhrchen eingefrorenen und gelagerten Zellen konnten nach Abspülen mit Methanol (100%) zur Verhinderung etwaiger Mykoplasmen-Kontamination - durch schnelles Auftauen bei 37°C in einem Wasserbad revitalisiert werden und wurden danach sofort in 10 ml frisches Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 Min. und Abnahme des Überstands wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt. Nachfolgend

wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml bei Suspensionszellen in geeignete Kulturgefäße ausgesät.

2.7 Einfrieren von Zellen

Zur Gefrierkonservierung wurden logarithmisch wachsende Zellen sedimentiert und in Kulturmedium mit auf 20% erhöhten FCS-Gehalt und 10% DMSO-Anteil in einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Nach einer Lagerung bei -70°C für 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und konnten so über Jahre gelagert werden.

2.8 Bestimmung der Zellzahl

Vor jedem Experiment wurden die Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau gezählt. Mit der Trypanblau-Färbung können lebende und tote Zellen quantifiziert werden. Da tote oder absterbende Zellen keine intakte Zellmembranen mehr aufweisen, kann der Farbstoff in die Zelle eindringen kann. Bei einer

lichtmikroskopischen Zählung können somit tote Zellen durch ihre blaue Färbung erfasst werden. Lebende Zellen bleiben ungefärbt. Für die Zellzählung wurden 100 µl Zellsuspension mit der gleichen Menge einer Trypanblaulösung verdünnt. Ein Aliquot von 10 µl dieser Mischung wurde unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch innerhalb von zwei schräg gegenüberliegenden peripheren Quadraten. Das Ergebnis wurde mit 10^4 multipliziert um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

2.9 Plattieren der Zellen

Nach der Zellzählung wurde die Zellsuspension mit entsprechender Konzentration in einem Volumen von 50 µl pro Well in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Danach wurden die Pharmaka appliziert. Um einen eventuellen Einfluss von DMSO, in welchem Simvastatin und Tipifarnib gelöst sind, auf die Zellen auszuschalten, wurde die DMSO Konzentration bei allen

Pharmakakonzentrationen und bei der Kontrolle gleich gehalten.

Ebenfalls wurden Zellen der Negativkontrolle auf eine separate Zellkulturplatte ausgesät.

2.10 Applikation und Inkubation der Pharmaka

Simvastatin und Tipifarnib wurden tiefgekühlt aufbewahrt und erst kurz vor der Anwendung aufgetaut. Doxorubicin wurde im Kühlschrank unter Lichtschutz aufbewahrt.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit des jeweiligen Pharmakons als Monotherapie, wurde bei der Applikation der Substanzen wie folgt vorgegangen: Zur Versuchsdurchführung waren die HL-Zelllinien in entsprechender Konzentration mit einem Volumen von 100 µl auf 96-Well-Platten ausgesät worden (Siehe auch 2.9 Plattieren der Zellen). Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem jeweiligen Pharmakon. Hierfür wurden Simvastatin, Tipifarnib und Doxorubicin mit dem jeweiligen Kulturmedium entsprechend konzentriert und in doppelter Konzentration der gewünschten

Endkonzentration in einem Volumen von 100 μl hinzugefügt. Kontrollzellen erhielten analog dazu Kulturmedium in gleicher Menge.

Für die simultane Gabe einer Kombination aus Tipifarnib/Doxorubicin und Simvastatin/Doxorubicin wurde eine Lösung erstellt, die sowohl Doxorubicin als auch Tipifarnib bzw. Simvastatin in vierfacher Konzentration der entsprechenden Endkonzentration enthielt. Hiervon wurden 50 μl auf die Zellsuspension appliziert. Bei Zellen, die mit einer Kombination aus Doxorubicin und Simvastatin in einem Zeitintervall von 96 Stunden behandelt werden sollten, wurde Simvastatin in vierfacher Konzentration der gewünschten Endkonzentration in 50 μl auf die Zellen gegeben. Analog dazu erhielten Kontrollzellen 50 μl Kulturmedium. 48 Stunden später wurde dann Doxorubicin hinzugefügt, ebenfalls in vierfacher Konzentration und einem Volumen von 50 μl . Kontrollzellen erhielten wiederum 50 μl Kulturmedium.

2.11 Messung der Zellviabilität:

Zellproliferationstest XTT

Dieser kolorimetrische Test kann einerseits zur Quantifizierung des Zellwachstums und der Viabilität, andererseits auch zum Nachweis der Zytotoxizität verschiedener Substanzen benutzt werden (Scudiero et al.,1988). Als Maß für die Zellaktivität der Zelllinien wurde deren mitochondriale Aktivität durch Testung mit XTT- Reagenz untersucht Die Stoffwechselleistung von intakten Mitochondrien vitaler Zellen lässt sich durch die Reduktion von XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid) zu einem Formazin-Salz dokumentieren. Das Formazin ist wasserlöslich und mit einem Spektralphotometer zwischen 450 und 500 nm messbar. Dieser Vorgang geht mit einem Farbumschlag der Reagenzien von gelb zu orange einher. Die prozentuale Änderung der Lichtabsorption im Spektralbereich von 490nm bis 650nm wird durch im Rahmen der Reduktion von XTT bedingten Farbumschlag gemessen und lässt eine Quantifizierung der Zellvitalität der einzelnen Kulturen zu. Die Zellaktivität ohne

Pharmakazugabe wurde als Standard definiert und beträgt somit 100%. Die prozentualen Änderungen der Extinktion sind der Maßstab für prozentuale Veränderung der Zellaktivität unter Pharmakaeinwirkung.

Zum optimalen Ablauf der Reaktion wurde 2% ige PMS-Lösung als Elektronenakzeptor zur XTT-Salzlösung zugefügt. Die Endkonzentration von XTT-Salzlösung beträgt 0,5 mg/ml. 50 µl dieser PMS-XTT-Lösung wurden dann jeweils in einen Well der einzelnen Versuchsansätze gegeben. Bei allen Versuchsansätzen wurde eine Einwirkzeit des XTT-Reagenz von 24 Stunden gewählt. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkungszeit erfolgte eine Auswertung im Spektralphotometer bei 490 nm.

2.12 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln bzw. von Zellen in Suspension. Sie ermöglicht eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu untersuchen, wobei die Zellen einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom

vorbeigeleitet werden. Dabei wird die Größe basierend auf der Vorwärtsstreuung, die interne Komplexität anhand der Seitwärtsstreuung des Lichts sowie verschiedene potentielle Zelleigenschaften mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gleichzeitig gemessen (Raffael et al 1994). Diese Messwerte werden mithilfe von einem Cytofluorometer erhoben und an eine angeschlossene Computereinheit weitergegeben. Die Datenausgabe kann sowohl numerisch in Form von statistischen Messgrößen (Mittelwert, Median, etc.) als auch in graphischer Form als Histogramm oder Punktwolke erfolgen.

Dank einer intrinsischen Eigenfluoreszenz von Doxorubicin stellt die Durchflusszytometrie ein hervorragendes Verfahren dar, um die intrazelluläre Konzentration von Doxorubicin indirekt zu bestimmen. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration des intrazellulär gebundenen Anthrazyklins (Jaroszeski et al 1999). In der vorliegenden Studie wurden die Fluoreszenz-Aufnahmen mithilfe einer Wellenlänge von 488nm erhalten, was nah an dem Anregungsmaximum von Doxorubicin (480 nm) liegt. Zur

Darstellung von Doxorubicin -Fluoreszenz wurde die Emission beim Emissionsmaximum von Doxorubicin, zwischen 560 und 590 nm detektiert. Folglich ist die mittlere Fluoreszenzintensität ein Maß für die Menge des Fluoreszenzfarbstoffes Doxorubicin pro Partikel.

Um Kombinationseffekte von Tipifarnib und Doxorubicin zu untersuchen wurden die Zellen mit Tipifarnib (2 μ M), Doxorubicin (2 μ M) und deren Kombination (jeweils 2 μ M) unter Standardbedingungen inkubiert. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zentrifugiert (2 min bei 1000U/min) und der Überstand wurde verworfen. Zu den Zellen wurde jeweils 500 μ l eiskalter PBS-Puffer mit 0,1% BSA zugesetzt. Die Suspensionen wurden verdunkelt und auf Eis gestellt. Unmittelbar danach wurden FACS-Röhrchen mit den entsprechenden Lösungen beladen und analysiert. Die Festlegung eines Basiswertes geschah mit Hilfe einer Negativkontrolle, die keinen Fluorochromzusatz enthält. Dadurch wird die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt und von den Fluorochromsignalen abgegrenzt (Raffael A. et al 1994). Die Fluoreszenzintensität von jeweils 1×10^6

Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und unter Verwendung der Software CellQuest analysiert.

2.13 Statistische Analysen

Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism®, Version 5.

Die Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test

Gepaarte, stetige Daten wurden mit dem Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test analysiert.

Dieser Test ist ein Zweistichprobentest für verbundene Stichproben. Es handelt sich um

einen nichtparametrischen Test, d.h. dieser Test setzt nicht voraus, dass die Messgrößen

normalverteilt sind. Dabei werden die Differenzen zwischen den zu vergleichenden

Wertepaaren gebildet und diesen werden wiederum nach ihrem absoluten Zahlenwert in

wachsender Reihenfolge Rangzahlen R_- und R_+ zugeordnet. Anschließend wird jeweils aus

den positiven und negativen Rangzahlen die Summe gebildet

CalcuSyn®

Um die Wirkung einer Kombination von 2 chemischen Substanzen einer quantitativen Dosis-Effekt Analyse zu unterziehen, wurde ein spezielles Software-Programm eingesetzt (CalcuSyn). Dabei wird von dem Massenwirkungsgesetz für chemische Reaktionen unter stationären Bedingungen eine Median-Effekt Gleichung abgeleitet und dadurch eine Basis für den Algorithmus des Rechnerprogramms gelegt (Mitchell, 1986, Jonker et al., 2005, Chou, 2006). Beurteilt werden die Dosis-Effekt-Kurve, *median-effect-plot*, *combination index (CI) plot* und das Isobologramm.

Zunächst werden die sigmoidalen Dosis-Effekt-Kurven durch das Logarithmieren in Geraden mit unterschiedlicher Steilheit transformiert, dies ergibt den *median-effect-plot*. Die Steilheit zeigt an ob eher eine sigmoide oder eher eine hyperbolische Kurve vorliegt. Die combination index (CI)-Isobologram-Gleichung erlaubt, quantitativ die Interaktion zweier Chemotherapeutika oder der Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutikum und Bestrahlung festzulegen.

Material und Methode

0,1-0,3 synergism)	starker Synergismus (strong synergism)
0,3-0,7	Synergismus (synergism)
0,7-0,85 (moderate synergism)	mäßiger Synergismus
0,85-0,9 synergism)	geringer Synergismus (slight synergism)
0,9-1,1	fast Addition (nearly additive)
1,1-1,2 slight antagonism)	geringer Antagonismus (slight antagonism)
1,2-1,45 (moderate antagonism)	mäßiger Antagonismus
1,45-3,3	Antagonismus (antagonism)
3,3-10 antagonism)	starker Antagonismus (strong antagonism)
>10 (very strong antagonism)	sehr starker Antagonismus

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Simvastatin

Es wurde der Einfluss von Simvastatin in sieben verschiedenen Konzentrationen auf die HL-Zelllinien mit einer Inkubationszeit von 48 und 96 Stunden untersucht. Die Zellen wurden bei einer Ausgangszelldichte von $25 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät und mit Simvastatin in Konzentration zwischen 0 und $20\mu\text{M}$ über 48 bzw. 96 Stunden inkubiert (siehe Tab 3.1)

Zunächst wurde in einem initialen Experiment die antiproliferative Wirkung des Statins Simvastatin auf die HL-Zelllinien (L540CY, KMH2, L428) bei 48-stündiger Exposition untersucht. Hierzu wurde das XTT-Assay herangezogen.

Tabelle 3.1: Verabreichung von steigenden Simvastatinkonzentrationen bei HL-Zelllinien

Ergebnisse

HL-Zelllinien	Simvastatinkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Einwirkzeit [h]
L540CY	0; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10	48 ; 96
KMH2	0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20	48 ; 96

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellen mit Simvastatin-Lösungen im Verhältnis 1:1 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Es zeigte sich in den beiden Zelllinien eine dosisabhängige Proliferationshemmung, wobei die Empfindlichkeit von HL-Zelllinien auf Simvastatin beachtlich variierte (siehe Tab.3.2). Als bei der empfindlichsten Zelllinie L540CY nach 48-stündiger Exposition mit $2,5 \mu\text{M}$ Simvastatin nur noch 21,3% der Zellen vital waren, zeigten sich bei KMH2 nach gleicher Exposition 74 % der Zellen vital. So beträgt die mittlere inhibitorische Konzentration der Zelllinie KMH2 das 8-fache ($9,20 \pm 5.8 \mu\text{M}$) des Wertes der Zelllinie L540CY ($1,128 \pm 0.34 \mu\text{M}$).

**Tabelle 3.2 Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC50)
für Simvastatin bei 48- und 96- stündiger Inkubation**

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen
Messungen

HL-Zelllinie	Simvastatin (48h) (μM)	Simvastatin (96h) (μM)
L540CY	1,128 \pm 0,34	1,127 \pm 0,41
KMH2	9,20 \pm 5,8	5,628 \pm 0,135

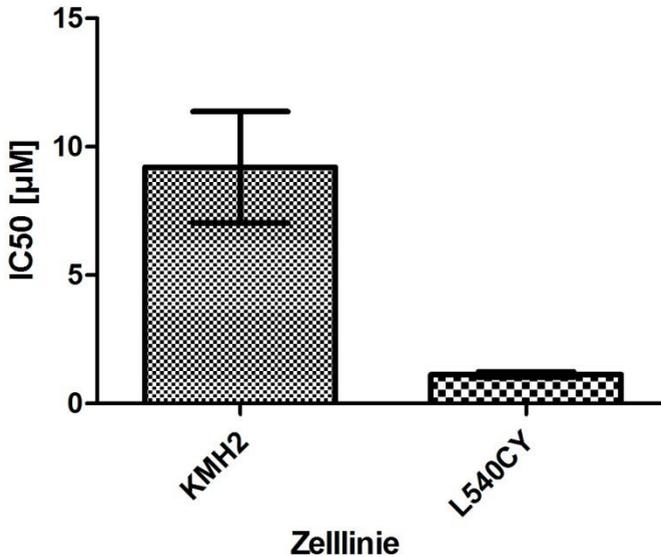
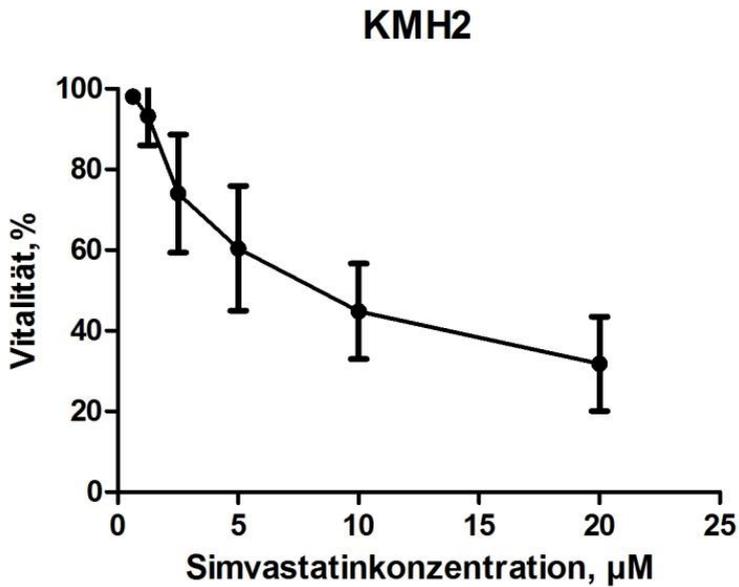


Abb. 3.1. Mittlere inhibitorische Konzentrationen von HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Simvastatin
Zeigt den deutlichen Unterschied in der Empfindlichkeit auf Simvastatin.

Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

A



B

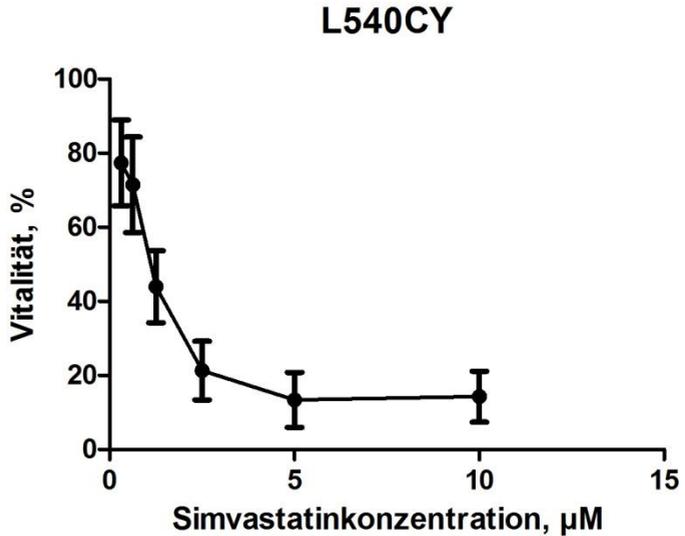


Abb. 3.2. Proliferationshemmung durch Simvastatin

A- KMH2; B- L540CY

Die Änderung der mittleren Vitalitätsrate der HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Simvastatin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die HL-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von $25 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät und über 48 Stunden mit steigenden Dosen von Simvastatin kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Im nächsten Experiment wurde die antiproliferative Wirkung von Simvastatin auf die HL-Zelllinien (KMH2 und L540CY) bei 96-stündiger Exposition untersucht. Auch bei diesem Experiment wurden die Zellen mit der Ausgangszelldichte von $25 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät und mit einer Konzentration zwischen 0 und $20 \mu\text{M}$ Simvastatin über 96 Stunden inkubiert (siehe Tab 3.1). Nach 96 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt. Wie bereits in den 48-stündigen Wachstumskurven, zeigte sich auch in diesem Experiment eine dosisabhängige Proliferationshemmung in den beiden Zelllinien (Abb.3.4) mit deutlichen Unterschieden in der Empfindlichkeit auf den Inhibitor (Abb.3.3). Den höheren IC_{50} -Wert wiesen die KMH2-Zellen mit $5.628 \pm 0.135 \mu\text{M}$ auf, den niedrigeren L540CY-Zellen mit $1.127 \pm 0.41 \mu\text{M}$. Im Vergleich zum 48-stündigen Experiment betrug der IC_{50} -Wert von KMH2-Zellen bei 96-stündiger Inkubation nur noch das 5-fache, anstatt vom 8-fachen des IC_{50} -Wertes der L540CY-Zellen. Somit bestätigten sich indirekt die Ergebnisse des 48-stündigen Experimentes, bei dem sich die KMH2-Zellen deutlich unempfindlicher als die L540CY-Zellen zeigten.

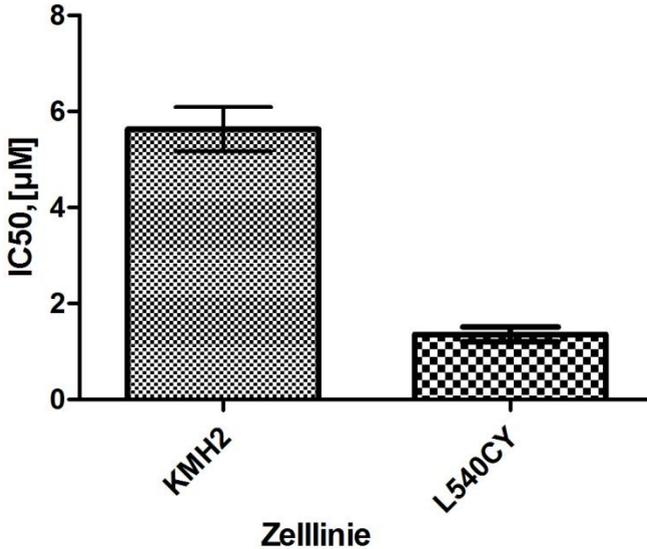
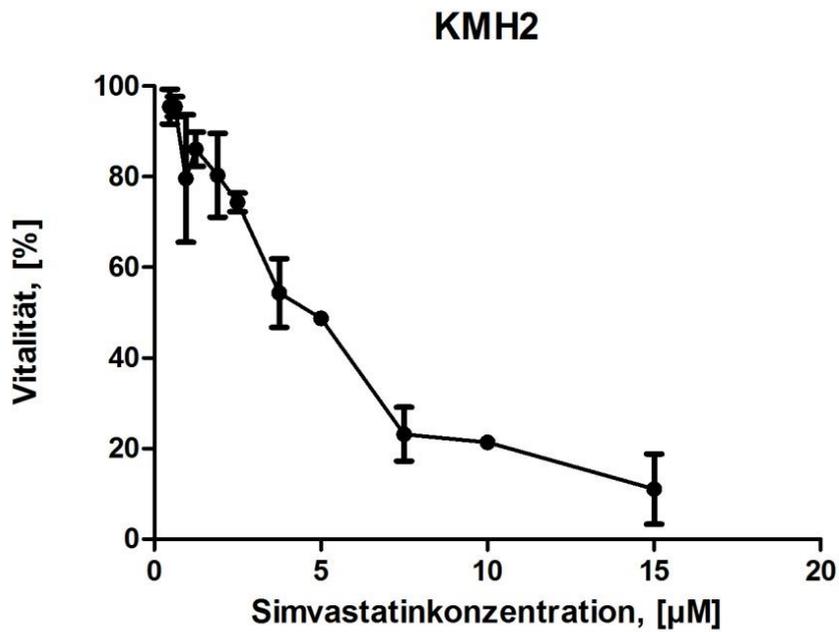


Abb. 3.3. Mittlere inhibitorische Konzentrationen von HL-Zelllinien nach 96-stündiger Inkubation mit Simvastatin
Zeigt den Unterschied in der Empfindlichkeit auf Simvastatin. Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

A



B

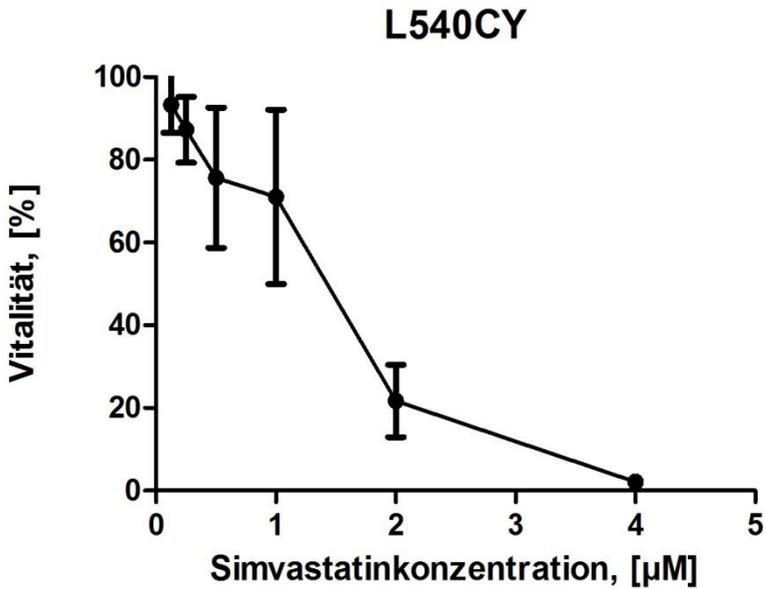


Abb. 3.4. Proliferationshemmung durch Simvastatin

A- KMH2; B- L540CY

Die Änderung der mittleren Vitalitätsrate der HL-Zelllinien nach 96-stündiger Inkubation mit Simvastatin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die HL-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 25×10^5 /ml ausgesät und über 96 Stunden mit steigenden Dosen Simvastatin kultiviert. Nach 96 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt. Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Wie aus der Tabelle 3.1 ersichtlich ist, liegen die mittleren inhibitorischen Konzentrationen bei 48-stündiger Inkubation tendenziell höher als bei 96-stündiger. Die proliferationshemmende Wirkung von Simvastatin auf die HL-Zelllinien scheint also nicht nur dosis-, sondern auch zeitabhängig zu sein.

3.2 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Tipifarnib

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Tipifarnib in einer Konzentrationen von 0,05 bis 6,25 μM auf die HL-Zelllinien mit Einwirkungszeit von 48 Stunden untersucht (siehe Tab.3.3).

Tabelle 3.3: Verabreichung von steigenden Tipifarnibkonzentrationen bei HL-Zelllinien

HL-Zelllinie	Tipifarnibkonzentration [µM]	Einwirkzeit [h]
KMH2	0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8;	48
L540CY	0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5;	48
L428	0,0625; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,39; 0,78; 1,5; 3,125; 6,25	48

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellsuspension mit Tipifarnib-Lösungen im Verhältnis 1:1 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Der FTI Tipifarnib zeigte eine dosisabhängige Proliferationshemmung in allen untersuchten Zelllinien mit deutlichen Unterschieden in der Empfindlichkeit auf den Inhibitor (Abb.3.5). Ähnlich wie bei Simvastatin (siehe

Abb.3.1) erwies sich die KMH2-Zelllinie mit dem IC50-Wert von $0,92 \pm 0,57 \mu\text{M}$ als die am meisten resistente Zelllinie und die L540CY-Zelllinie mit dem IC50-Wert von $0,123 \pm 0,023 \mu\text{M}$ als die sensibelste. Die Zelllinie L428 erwies sich mit dem IC50-Wert von $0,44 \pm 0,12 \mu\text{M}$ als intermediär sensibel.

Tabelle 3.4: Mittlere Inhibitorische Konzentrationen (IC50) für Tipifarnib

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen

HL-Zelllinie	Tipifarnib (μM)
L428	$0,44 \pm 0,12$
L540CY	$0,123 \pm 0,023$
KMH2	$0,92 \pm 0,57$

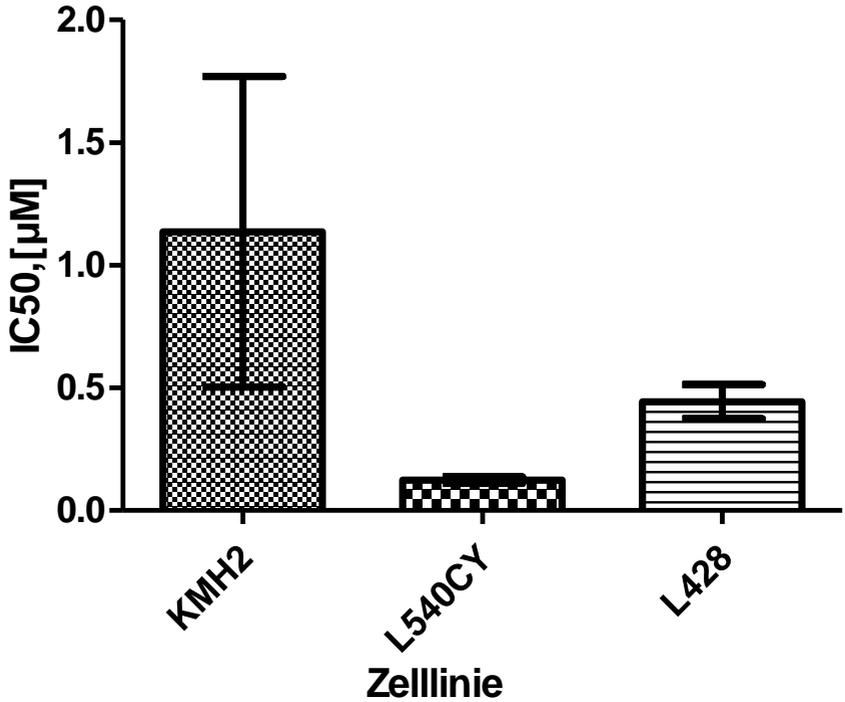
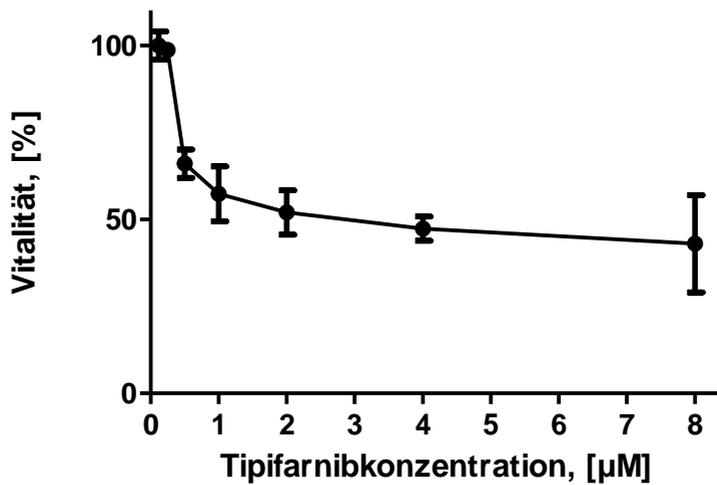


Abb. 3.5. Mittlere Inhibitorische Konzentrationen von Tipifarnib bei HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation
Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

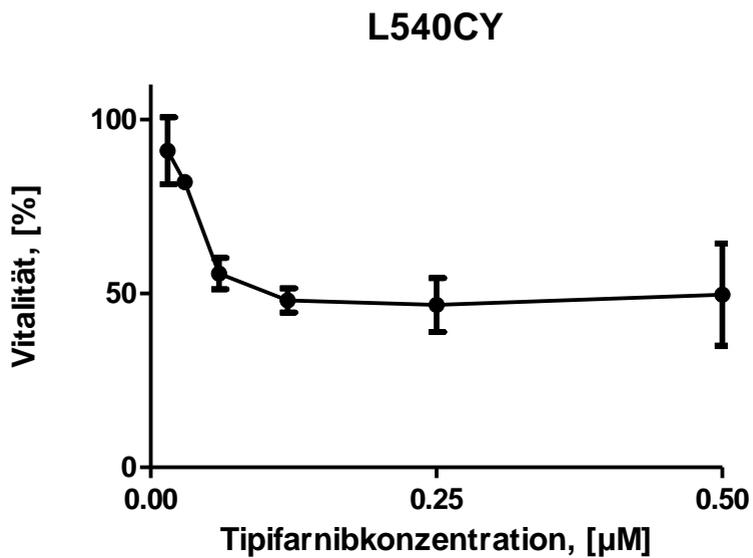
Zelllinie

A

KMH2



B



C

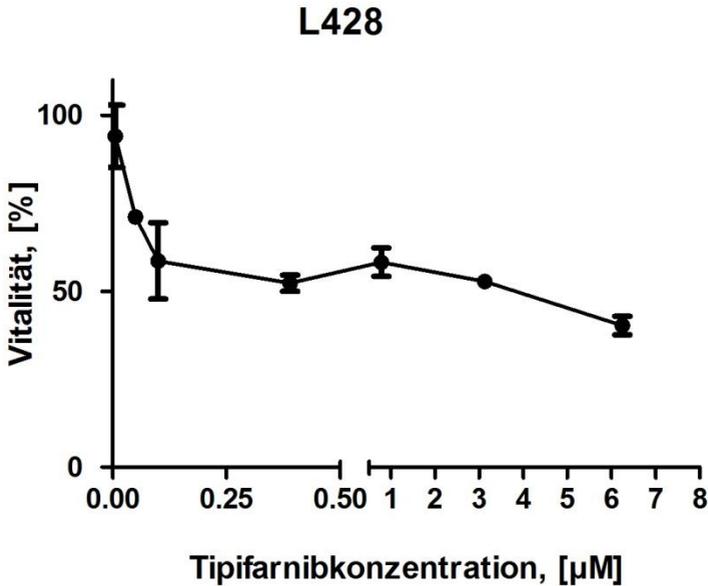


Abb. 3.6 Proliferationshemmung durch Tipifarnib

Die Änderung der mittleren Vitalitätsrate der HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Tipifarnib in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die HL-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 25×10^5 /ml ausgesät und über 48 Stunden mit steigenden Dosen Tipifarnib kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

3.3 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Doxorubicin

Es wurde die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin in sieben verschiedenen Konzentrationen auf die HL-Zelllinien L540CY, KMH und L428 untersucht (siehe Tab.3.5).

Tabelle 3.5: Verabreichung von steigenden Doxorubicinkonzentrationen bei HL-Zelllinien

HL -Zelllinie	Doxorubicinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Einwirkzeit [h]
L540CY	0; 0,0015; 0,003; 0,006; 0,012; 0,025; 0,05	48
KMH2	0; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5	48
L428	0; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28	48

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der

Zellsuspension mit Doxorubicin- Lösungen im Verhältnis 1:1 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Erwartungsgemäß erwies sich Doxorubicin als hochtoxisch in den HL-Zelllinien (siehe Abb. 3.7). Auch in diesem Experiment erwies sich - so wie bei den Versuchen mit Simvastatin - die Zelllinie L540CY mit dem IC₅₀-Wert von $0,01\pm 0,038\mu\text{M}$ als die sensibelste (Abb.3.7). Die Mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Zelllinien L428 und KMH2 lagen bedeutend höher (entsprechend bei $0,059\pm 0,014\mu\text{M}$ und $0,059\pm 0,037\mu\text{M}$), was auf höhere Resistenz gegen Doxorubicin hinweist.

Tabelle 3.6: Mittlere Inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) für Doxorubicin

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen

Ergebnisse

HL-Zelllinie	Doxorubicin [$\mu\text{g/ml}$]
L428	$0,059 \pm 0.014$
L540 CY	$0,01 \pm 0.038$
KMH2	0.059 ± 0.037

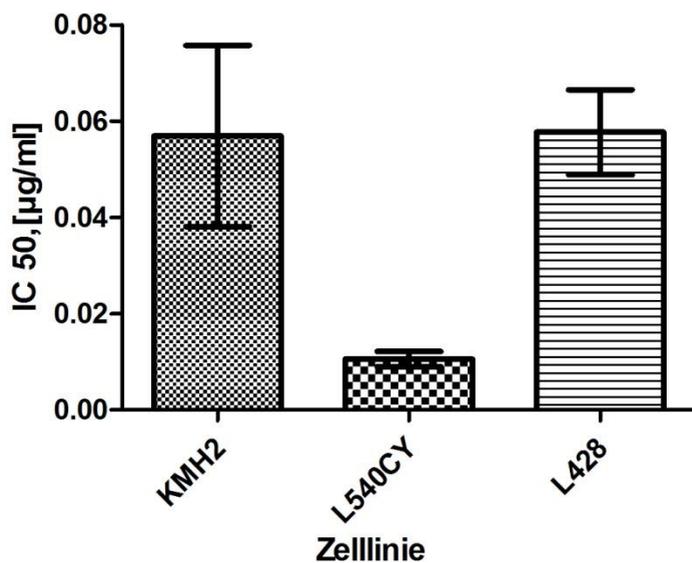
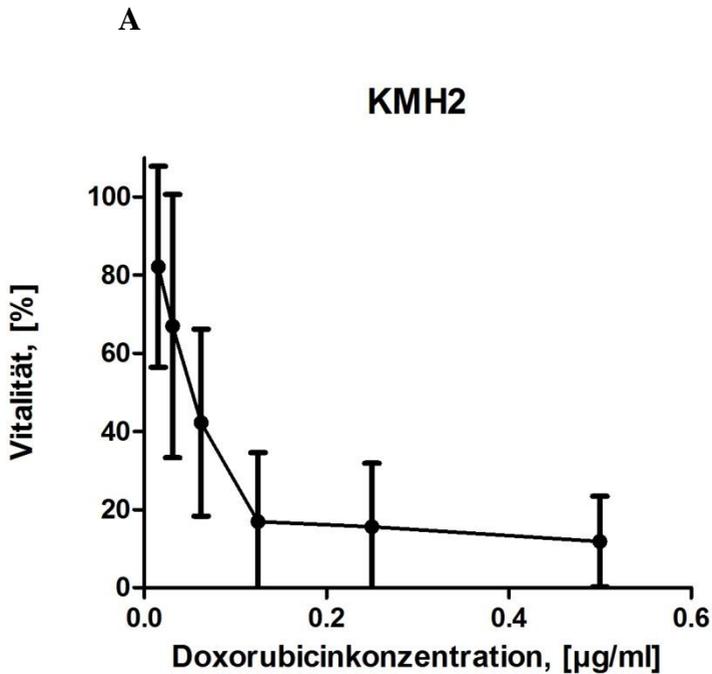


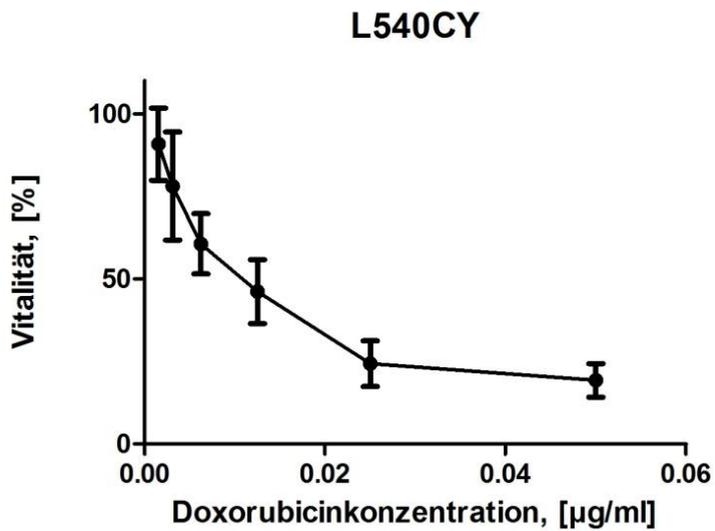
Abb. 3.7. Mittlere Inhibitorische Konzentrationen von HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Doxorubicin

Zeigt deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit auf Doxorubicin.

Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.



B



C

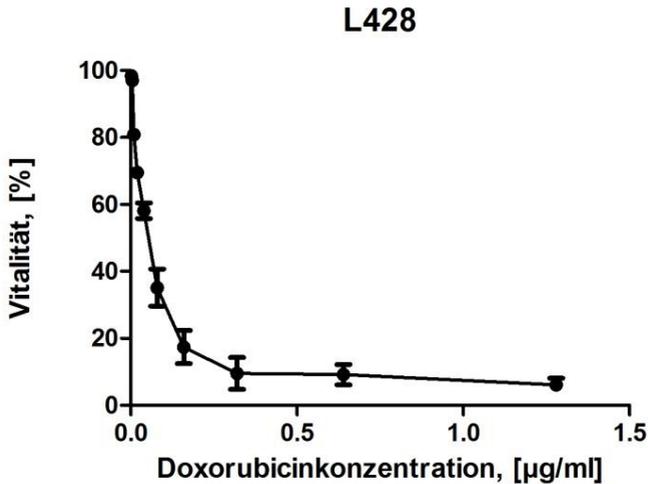


Abb. 3.8. Proliferationshemmung durch Doxorubicin

A- KMH2, B- L540CY, C- L428

Die Änderung der mittleren Vitalitätsrate der HL-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Doxorubicin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die HL-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von 25×10^5 /ml ausgesät und über 48 Stunden mit steigenden Dosen Doxorubicin kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

3.4 Proliferationshemmung der Zelllinien unter simultaner Einwirkung von Doxorubicin und Simvastatin

Es wurde der Einfluss der simultanen Verabreichung von 5 verschiedenen Simvastatin- und Doxorubicinkonzentrationen auf die HL-Zelllinien mit Einwirkzeit von 48 Stunden untersucht (siehe Tab.3.7). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um den „Combination index“ (CI, siehe Kapitel 2.13 „Statistische Analyse“) der Kombination zu ermitteln und so Aussagen über eine antagonistische oder synergistische Wirkung der beiden Substanzen treffen zu können. Die gewählten Konzentrationen basieren auf den vorherigen IC50-Experimenten,

Tabelle 3.7: Simultane Verabreichung von Simvastatin und Doxorubicin bei HL-Zelllinien

HL-Zelllinie	Doxorubicin + Simvastatin	
	[$\mu\text{g/ml}$]	[$\mu\text{mol/l}$]
KMH2	0,015 + 2,3	
	0,03 + 4,6	
	0,06 + 9,2	
	0,12 + 18,4	
	0,24 + 36,8	
L540CY	0,0025 + 0,2825	
	0,005 + 0,565	
	0,01 + 1,13	
	0,02 + 2,26	
	0,04 + 4,52	

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellsuspension mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 Kulturmedium, Doxorubicin- und Simvastatin-Lösungen im Verhältnis 1:3 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Die Kombinationsindices (CI) wurden nach der Messung mittels CalcuSyn Software berechnet (siehe Kapitel 2.13 "Statistische Analyse"). Diese Berechnung zeigte dass die Koinkubation von den HL-Zellen mit den beiden Substanzen zu einem konzentrationsabhängigen antagonistischen Effekt führte. Dieses Ergebnis konnte deutlich an den beiden Zelllinien beobachtet werden. Wie man aus der Tab. 3.8 entnehmen kann, ist der antagonistische Effekt bei der Zelllinie KMH2 stärker ausgeprägt (CI -Werte zwischen 11.7 ± 8.3 und 2.37 ± 0.11) als bei der Zelllinie L540CY (CI -Werte zwischen 1.67 ± 0.98 und 1.33 ± 0.70).

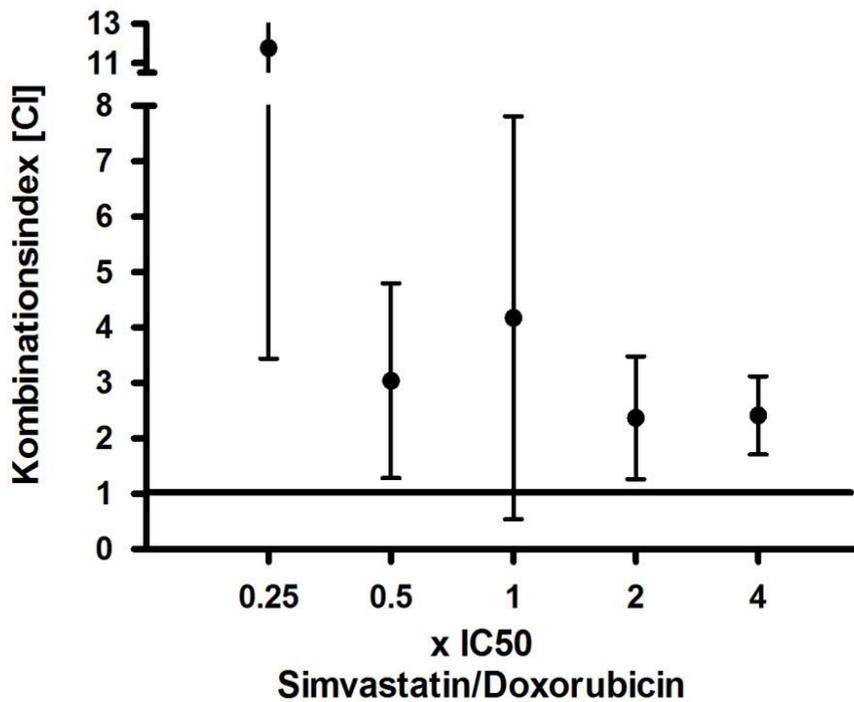
Tabelle 3.8: Kombinationsindices (CI) für die Kombination aus Doxorubicin und Simvastatin

IC50-Werte für Simvastatin (48h): KMH2 =9,20 μ M; L540CY =1,128 μ M (siehe Tab.3.1).

IC50-Werte für Doxorubicin (48h): KMH2= 0.059 μ g/ml; L540CY= 0,01 μ g/ml (siehe Tab.3.3). Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

Konzentration (xIC50)	L540CY	KMH2
0.25	1.41 \pm 0.45	11.7 \pm 8.3
0.5	1.58 \pm 0.7	3.04 \pm 1.76
1	1.67 \pm 0.98	4.18 \pm 3.63
2	1.34 \pm 0.811	2.37 \pm 1.1
4	1.33 \pm 0.70	2.41 \pm 0.7

A



B

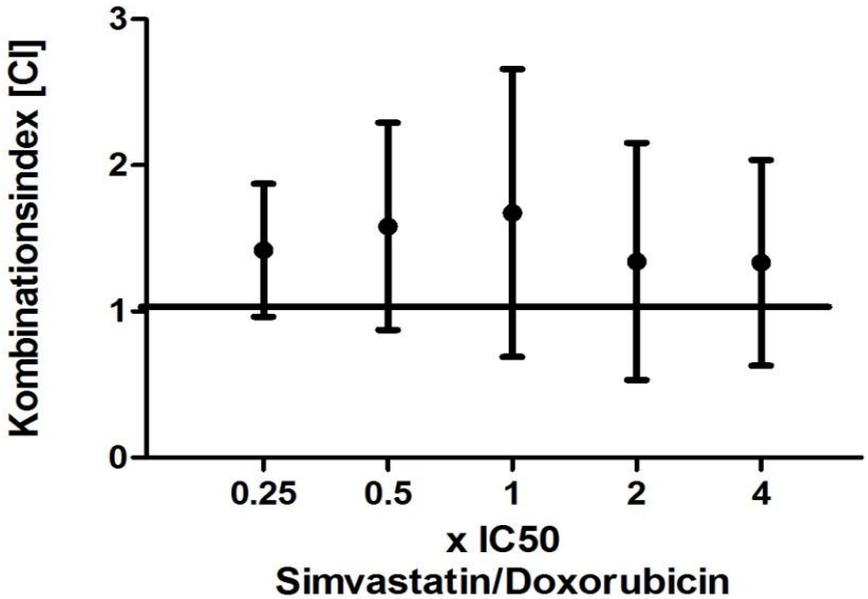


Abb. 3.9. Änderung der Kombinationsindices in Abhängigkeit von der Konzentration

A- KMH2, B- L540CY

Analyse der Messwerte mittels CalcuSyn- Software. Die HL-Zelllinien wurden mit steigenden Dosen Simvastatin und Doxorubicin inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 48 Stunden mittels XTT-Assay bestimmt. Zur Analyse der Messwerte hinsichtlich antagonistischer/additiver/synergistischer Effekte wurde die CalcuSyn-Software verwendet. CI bezeichnet den

Kombinationsindex. $CI > 1.1$ weist auf den antagonistischen Effekt hin, wohingegen CI von 1.1 bis 0.9 und $CI < 0.9$ entsprechend auf einen additiven und einen synergistischen Effekt hinweisen.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

3.5 Proliferationshemmung der Zelllinien unter sequentieller Einwirkung von Doxorubicin und Simvastatin

Da die simultane Gabe von Doxorubicin und Simvastatin zu antagonistischen Ergebnissen zu führen scheint, wurde der Einfluss der sequentiellen Gabe von Simvastatin und Doxorubicin auf die HL-Zelllinien untersucht. Simvastatin und Doxorubicin wurden in 5 verschiedenen Konzentrationen verabreicht (siehe Tab 3.9).

Tabelle 3.9: Sequentielle Verabreichung von Simvastatin und Doxorubicin bei HL-Zelllinien

HL-Zelllinie	Doxorubicin + Simvastatin	
	[µg/ml]	[µmol/l]
KMH2	0,015 + 1,4	
	0,03 + 2,8	
	0,06 + 5,6	
	0,12 + 11,2	
	0,24 + 22,4	
L540CY	0,0025 + 0,32	
	0,005 + 0,65	
	0,01 + 1,3	
	0,02 + 2,6	
	0,04 + 5,2	

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellen mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 Kulturmedium mit Zusatz von DMSO, Doxorubicin- und Simvastatin-Lösung im Verhältnis 1:3 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Die IC₅₀-Werte wurden nicht nur für die simultane Inkubation beider Substanzen (siehe Tab. 3.9), sondern auch für die sequentielle Inkubation bestimmt. Bei der Präinkubation mit Simvastatin für 48 Stunden lagen die Kombinationsindices (CI) zwischen 0,622 ($\pm 0,49$) und 1,56 ($\pm 0,66$) bei der Zelllinie L540CY und zwischen 0,75 ($\pm 0,15$) und 1,35 ($\pm 0,75$) bei der Zelllinie KMH2 (siehe Tab.3.10).

Bei den meisten Konzentrationen wiesen die Kombinationsindices auf antagonistische Effekte hin: 1,2 ($\pm 0,5$); 1,1($\pm 0,34$); 1,05($\pm 0,62$);1,35($\pm 0,75$) bei der Zelllinie KMH2 und 1,54($\pm 0,92$), 1,56($\pm 0,66$), 1,33($\pm 0,45$), 1,34($\pm 0,41$) bei der Zelllinie L540CY.

Tabelle 3.10: Kombinationsindices (CI) für die Kombination aus Doxorubicin und Simvastatin

IC50-Werte für Simvastatin (48h): KMH2 =5,63 μ M; L540CY =1,127 μ M (siehe Tab.3.1).

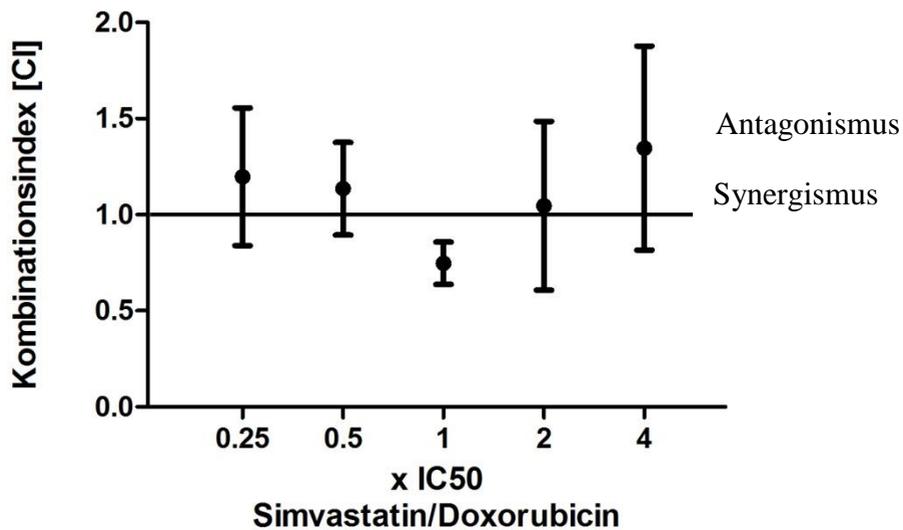
IC50-Werte für Doxorubicin (48h): KMH2=0.059 μ g/ml;

L540CY=0,01 μ g/ml (siehe Tab.3.3). Mittelwert \pm

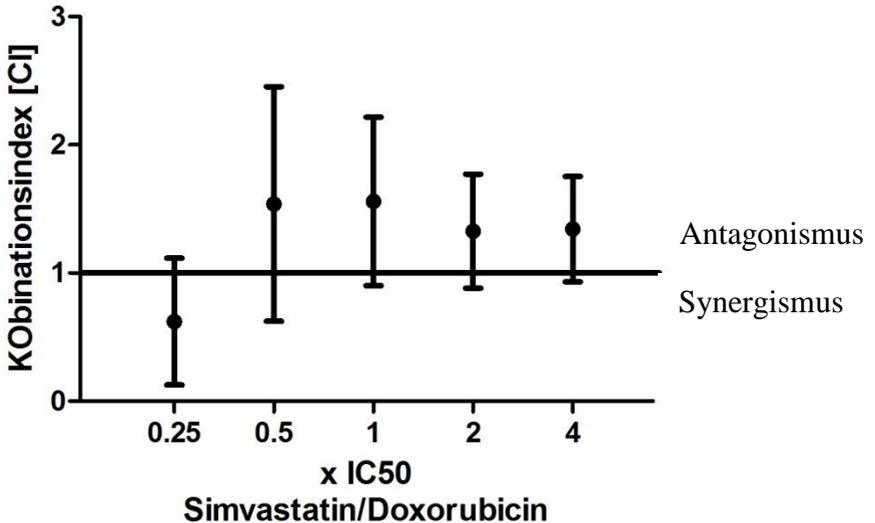
Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen

Konzentration (xIC50)	L540CY	KMH2
0,25	0,62 \pm 0,49	1,2 \pm 0,5
0.5	1,54 \pm 0,92	1,1 \pm 0,34
1	1,56 \pm 0,66	0,75 \pm 0,15
2	1,33 \pm 0,45	1,05 \pm 0.62
4	1,34 \pm 0,41	1,35 \pm 0,75

A



B



**Abb. 3.10 Änderung der Kombinationsindices in
Abhängigkeit von den Pharmakakonzentration**

A- KMH2, B- L540CY

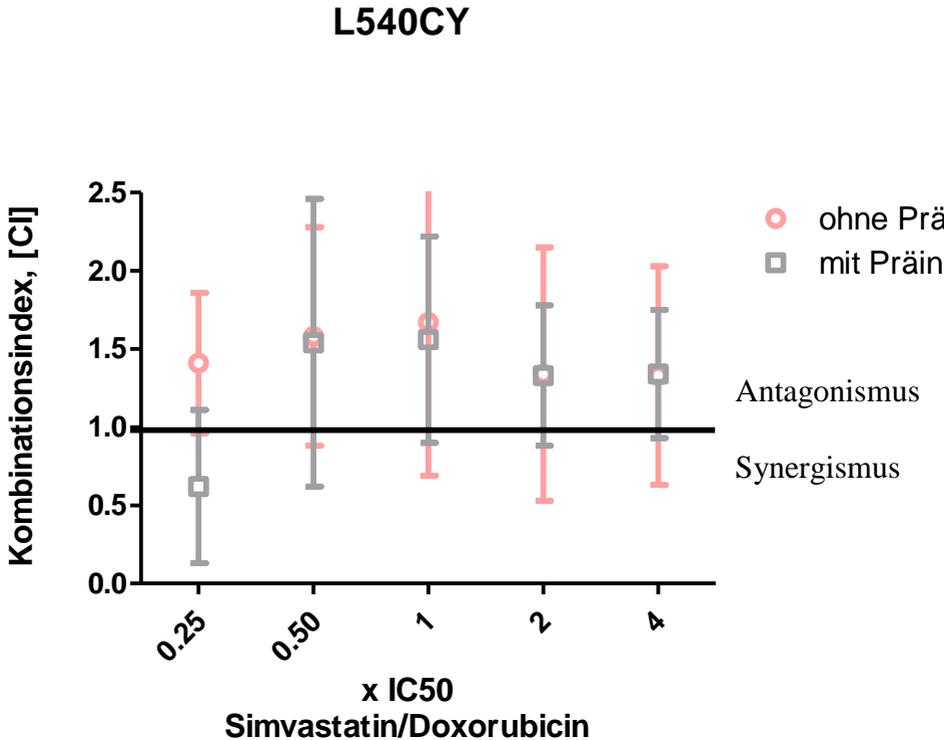
Die Analyse der Messwerte erfolgte mittels Calcosyn-Software. Die HL-Zelllinien wurden mit steigenden Dosen Simvastatin über 48 Stunden präinkubiert und anschließend wurde Doxorubicin dazugegeben und die Zellen wurden mit beiden Substanzen über weitere 48 Stunden inkubiert. Das Zellwachstum wurde nach 96 Stunden mittels XTT-Assay bestimmt. Zur Analyse der Messwerte hinsichtlich antagonistischer/ additiver/ synergistischer Effekte wurde die Calcosyn-Software verwendet. . CI>1.1 weist auf den

Ergebnisse

antagonistischen Effekt hin, wohingegen CI von 1.1 bis 0.9 und $CI < 0.9$ entsprechend auf einen additiven und einen synergistischen Effekthinweisen.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

A



B

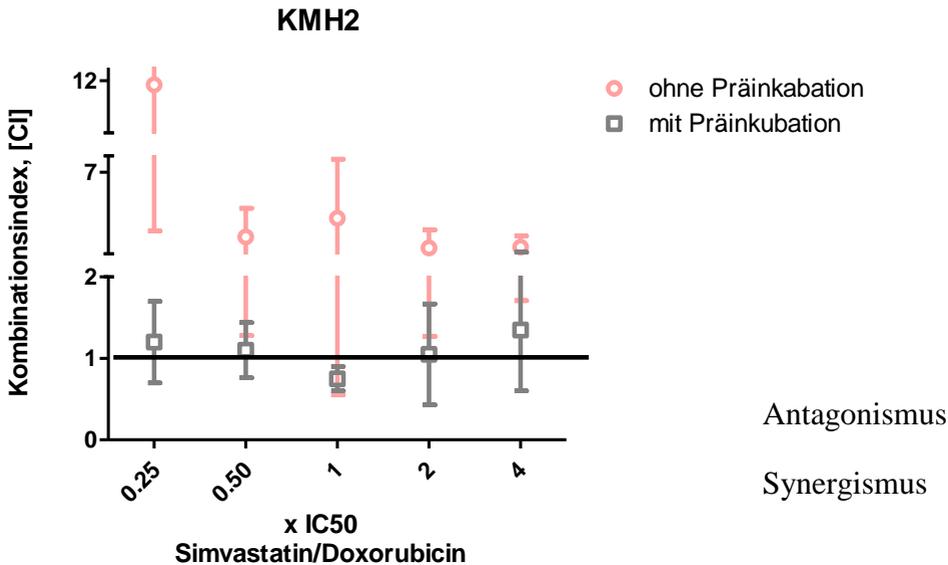


Abb. 3.11 Die Kombinationsindices ohne und mit Präinkubation mit Simvastatin

A- L540CY, B- KM12

Der Vergleich der Kombinationsindices von HL-Zelllinien mit und ohne 48-stündiger Präinkubation mit Simvastatin. Die HL-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von $25 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät. Beim Experiment „mit Präinkubation“ wurden die Zellen über 48 Stunden mit steigenden Dosen von Simvastatin präinkubiert. Anschließend wurde Doxorubicin dazugegeben und die Zellen wurden mit beiden Substanzen über weitere 48 Stunden inkubiert. Das Zellwachstum wurde nach 96 Stunden

mittels XTT-Assay bestimmt. Beim Experiment „ohne Präinkubation“ wurden die Zellen mit Simvastatin und Doxorubicin (simultane Gabe) in steigenden Konzentrationen über 48 Stunden inkubiert. Das Zellwachstum wurde nach 48 Stunden mittels XTT-Assay bestimmt. Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

3.6 Proliferationshemmung der Zelllinien unter Einwirkung von Doxorubicin und Tipifarnib.

Es wurde der Einfluss der simultanen Gabe von Tipifarnib und Doxorubicin in fünf verschiedenen Konzentrationen auf die HL-Zelllinien mit einer Einwirkzeit von 48 Stunden untersucht. Auch hier resultieren die gewählten Konzentrationen wieder aus vorherigen IC50-Experimenten.

Tabelle 3.11: Simultane Verabreichung von Tipifarnib und Doxorubicin in steigenden Konzentrationen bei HL-Zelllinien

Ergebnisse

HL-Zelllinie	Doxorubicin + Tipifarnib	
	[$\mu\text{g/ml}$]	[μM]
KMH2	0,015 + 0,2	
	0,03 + 0,39	
	0,06 + 0,78	
	0,12 + 1,5	
	0,24 + 3,125	
L540CY	0,0025 + 0,03	
	0,005 + 0,06	
	0,01 + 0,12	
	0,02 + 0,24	
	0,04 + 0,48	
L428	0,04 + 0,1	
	0,08 + 0,2	
	0,06 + 0,4	
	0,32 + 0,8	

Ergebnisse

	0,64 + 1,6
--	------------

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellen mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 Kulturmedium mit Zusatz von DMSO (0,09 %), Doxorubicin- und Tipifarnib-Lösung im Verhältnis 1:3 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Die Berechnung der Kombinationsindices (CI) mittels Calculusyn-Software (siehe Kapitel 2.13 Statistische Analyse) zeigte, dass die Koinkubation beider Substanzen in zwei von drei untersuchten Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen mehr oder weniger ausgeprägten synergistischen Effekt ($CI < 1,1$) führte (siehe Tab.3.12). Dieses Ergebnis konnte deutlich an den Zelllinien L540CY sowie L428 beobachtet werden.

Bei der Zelllinie KMH2 konnten hingegen ausschließlich antagonistische Effekte beobachtet werden: die Kombinationsindices liegen zwischen $1,47(\pm 0,57)$ und $2,62(\pm 0,86)$.

Tabelle 3.12: Kombinationsindices (CI) für die Kombination aus Tipifarnib und Doxorubicin

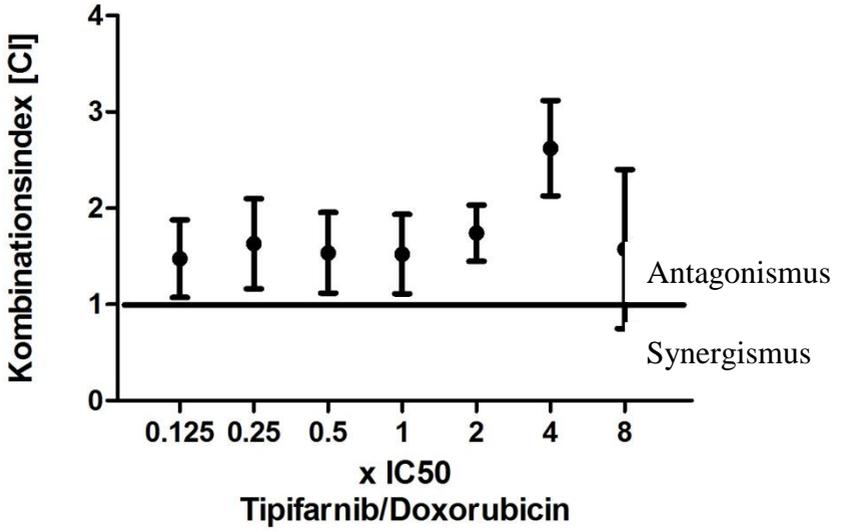
Ergebnisse

IC50-Werte für Tipifarnib (48h): KMH2 =0,78 μ M; L540CY =0,123 μ M; L428=0,44 μ M (siehe Tab.3.2). IC50-Werte für Doxorubicin (48h): KMH2= 0,059 μ g/ml; L540CY= 0,01 μ g/ml; L428=0,059 μ g/ml (siehe Tab.3.3).

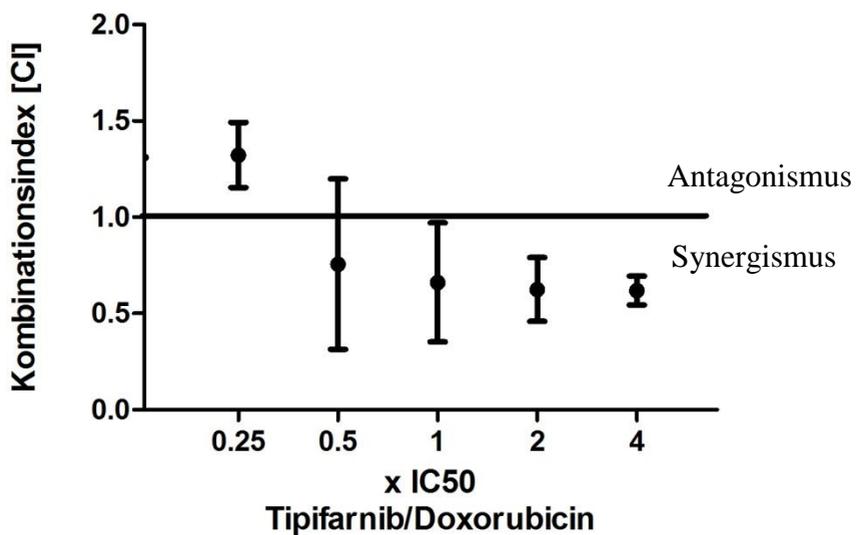
Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen

Konzentration (xIC50)	L428	L540CY	KMH2
0.125	-	-	1,47 \pm 0,57
0.25	13,9 \pm 11,2	1,32 \pm 0,17	1,63 \pm 0,81
0.5	2,14 \pm 1,62	0,76 \pm 0,44	1,53 \pm 0,73
1	0,34 \pm 0,18	0,66 \pm 0,31	1,52 \pm 0,71
2	0,26 \pm 0,16	0,62 \pm 0,16	1,74 \pm 0,50
4	0,24 \pm 0,20	0,62 \pm 0,07	2,62 \pm 0,86
8	-	-	1,57 \pm 1,67

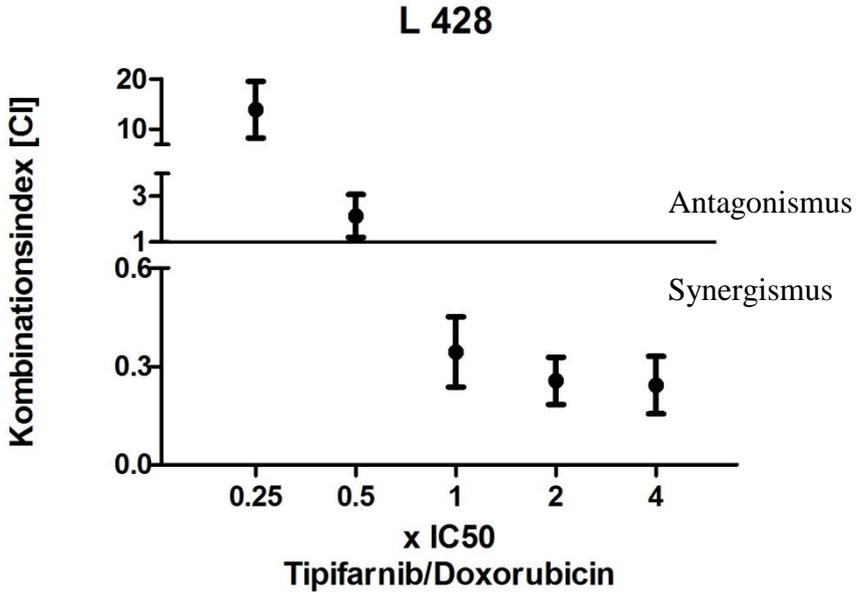
A



B



C



**Abb. 3.12 Änderung der Kombinationsindizes in
Abhängigkeit von der Konzentration**

A- KMH2, B- L540CY, C- L428

Die Analyse der Messwerte mittels Calcosyn-Software. Die HL-Zelllinien wurden mit steigenden Dosen Tipifarnib und Doxorubicin inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 48 Stunden mittels XTT-Assay bestimmt. Zur Analyse der Messwerte hinsichtlich antagonistischer/ additiver/ synergistischer Effekte wurde die Calcosyn-Software verwendet. CI bezeichnet den Kombinationsindex. . CI>1.1

weist auf den antagonistischen Effekt hin, wohingegen CI von 1.1 bis 0.9 und $CI < 0.9$ entsprechend auf einen additiven und einen synergistischen Effekt hinweisen.

Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

3.7 Auswirkungen von Tipifarnib auf die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration

Um die mittels XTT-Assay erhaltenen Daten über die additiv-synergistischen Effekte der Koinkubation von Tipifarnib und Doxorubicin näher zu erforschen, wurden durchflußzytometrische Untersuchungen am Beispiel der Zelllinie L540CY durchgeführt. Hypothese war, dass Tipifarnib über die Inhibition von P-Glykoprotein zu einer Hemmung der Ausschleusung von Doxorubicin aus der Zelle führt und dass dies den Synergismus erklären könnte. Es wurde Durchflußzytometrie angewendet, um die Auswirkungen von Tipifarnib auf die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration zu bewerten. Als fluoreszierendes Substrat von MRP/PGP-Kanälen, diente Doxorubicin als Marker für deren aktive Transport-Funktion (Shen et al 2007; Vezmar et al 2000). Tipifarnib dagegen weist keine Fluoreszenzeigenschaften auf.

Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von HL-Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin als alleinigem Pharmakon und in Kombination mit Tipifarnib gemessen. Als Kontrolle wurden HL-Zellen ohne jeglichen Pharmakazusatz benutzt.

Im Folgenden zeigen wir, dass Tipifarnib (2 μ M) zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Doxorubicin führt. In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die mittlere Fluoreszenzintensität nach Koinkubation von HL-Zellen mit Doxorubicin und Tipifarnib im Vergleich mit der alleinigen Inkubation mit Doxorubicin zunahm. Es wurde ein signifikanter Unterschied der intrazellulären Doxorubicinkonzentration nach Inkubation mit beiden Pharmaka (Tipifarnib +Doxorubicin) gegenüber Doxorubicin als alleinigem Pharmakon mittels WilcoxonVorzeichen-Rang-Tests festgestellt ($p=0.0024$) (Abb. 3.12 und 3.13). Um eventuelle direkten Fluoreszenzeffekte von Tipifarnib auf die Zellen auszuschließen, wurden zur Kontrolle die Zellen mit Tipifarnib als alleinigem Pharmakon inkubiert. Erwartungsgemäß stimmte die Fluoreszenz von Tipifarnib mit der der Kontrolle überein. Es lässt sich also darauf schließen, dass die Fluoreszenzeffekte alleine auf die Fluoreszenz von Doxorubicin zurückzuführen sind.

Tabelle 3.13: Mittlere Fluoreszanzintensitäten von HL-Zellen nach Koinkubation mit Tipifarnib, Doxorubicin und deren Kombination.

Substanz /en	Kontro lle	Tipifar nib	Doxorubi cin	Tipifarnib+Doxoru bicin
MFI	6,09	6,39	70,06	90,00

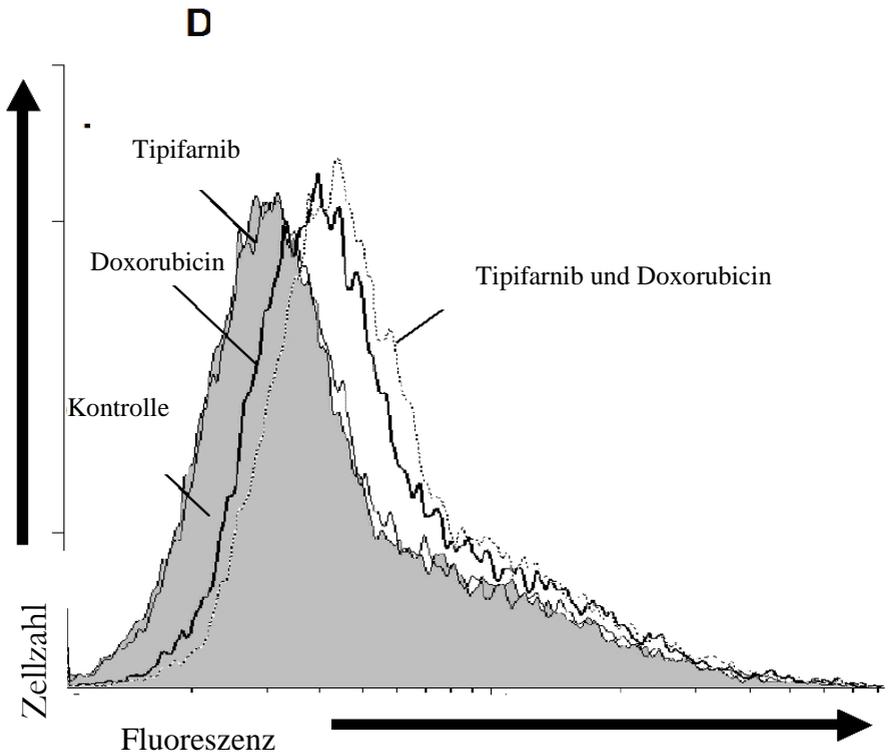


Abbildung 3.13: Doxorubicin-Fluoreszenz in HL-Zellen

L540CY-Zellen ($10^6/\text{ml}$) ohne Pharmakazusatz als Kontrolle, mit einem Pharmakon (Tipifarnib ($2\mu\text{M}$) oder Doxorubicin ($2\mu\text{M}$)) und mit den beiden Pharmaka (Tipifarnib $2\mu\text{M}$ + Doxorubicin $2\mu\text{M}$) über 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach mit PBS-Puffer mit 0,1% BSA gewaschen. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mittels Durchflusssytometrie bestimmt.

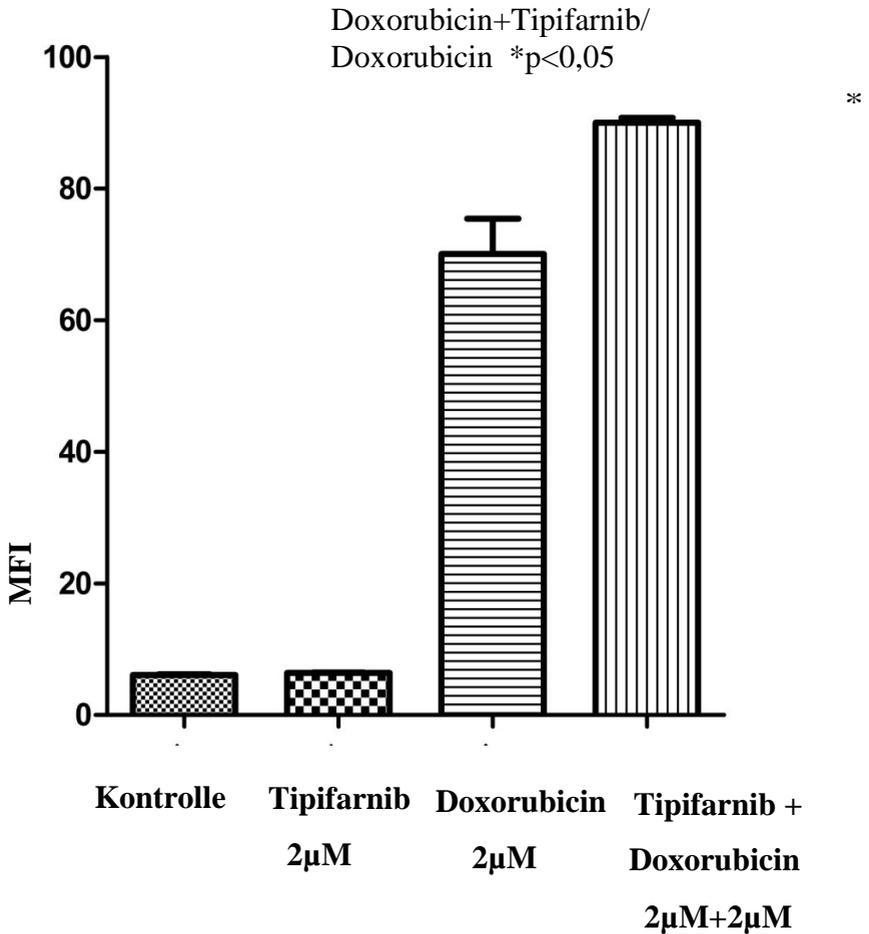


Abb. 3.14 Akkumulation von Doxorubicinin in HL-Zellen nach kombinierter Tipifarnib+Doxorubicin Inkubation

HL-Zellen wurden ohne Pharmakazusatz als Kontrolle, mit dem Pharmakon Tipifarnib (2µM) oder Doxorubicin (2µM) und beiden Pharmaka (Tipifarnib 2µM + Doxorubicin 2µM) über 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach mit PBS-

Puffer mit 0,1% BSA gewaschen. Danach wurde die Mittlere Fluoreszenzintensität mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Es wurde ein signifikanter Unterschied der intrazellulären Doxorubicinkonzentration nach Inkubation mit beiden Pharmaka (Tipifarnib +Doxorubicin) gegenüber Doxorubicin als alleinigem Pharmakon mittels WilcoxonVorzeichen-Rang-Tests festgestellt ($p < 0,05$). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aus vier unabhängigen Messungen.

3.8 Wirkung von Tipifarnib auf murine

Kardiomyozyten

Eine toxische Tipifarnib-Wirkung auf das Herz wäre im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung in Kombination mit Doxorubicin wichtig. Es wurde daher der Einfluss von Tipifarnib in 15 verschiedenen Konzentrationen auf murine Kardiomyozyten mit einer Einwirkzeit von 48 Stunden untersucht.

Tabelle 3.14: Verabreichung von steigenden Tipifarnibkonzentrationen bei murinen Kardiomyozyten

Ergebnisse

Höhere Tipifarnib-konzentrationen (μM)	1,50; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50
Niedrigere Tipifarnib-konzentrationen (μM)	0,003; 0,006; 0,0120; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,39; 0,78

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellsuspension mit 10% FCS angereichertem RPMI 1640 Kulturmedium mit Zusatz von DMSO (0,09 %) und Tipifarnib im Verhältnis 1:1 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam. Um den eventuellen Einfluss von DMSO, in dem Tipifarnib gelöst wurde, auf die Zellen auszuschalten, wurde die DMSO-Konzentration bei allen Verdünnungsstufen und bei der Kontrolle gleich gehalten.

Es wurde ebenfalls der Einfluss von Doxorubicin in 8 verschiedenen Konzentrationen auf murine Kardiomyozyten mit einer Einwirkzeit von 48 Stunden untersucht. Hierfür wurde Doxorubicin mit RPMI 1640 mit 10% FCS vermischt, um entsprechende Zielkonzentrationen herzustellen (siehe Tab.3.15). Je 3 mit Kardiomyozyten besäte Wells einer Platte wurden mit je 100 μl Doxorubicinlösung einer

Ergebnisse

Konzentrationsstufe versehen. Die nächsten 3 Wells erhielten jeweils eine höhere Doxorubicinkonzentrationsstufe usw.

**Tabelle 3.15 Verabreichung von steigenden
Doxorubicinkonzentrationen bei murinen
Kardiomyozyten**

Doxorubicinkonzentration x 10 ⁻³ µg/ml	0,006
	0,0125
	0,025
	0,05
	0,1
	0,2
	0,4
	0,8

Die Versuche wurden mit einer Zellzahl von 25×10^5 Zellen/ml durchgeführt, welche nach der Verdünnung der Zellen mit 10% FCS angereichertem RPMI1640 Kulturmedium im Verhältnis 1:1 in jeder einzelnen Kavität der Mikrotiterplatte zustande kam.

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte von Doxorubicin und Tipifarnib in murinen Kardiomyozyten erfolgte, ähnlich wie bei den HL-Zelllinien, unter Verwendung des XTT Assay (siehe Kapitel 2.11).

Die Abb. 3.15 stellt die Vitalität der Kardiomyozyten für jede verwendete Konzentration an Tipifarnib und Doxorubicin dar. Dabei nimmt die Vitalität der Kardiomyozyten bereits bei kleinsten zugefügten Mengen an Doxorubicin ab: bei 0,006 ng/ml liegt die Vitalität bei $93,1 \pm 16,2\%$ (Abb.3.15). Diese Abnahme ist kontinuierlich und rapide, und erreicht die 50%-Grenze bei Doxorubicinkonzentration von 0,125 ng/ml.

Die Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit unter Tipifarnib-Einwirkung hingegen nimmt stufenweise ab, wobei der Steigerung der Tipifarnibkonzentration von 0,003 auf 0,05 μM keine signifikante Reduktion der Vitalität entspricht: $107,4(\pm 10,1)\%$ bei 0,003 $\mu\text{g/ml}$, $104,6(\pm 13,2)\%$ bei 0,006 $\mu\text{g/ml}$, $98,7(\pm 10,7)\%$ bei 0,012 $\mu\text{g/ml}$, $96,0(\pm 8,4)\%$ bei 0,025 $\mu\text{g/ml}$ und schließlich $99,7(\pm 11,6)\%$ bei 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Ab einer Tipifarnibkonzentration von 0,1 μM nimmt die Vitalität der Kardiomyozyten ab ($68 \pm 47\%$) und bleibt fast unverändert bis die Tipifarnibkonzentration den Wert von 3,12 μM

Ergebnisse

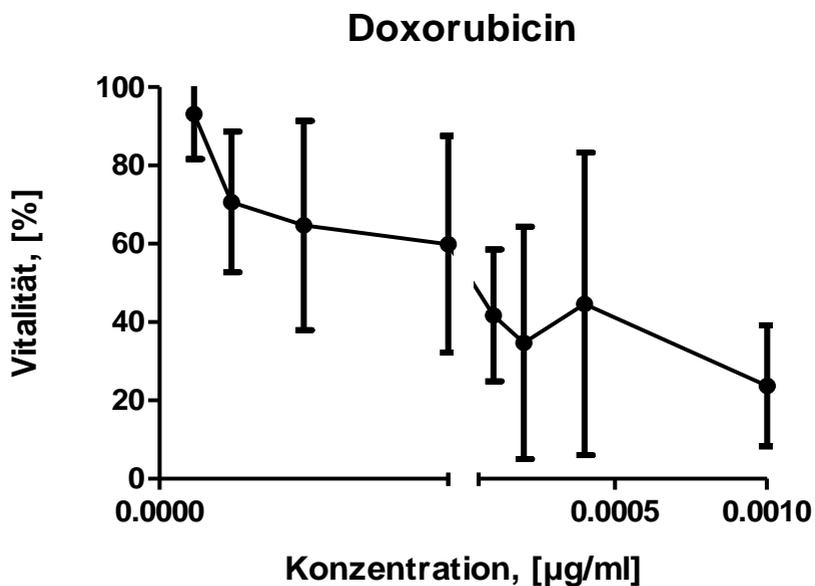
(79,6±20,7%) erreicht hat: 68(±47%) bei 0,1µM, 81,4(±28)% bei 0,2µM, 78,7(±37)% bei 0,34µM, 79,1(±29)% bei 0,78µM, 81,1(±27)% bei 1,47 µM, 79,6(±20)% bei 1,5 µM, 76(±32) bei 3,12µM. Eine Konzentrationserhöhung von 0,1 auf 3.12 µg/ml bringt also keine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit der Kardiomyozyten mit sich. Eine weitere Erhöhung der Tipifarnibkonzentration führt zur rapiden Abnahme der Vitalität, die bei der Konzentration von 12,5(±2,8) µg/ml die 50%Grenze unterschreitet. Behandelt mit hohen Dosen von Farnesyltransferase-Inhibitor stirbt hierbei mehr als die Hälfte der Kardiomyozyten ab. Im therapeutischen Bereich von 0,03 µg/ml (Vitalität 98,7±10%) bis 2 µg/ml (113±18 %) und darüber hinaus bis ca. 3µg/ml lässt sich dagegen nur eine geringe Verminderung der Vitalität nachweisen.

Tab. 3.16 Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC50) von Doxorubicin und Tipifarnib bei 48-stündiger Inkubation mit murinen Kardiomyozyten.

Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen

Ergebnisse

Substanz	Mittlere Inhibitorische Konzentration (IC50)
Tipifarnib	10,2±2,8 μM
Doxorubicin	12,7x10 ⁻⁵ ±10 ⁻⁶ $\mu\text{g/ml}$



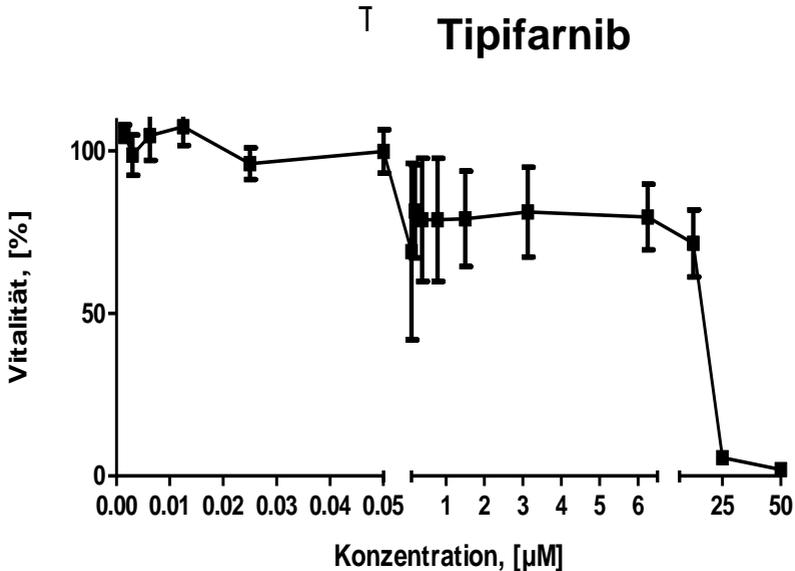


Abb. 3.15 Toxizität von Doxorubicin und Tipifarnib in den murinen Kardiomyozyten

Die Änderung der mittleren Vitalitätsrate von Kardiomyozyten nach 48- stündiger Inkubation mit Doxorubicin oder Tipifarnib in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die murinen Kardiomyozyten wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 /ml ausgesät und über 48 Stunden mit steigenden Dosen von Doxorubicin oder Tipifarnib kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt.

Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Beim Vergleich der Tipifarnibtoxizität in den Kardiomyozyten und in den HL-Zellen (siehe Kapitel 3.2) kann festgestellt werden, dass die mittlere inhibitorische Konzentration von Tipifarnib in den HL-Zellen fast das 25-fache ($0,44 \pm 0,12 \mu\text{M}$) des Wertes von Tipifarnib in den Kardiomyozyten ($10,2 \pm 2,8 \mu\text{M}$) beträgt.

Das Tipifarnib führt also bei den therapeutischen Konzentrationen in Kardiomyozyten nur zur geringen Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit und zeigt gleichzeitig eine starke Toxizität in den HL-Zellen bereits bei niedrigen und sehr niedrigen Konzentrationen.

Tab. 3.17 Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) für Tipifarnib bei 48-stündiger Inkubation mit murinen Kardiomyozyten und HL-Zellen (L428)

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

Ergebnisse

Zelltyp	Tipifarnib (48h) μM
HL-Zellen (L428)	$0,44 \pm 0,12$
murine Kardiomyozyten	$10,2 \pm 2,8$

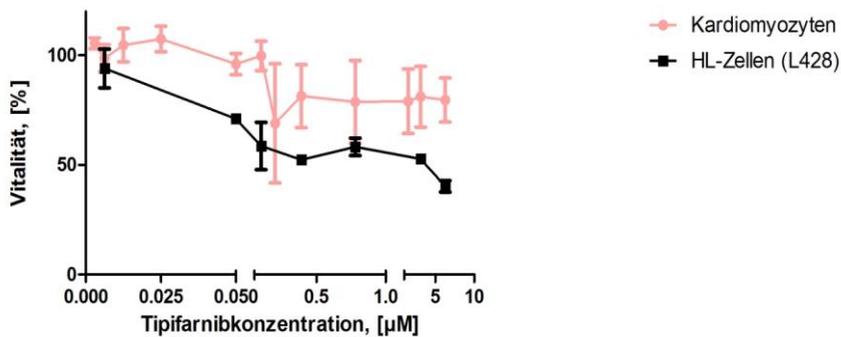


Abb.3.16 Toxizität von Tipifarnib in HL-Zellen und Kardiomyozyten

Die Änderungen der mittleren Vitalitätsrate von Kardiomyozyten und HL-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Tipifarnib in Abhängigkeit von der Konzentration.

Die murinen Kardiomyozyten (Zelldichte $5 \times 10^5/\text{ml}$) und die HL-Zellen (Zelldichte $25 \times 10^5/\text{ml}$) wurden über 48 Stunden mit steigenden Dosen Tipifarnib kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellvitalität mittels XTT-Assay bestimmt.

Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

4.Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

1. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Simvastatin die Proliferation der HL-Zelllinien L540CY, KMH2 und L428 konzentrations- und zeitabhängig hemmt.
2. Eine weitere Substanz, die zur konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung der HL-Zelllinien L540CY, KMH2 und L428 führte ist der Farnesyltransferase-Inhibitor Tipifarnib.
3. Des Weiteren wurden die Kombinationseffekte von beiden oben genannten Substanzen mit dem Eckpfeiler der heutigen HL-Therapie Doxorubicin erforscht. Dabei konnten wir feststellen, dass die Koinkubation von Doxorubicin mit Simvastatin fast ausschließlich zu antagonistischen Kombinationseffekten führte. Die Kombinationseffekte im Falle der Koinkubation

von HL-Zelllinien mit Doxorubicin und Tipifarnib variierten vom antagonistischen über additiven zum synergistischen Effekt. Diese Unterschiede rührten von der Zelllinie und gewählten Pharmakakonzentration her.

- 4 Tipifarnib führt in therapeutischen Konzentrationen in Kardiomyozyten nur zur geringen Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit und zeigt gleichzeitig eine starke Toxizität in den HL-Zelllinien bereits bei niedrigen Konzentrationen.

4.2 Proliferationshemmung von HL-Zelllinien durch Simvastatin

In dieser Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung von Simvastatin auf HL-Zelllinien gezeigt. Es stellte sich heraus, dass diese Wirkung sowohl dosis- als auch zeitabhängig ist, wobei der IC50-Wert sich von Zelllinie zu Zelllinie wesentlich unterscheidet. Dabei stellte sich heraus, dass die Zelllinie L540 (IC50-Wert bei 1,128 μ M) am empfindlichsten und die

Zelllinien KMH2 (IC₅₀-Wert bei 9,20µM) am resistantesten ist. Des Weiteren wurde die zeitliche Entwicklung des inhibitorischen Effektes von Simvastatin auf die HL-Zelllinien erforscht. Es zeigte sich, dass sich die Zelllinien mit der Verdoppelung der Inkubationszeit (96 v.48 Stunden) different verhalten. Während sich der IC₅₀-Wert bei der Zelllinie KMH2 bei längerer Inkubationszeit halbierte (5,6µM vs. 9,20µM), bleibt sie bei der Zelllinie L540 CY unverändert (1,128µM vs. 1,127µM). Die zytotoxische Wirkung von Statinen in mehreren soliden Tumoren, solchen wie Melanom, Colon- und Prostatakarzinom wurde bereits gut beschrieben (Heimpel et al 1996). Auch in hämatologischen Neoplasien vor allem in den chronischen und akuten Leukämien (Clutterbuck et al 1998, Vitols et al 1997), NHL und Epstein-Barr-Virus-Lymphomen zeigt Simvastatin starke zytotoxische Wirkung (van de Donk et al. 2003; Cohen et al 2005). Jedoch benötigt dieser Effekt mit wenigen Ausnahmen höhere Simvastatin-Konzentrationen von 5-400 µM (van de Donk et al

2003; Katano et al; Vitols et al 1997; Clutterbuck et al 1998). Klinische Studien haben gezeigt, dass der Plasmaspiegel von Statinen bei hohen Dosen Werte im Bereich von $2\mu\text{M}$ erreichen kann (Thibault et al 1996; Holstein et al 2006) und dabei zu keiner schweren Medikamententoxizität bei Patienten führt (Wong et al 2002). Für das Erreichen einer starken antiproliferativen Wirkung auch *in vivo* auf KMH2-Zelllinie wären höhere, klinisch wenig relevante Simvastatinkonzentrationen nötig (IC₅₀ von KMH2-Zelllinie liegt bei $9,20\mu\text{M}$). Für die Zelllinie L540CY dagegen würden auch bedeutend niedrigere Konzentrationen von Simvastatin ausreichen (IC₅₀ von L540CY-Zelllinie liegt bei $1,128\mu\text{M}$) um eine starke zytotoxische Wirkung *in vivo* zu erreichen. Dies weist auf die potentielle antiproliferative Wirkung auch *in vivo* hin.

Die insgesamt wenigen Berichte über die Wirkung von CoA-Reduktase-Inhibitoren in HL (von Tresckow et al 2007) liegen im Einklang mit den hier angeführten Ergebnissen. Als Mechanismus für die antiproliferative Wirkung von CoA-Reduktase-

Inhibitoren in Lymphomen wurde von mehreren Autoren unter anderem die Hemmung von Protein-Geranylgeranylierung und Caspase-3-Aktivierung vermutet (van de Donk et al 2003 , von Tresckow et al 2007).

4.3 Proliferationshemmung von HL-Zelllinien durch Tipifarnib

Tipifarnib ist ein Farnesyltransferase-Hemmer, der über ein ausgezeichnetes Nebenwirkungs-Profil und Aktivität sowohl bei vielen soliden neoplastischen Zelllinien (End et al 2001; Piccart-Gebhart 2001; Wörnberg et al 2006) als auch bei hämatologischen Neoplasien verfügt (Epling-Burnette PK et al 2001; Zimmerman et al 2004). Am besten erforscht sind AML und MDS, weiterhin liegen Daten zur Aktivität bei Lymphomen vor (Kenneth and Field 2008; Lancet et al 2007; Feldman 2005; Witzig et al 2011). In letzterer Studie wurden auch einige wenige Hodgkin-Lymphom-Patienten behandelt.

In unserer Studie variierten *in vitro* die mittleren inhibitorischen Konzentrationen für einzelne Zelllinien stark und betragen für die sensibelste Zelllinie L540CY 0,123 μM und für die resistensteste Zelllinie KMH2 fast das 10-fache davon nämlich 0,92 μM . Der IC₅₀ Wert von der Zelllinie L428 betrug 0,44 μM .

Die Plasmakonzentration von 0,1 μM wird schon bei mittelhohen Dosen von Tipifarnib z.B. 200 mg zweimal am Tag (Awada et al 2007) erreicht. Bei höheren Dosen bzw. Eskalation können Plasmakonzentrationen bis zu 8 μM erreicht werden (Kirschbaum et al 2011). Das weist auf eine potentielle klinische Bedeutung von Tipifarnib beim Hodgkin Lymphom hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang sowohl mit der Studie von Kenneth A Field (Kenneth and Field et al 2008) als auch mit der Studie von Witzig (Witzig et al 2011), in der die klinische Aktivität von Tipifarnib in Lymphomen (unter anderem bei HL) untersucht wurde. Die Gesamtresponderrate lag bei 21%: von 19 HL Patienten hatten vier eine komplette oder partielle

Remission. Die mittlere Ansprechdauer betrug 7,2 Monate.

Da Tipifarnib eine hohe Aktivität in einer Gruppe von HL-Zelllinien zeigt, sollten weitere klinische Studien mit Tipifarnib bei rezidiviertem bzw. refraktärem HL erfolgen.

4.4 Proliferationshemmung von Zelllinien mit einer Kombination von Simvastatin oder Tipifarnib mit dem konventionellem Chemotherapeutikum Doxorubicin

4.4.1 . Proliferationshemmung von HL-Zelllinien durch Doxorubicin

Erwartungsgemäß und im Einklang mit der heutigen Wissenschaftslage aus zahlreichen Studien war das Anthracyclin Doxorubicin in allen HL-Zelllinien zytotoxisch, wobei auch hier die Sensibilität der einzelnen Zelllinien gegenüber der

Substanz variierte. Die ermittelten IC-50-Konzentrationen lagen zwischen 0,01 µg/ml bei der sensibelsten Zelllinie L540CY und 0,059 µg/ml bei den beiden weniger sensiblen Zelllinien KMH2 und L428.

Diese Daten stehen im Einklang mit den Studien über die Doxorubicinaktivität in HL-Zelllinien und entsprechen den therapeutischen Doxorubicin Plasmakonzentrationen *in vivo*: von 10nM bis ca.10µM (Raymond et al 1983).

4.4.2. Überwiegend antagonistische Effekte bei der Koinkubation von HL-Zelllinien mit Doxorubicin und Simvastatin

Sowohl bei simultaner als auch bei sequenzieller Koinkubation von Simvastatin und Doxorubicin mit den HL-Zelllinien überwogen klar die antagonistischen Effekte.

Bei den Versuchen ohne Präinkubation mit Simvastatin lagen die Kombinationsindices bei

sämtlichen Konzentrationen über 1. Dies weist auf antagonistischen Effekte hin. Dabei liegen die CI-Werte bei der Zelllinie KMH2 insgesamt auf einem höheren Niveau und sind konzentrationsabhängig: Je niedriger die Pharmakakonzentrationen sind, desto ausgeprägter sind die antagonistischen Effekte. Bei der Zelllinie L540CY hingegen blieb der CI-Wert relativ stabil und auf einem insgesamt niedrigeren Niveau (siehe Abb.3.10).

Bei den Versuchen mit einer Präinkubation von HL-Zellen über 48 Stunden mit Simvastatin überwogen zwar nach wie vor in den beiden Zelllinien die antagonistischen Effekte, diese waren jedoch weniger ausgeprägt (Abb.3.11).

In der Literatur gibt es Indizien hinsichtlich synergistischer Kombinationseffekte von einigen CoA-Reduktasehemmern mit Chemotherapeutika: Cerivastatin und Doxorubicin in Myelomzellen (Cafforio et al 2005), Lovastatin und 5-Fluorouracil /Cisplatin (Agarwal et al.1999), Fluvastatin und Gemcitabin in

Pankreaskarzinomzellen (Bocci et al.2005; Fritz et al 2009). Dies ist allerdings die erste Studie über die Kombinationseffekte von Simvastatin und Doxorubicin in HL-Zelllinien.

4.4.3. Additiv-synergistische Effekte bei Koinkubation von HL-Zelllinien mit Tipifarnib und Doxorubicin

Nach unserem Kenntnisstand ist das die erste Studie über Kombinationseffekte zwischen dem FTI Tipifarnib und dem Anthracyclin Doxorubicin bei HL.

In dieser Studie haben wir *in-vitro* Effekte auf HL-Zelllinien nach Koinkubation mit Tipifarnib und Doxorubicin erforscht. Bei der Koinkubation mit den beiden Substanzen zeigten sich im XTT-Assay hoch synergistische Effekte in zwei von drei untersuchten Zelllinien in klinisch relevanten Konzentrationen. Lediglich bei niedrigen, klinisch meist irrelevanten Konzentrationen zeigen sich in den beiden Zelllinien antagonistische Effekte: bei

0,25xIC50 lag der Kombinationsindex für die Zelllinie L540CY bei 1,32 und bei der Zelllinie L428 lag der CI-Wert bei 0,25xIC50 bei 13,9 und bei 0,5xIC50 bei 2,14. Bei Steigerung der Konzentrationen konnte man einen Übergang zum synergistischen Effekt beobachten: bei L540CY: 0,76(\pm 0,44) \rightarrow 0,66(\pm 0,310) \rightarrow 0,62(\pm 0,16) \rightarrow 0,62(\pm 0,07) und bei L428: 0,34(\pm 0,18) \rightarrow 0,26(\pm 0,16) \rightarrow 0,24(\pm 0,20).

Bei der Zelllinie KMH2 konnten hingegen ausschließlich antagonistische Effekte beobachtet werden: die Kombinationsindices liegen zwischen 1,47 und 2,62. Dies könnte möglicherweise an anderen biologische Eigenschaften dieser Zelllinie liegen. Bei den KMH2 Zellen musste ein im Vergleich zum vorher bestimmten korrigierter IC50-Wert angewendet werden (0,78 statt 0,92 siehe Tab 3.11 und 3.4). Dies könnte an der hohen Standardabweichung bei dem Initialversuch liegen: 0,92 \pm 0,57.

Durch die darauffolgenden durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden

die aus dem XTT-Assay stammenden Daten über die synergistischen Effekte von beiden Substanzen bestätigt: In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die mittlere Fluoreszenzintensität nach Koinkubation von HL-Zellen mit Doxorubicin und Tipifarnib im Vergleich zur Inkubation mit Doxorubicin als alleinigem Pharmakon zunahm (Abb. 3.12 und 3.13). Dies legt nahe, dass Tipifarnib seine Effekte indirekt über Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Doxorubicin ausübt.

Die Tipifarnib-Einwirkung scheint also bei HL einen dualen Mechanismus zu haben: Eine potente Zytotoxizität in der Monotherapie und als Chemosensitizer, welches zu einem Synergismus mit Doxorubicin führt. Der Plasmaspiegel von beiden Medikamenten bei Krebspatienten entspricht dem Bereich in dem hochsynergistische Effekte beobachtet wurden (Raymond et al 1983; Awada et al 2007; Kirschbaum et al 2011).

Die Daten über die Zytotoxizität von Tipifarnib stimmen generell mit den Daten aus einer

früher veröffentlichten klinischen Studien überein (Witzig et al 2011). Sie legen nahe, dass Tipifarnib in der Monotherapie ein potentieller Wirkstoff in der Behandlung des HL ist. Zu seinen Vorzügen zählt ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil (Wong et al 2002). Die Entwicklung von neuen Therapien unter Einbeziehung von Tipifarnib könnte also zur Verbesserung der Prognose von HL- Patienten führen, ohne dass gefährliche oder lebensbedrohliche Nebenwirkungen signifikant zunehmen.

Die Messung der intrazellulären Doxorubicinkonzentration mittels Durchflusszytometrie zeigte einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Doxorubicinkonzentration in Anwesenheit von Tipifarnib. Dieses Ergebnis lässt annehmen, dass synergistische Effekte über eine Tipifarnib-assoziierte Reduktion von Doxorubicin—Efflux zustande kommen. Bekanntlich verfügen FTIs sowohl über PGP- als auch über MDR-hemmende Eigenschaften (Medeiros et al 2007; Wang et al 2001; Wang et al 2003). Der Nachweis, dass Efflux-

Pumpen- insbesondere PGP und MRP 1 und 2 - eine bedeutende Rolle in der klinischen Zytostatikaresistenz spielen, hat die Einführung von verschiedenen PGP-Inhibitoren im klinischen Bereich angeregt (Mross K, et al 1993; Jun Wu1 et al 2007; Volm M et al 1998; Merlin et al 2000; Sehested M et al 1998; Thomas H et al 2003). Neuere Studien demonstrieren die Wirksamkeit der neoadjuvanten Therapie aus Tipifarnib in Kombination mit Doxorubicin und Cyclophosphamid bei Mamma-Karzinom (Sparano et al 2009) und in Kombination mit herkömmlicher Induktions- und Konsolidierungstherapie bei myeloischer Leukämie (Brandwein et al 2009). Damit stimmen unsere Ergebnisse über die Verstärkung von Anthracyclin-Toxizität von Tipifarnib generell mit den oben erwähnten Ergebnissen überein. Die Mechanismen, durch die das Tipifarnib zur Erhöhung der intrazellulären Doxorubicinkonzentration führt, bleiben bis jetzt unbekannt. Da FTIs über MRPs-hemmende Eigenschaften verfügen (Wang et al

2003) vermuten wir als Synergie-Mechanismus eine Blockierung von MDR-Kanälen, die für die Doxorubicin-Resistenz mitverantwortlich sind: PGP oder MRPs. Diese Hypothese steht im Einklang mit der Studie über die durch Tipifarnib induzierte Hemmung des PGP-vermittelten Daunorubicin-Effluxes in zwei humanen Leukämie-Zelllinien (Medeiros et al 2007).

In der Zukunft wäre eine Überprüfung der Hypothese über die Hemmung von Medikamenten- Transportern sinnvoll. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird Tipifarnib in Multi-Agenzien-Studien bei mehreren Erkrankungen untersucht.

4.5 Toxizität von Tipifarnib in murinen Kardiomyozyten

In der vorliegenden Studie haben wir die Toxizität von Tipifarnib in murinen Kardiomyozyten untersucht und sie mit der von Doxorubicin verglichen. Hintergrund ist ein möglicher

Diskussion

kombinierter klinischer Einsatz von Tipifarnib und Doxorubicin.

In niedrigen klinisch relevanten Konzentrationen von Tipifarnib (0,003 bis 0,05, μM) zeigten die Kardiomyozyten keine signifikante Reduktion der Vitalität. Im mittleren therapeutischen Bereich (0,1 bis 3,12 μM) zeigte sich eine Reduktion der Vitalität von ca. 25 %. Dieser mittlere therapeutische Bereich ist von Interesse, da hier synergistische Effekte mit Doxorubicin in HL-Zellen bestehen (siehe Tab.3.6). Die mittlere inhibitorische Konzentration von Tipifarnib in murinen Kardiomyozyten beträgt ca. das 50×10^6 -fache (10,2 μM) des Wertes von Doxorubicin ($12,7 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$).

Im nächsten Schritt haben wir die Toxizität von Tipifarnib in Kardiomyozyten mit dessen Toxizität in HL-Zellen verglichen. Dabei hat sich herausgestellt, dass der IC-Wert von Tipifarnib in den HL-Zellen ca. das 25-fache (0,44 μM) des IC-Wertes in den Kardiomyozyten (10,2 μM) beträgt. Tipifarnib führt bei therapeutischen Konzentrationen in

Kardiomyozyten nur zur geringen Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit. Dabei zeigt es in den HL-Zelllinien sowohl eine starke Toxizität in der Monotherapie als auch ausgeprägte synergistische Effekte in Kombination mit Doxorubicin bereits bei niedrigen Konzentrationen.

Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität ist das größte Hindernis für seine therapeutische Verwendung in der Krebs-Chemotherapie (Minotti et al., 2004). Zahlreiche Kombinationspartner wurden erforscht, um die Kardiotoxizität von Doxorubicin einzuschränken. Das einzige Medikament, das zurzeit von der *Food and Drug Administration* dafür zugelassen wurde, ist Dexrazoxan. Doch eine kombinierte Verwendung mit Doxorubicin wurde aufgrund seines negativen Effekts auf die Anti-Tumor-Wirksamkeit von Doxorubicin begrenzt (Tebbi et al., 2007). Ein weiterer Ansatz wäre das Doxorubicin in den standardmäßig eingesetzten Chemotherapieschemata ganz zu ersetzen. Pixantrone (BBR2778) ist ein neuartiges Anthracyclinderivat, welches sowohl in

präklinischen als auch in klinischen Studien eine deutlich geringere Kardiotoxizität und bessere antineoplastische Aktivität als die alternativen Anthrazykline zeigte. Phase-III- Studien von Pixantrone wurden abgeschlossen (Pettengellet al 2012; Cabanillas F; Engert et al 2006) und das Medikament erhielt von der *European Medicines Agency* eine bedingte Zulassung für die Monotherapie bei rezidivierenden/ refraktären aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen. Hinweise über eine antineoplastische Aktivität von Pixantrone bei HL fehlen bis jetzt.

Unserer Meinung nach könnte das FTI Tipifarnib in HL zu einem Kombinationspartner von Doxorubicin werden. Um den Einsatz von Tipifarnib als Kombinationstherapie mit klassischen Zytostatika bei HL zu bewerten, sind weitere Studien erforderlich.

Für die Zukunft wäre es interessant Tierversuche unter Troponin-Screening mit Doxorubicin und Tipifarnib durchzuführen, um die synergistischen Effekte auch *in vivo* zu

Diskussion

bestätigen und das Absterben von Kardiomyozyten indirekt zu quantifizieren.

5. Zusammenfassung

Heute basiert die HL-Therapie auf Chemotherapeutika. Doxorubicin ist ein effektives, aber auch toxische Medikament der Standard HL-Polychemotherapie. Vor allem wegen der Kardiotoxizität muss der Einsatz von Doxorubicin häufig limitiert werden. Ein weiteres Problem der aktuellen Chemotherapieregime ist die Multidrug Resistenz. Zu den Zielen dieser Arbeit zählen die Entwicklung neuer Therapiekonzepte mit alternativen, beim HL bisher nicht eingesetzten Substanzen und Kombinationen. Aus ethischen Gründen müssen vor Tierversuchen und ersten Phase I Studien bei Patienten in einem *in vitro*-Modell erste Wirksamkeitsprüfungen unternommen werden.

Es wurde die zytotoxische Wirkung des FTI Tipifarnib und des CoA-Reduktasehemmers Simvastatin auf HL-Zelllinien evaluiert. Darüber hinaus wurden die Kombinationseffekte von diesen Pharmaka mit Doxorubicin erforscht.

Es wurde gezeigt, dass sowohl Tipifarnib als auch Simvastatin alleinige zytotoxische Aktivität in den HL-Zelllinien entwickeln. Die Koinkubation von HL-Zellen mit Simvastatin und Doxorubicin führt zu antagonistischen Effekten. Die Koinkubation von Tipifarnib und Doxorubicin führt überwiegend zu synergistischen Effekten. Tipifarnib erhöht in klinisch relevanten Konzentrationen die intrazelluläre Doxorubicin-Konzentration. Folglich sollte der Einsatz von Tipifarnib dazu führen, die Doxorubicin –Dosis zu verringern und dadurch seine akute und langfristige Toxizität positiv zu beeinflussen.

Tipifarnib könnte als Chemosensitizer in Kombinationstherapie für Patienten mit refraktärer Erkrankung eingesetzt werden. Weitere Studien sind notwendig um die Wirksamkeit und Toxizität dieser neuartigen Kombination zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2223–2229.
2. Adjei AA; (2001) Blocking onkogene Ras-Signalweg für die Krebstherapie . J Natl Cancer Inst. 93 : 1062 - 1074 .
3. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Simvastatin potentiates TNF-alpha-induced apoptosis through the down-regulation of NF-kappaB-dependent antiapoptotic gene products: role of IkappaBalpha kinase and TGF-beta-activated kinase-1. *J Immunol.* 2007;178:2507–2516.
4. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Reversal of chemoresistance and enhancement of apoptosis by statins through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:907–913
5. Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. (2008): *Molecular Biology of the Cell.* 5. Ed.; New York: Taylor & Francis Inc

6. Alsina, M., Fonseca, R., Wilson, E.F., Belle, A.N., Gerbino, E., PriceTroska, T., Overton, R.M., Ahmann, G., Bruzek, L.M., Adjei, A.A., Kaufmann, S.H., Wright, J.J., Sullivan, D., Djulbegovic, B., Cantor, A.B., Greipp, P.R., Dalton, W.S., Sebti, S.M., 2004.
Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 103,3271–3277.
7. Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G., und Stein, H. (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 74, 810-816
8. Andres, D.A., Milatovich, A., Ozçelik, T., Wenzlau, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Francke, U. (1993): cDNA cloning of the two subunits of human CAAX farnesyltransferase and chromosomal mapping of FNTA and FNTB loci and related sequences. *Genomics* 18, 105-112
9. Ashar, H.R., James, L., Gray, K., Carr, D., Black, S., Armstrong, L., Bishop, W.R., Kirschmeier, P. (2000): Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-

- E with the microtubules. *J Biol Chem.* 275, 30451-30457
10. Aszalos A., Ladanyi A., Bocsi J., Szende B., Induction of apoptosis in MDR1 expressing cells by daunorubicin with combinations of suboptimal concentrations of P-glycoprotein modulators. *Cancer Lett*, 167: 157-162, 2001
 11. Awada A, Gil T, de Valeriola D, Lalami Y, De Porre P, Piccart-Gebhart MJ. A phase I clinical and pharmacokinetic study of tipifarnib in combination with docetaxel in patients with advanced solid malignancy; *Curr Med Res Opin.* 2007 May;23(5): 991-1003.
 - 13 Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C and Dorken B (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100, 2961-2969
 - 14 Beaupré D, Cepero E, Obeng E, Boise L and Lichtenheld M (2004) R115777 induces Ras-independent apoptosis of myeloma cells via multiple intrinsic pathways. *Mol Cancer Ther* 3, 179-186.
 - 15 Behringer K, Thomas RK, Pfreundschuh M, Diehl V, Wolf J (2006): Maligne Lymphome. In: *Kompodium Internistische Onkologie* –

Standards in Diagnostik und Therapie. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.), 4. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 69-88

- 16 Bellamy WT ; Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor und seinen Rezeptoren in multiplen Myelom und anderen hämatopoetischen Malignitäten; *Oncol* 2001 Dec; 28 (6) :551-9
- 17 Belpomme D., Gauthier S., Pujade-Lauraine E., Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol*, 11: 1417-1476, 200
- 18 Berra E., Pages G., Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev.*, 19: 139-145, 2000
- 19 Bocci D, Fioravanti A, Orlandi P, Bernardini N, Collecchi P, Del Tacca M, Danesi R; *Br J Cancer*. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells. 2005 Aug 8;93(3):319-30.
- 20 Brandwein JM, Leber BF, Howson-Jan K, et al. A phase I study of tipifarnib combined with conventional induction and consolidation therapy for previously untreated patients with acute myeloid leukemia aged 60 years and over. *Leukemia* 2009;23(4):631-634

- 21 Brown, E. J., P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin u. S. L. Schreiber (1995): Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*. *Nature* 377, 441-446
- 22 Cabanillas F.; Pixantrone: a new agent for relapsed aggressive lymphomas. *Lancet Oncol.* 2012 Jul;13(7):654-6. doi: 10.1016/S1
- 23 Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis.* 2005; 26:883–891
- 24 Caponigro, F., Casale, M., Bryce, J. (2003): Farnesyl transferase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 12, 943-954
- 25 Caporaso NE, Goldin LR, Anderson WF, Landgren O. Current insight on trends, causes, and mechanisms of Hodgkin's lymphoma. *Cancer Journal.* 2009;15(2):117–123.
- 26 Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA.; Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32493-6. Epub 2003 Jul 3.

- 27 Chan, H., Bartos, D. P., Owen-Schaub, L. B.,
Activation-dependent transcriptional regulation
of the human Fas promoter requires NF- κ B p50-
p65 recruitment. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19:
2098-2108.
- 28 Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F.,
Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-
inducible factor-1. Interaction between H-ras and
hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 276: 9519-9525, 2001.
- 29 Chou T-C. Theoretical basis, experimental
design and computerized simulation of
synergism an antagonism in drug combination
studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681, 2006
- 30 Chun-Ki Kim , Yoon Kyung Choi ,Kwon-Soo
Ha ,Moo-Ho Won ,Kwon Young-Guen Young-
Kim Myeong The Farnesyltransferase Inhibitor
LB42708 Suppresses Vascular Endothelial
Growth Factor-Induced Angiogenesis by
Inhibiting Ras-dependent Mitogen-Activated
Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-
Kinase/Akt Signal Pathways; *Molekulare
Pharmakologie*Juli 2010 vol. 78 Nr. 1142-150
- 31 Clutterbuck RD, Millar BC, Powles RL,
Newman A, Catovsky D, Jarman M, Millar JL;
Inhibitory effect of simvastatin on the
proliferation of human myeloid leukaemia cells
in severe combined immunodeficient (SCID)
mice; *Br J Haematol.* 1998 Jul;102(2):522-7

- 32 Cohen (2005): HMG CoA reductase inhibitors (statins) to treat Epstein-Barr virus-driven lymphoma. *Br J Cancer* 92:1593–8.)
- 33 Costa, R.H. (2005): FoxM1 dances with mitosis. *Nat Cell Biol.* 7, 108-110
- 34 Dai Y, Chen S, Pei XY, et al. Interruption of the Ras/MEK/ERK signaling cascade enhances Chk1 inhibitor-induced DNA damage *in vitro* and *in vivo* in human multiple myeloma cells. *Blood.* 2008;112(6):2439-2449. Prepublished on 2008/07/11 as DOI blood-2008-05-159392 [pii]
- 35 Delabie, J., Shipman, R., Bruggen, J., De Strooper, B., van Leuven, F., Tarcsay, L., Cerletti, N., Odink, K., Diehl, V., Bilbe, G., *et al.* (1992). Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 80, 2891-2896.
- 36 De, J., und Brown, R.E. (2010). Tissue-microarray based immunohistochemical analysis of survival pathways in nodular sclerosing classical Hodgkin lymphoma as compared with Non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Exp Med* 3, 55-68.
- 37 Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM (2005) Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5:930–42

- 38 Dempke W (2006): Lehrbuch Hämato-Onkologie. Hämatologie – Onkologie – Hämostaseologie. Hans Huber Verlag, Bern, 566-578
- 39 Diehl V (2002): Therapiefortschritte beim Hodgkin-Lymphom. 1. Auflage, UNI-MED Verlag, Bremen
- 40 Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2001;7:158–167
- 41 Drexler, H.G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma* 8, 283-313
- 42 Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, et al. Constitutive activation of phosphatidyl-inositide 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol* 2005;205:498–506.
- 43 Ding H, Hackbarth J, Schneider P, et al. Cytotoxicity of farnesyltransferase inhibitors in lymphoid cells mediated by MAPK pathway inhibition and

- Bim upregulation [published online ahead of print June 14, 2011]. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2011-02-334870.
- 44 Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenese und antiangiogene Therapie bei malignen hämatologischen Erkrankungen, *Critical Reviews in Onkologie / Hämatologie* . 2007; 62 . (2) :105-118
- 45 Downward, J. (2003): Ras Targeting signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3, 11-22
- 46 Doussis-Anagnostopoulou IA , Talks KL , Turley H , P Debnam , Tan DC , Mariatos G , Gorgoulis V , Kittas C , Gatter KC Vascular endothelial growth factor (VEGF) wird von neoplastischen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen bei Morbus Hodgkin ausgedrückt;. *J Pathol* 2002 Aug; 197 (5) :677-83.
- 47 End DW, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, Venet M, Sanz G, Poinet H, Skrzat S, Devine A, Wouters W, Bowden C.; Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. 2001 Jan 1;61(1):131-7.
- 48 Engert, M. Fuchs, R. Greil, A. Lohri; S3 Leitlinie Hodgkin-Lymphome. Juli 2012

- 49 Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, Zijlstra J, Král Z, Fuchs M, Hallek M, Kanz L, Döhner H, Dörken B, Engel N, Topp M, Klutmann S, Amthauer H, Bockisch A, Kluge R, Kratochwil C, Schober O, Greil R, Andreesen R, Kneba M, Pfreundschuh M, Stein H, Eich HT, Müller RP, Dietlein M, Borchmann P, Diehl V; German Hodgkin Study Group; Swiss Group for Clinical Cancer Research; Arbeitsgemeinschaft Medikamentöse Tumortherapie. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2012 May 12;379(9828):1791-9. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61940-5. Epub 2012 Apr 4.
- 50 Andreas Engert, M.D., Annette Plütschow, Ph.D., Hans Theodor Eich, M.D., Andreas Lohri, M.D., Bernd Dörken, M.D., Peter Borchmann, M.D., Bernhard Berger, M.D., Richard Greil, M.D., Kay C. Willborn, M.D., Martin Wilhelm, M.D., Jürgen Debus, M.D., Michael J. Eble, M.D., Martin Sökler, M.D., Antony Ho, M.D., Andreas Rank, M.D., Arnold Ganser, M.D., Lorenz Trümper, M.D., Carsten Bokemeyer, M.D., Hartmut Kirchner, M.D., Jörg Schubert, M.D., Zdenek Král, M.D., Michael Fuchs, M.D., Hans-Konrad Müller-Hermelink, M.D., Rolf-Peter Müller, M.D., and Volker Diehl, M.D. N

Engl J Med 2010; 363:640-652 August 12,
2010 DOI: 10.1056/NEJMoa1000067

- 51 Engert A, Herbrecht R, Santoro A, Zinzani PL, Gorbachevsky I (September 2006). "EXTEND PIX301: a phase III randomized trial of pixantrone versus other chemotherapeutic agents as third-line monotherapy in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin's lymphoma". *Clin Lymphoma Myeloma* 7 (2): 152–4.
- 52 Epling-Burnette PK, Bai F, Wei S, et al. ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Oncogene*. 2004;23(57):9220-9229.
- 53 Epling-Burnette PK, Dr. pharm., PhD, Associate Professor und Thomas P. Loughran, Jr. ; Unterdrückung von Farnesyltransferase Activity in akuter myeloischer Leukämie und myelodysplastischen Syndrome: Aktuelle Understanding und empfohlene Verwendung von Tipifarnib; Expert Opinion Investig Drugs. Autor Manuskript; in PMC 2012 6. Januar. Veröffentlicht in der letzten bearbeiteten Form als: Expert Opinion Investig Drugs. 2010 May; 19 (5) : 689-698.
- 54 Falini B, Bigerna B, Pasqualucci L, Fizzotti M, Martelli MF, Pileri S, Pinto A, Carbone A, Venturi S, Pacini R, Cattoretti G, Pescarmona E,

- et al.* (1996). Distinctive expression pattern of the BCL-6 protein in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Blood*, 87, 465-471.
- 55 Feldman EJ. Farnesyltransferase inhibitors in myelodysplastic syndrome *Curr Hematol Rep.* 2005 May;4(3):186-90.
- 56 Feleszko W, Mlynarczuk I, Balkowiec-Iskra EZ, Czajka A, Switaj T, Stoklosa T, et al. Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2044–052
- 57 Fenaux Pierre, Azra Raza, Ghulam J. Mufti, Carlo Aul, Ulrich Germing, Hagop Kantarjian, Larry Cripe, Rene´ Kerstens, Peter De Porre and Razelle Kurzrock;
A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome; *Blood* 2007 109: 4158-4163
doi:10.1182/blood-2006-07-035725 Prepublished online January 30, 2007;
- 58 Fingar D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow u. J. Blenis (2002): Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16, 1472-1487

- 59 Fiumara P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B., und Younes, A. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 98, 2784-2790.
- 60 Fortuny J, de Sanjose S, Becker N, Maynadie M, Cocco PL, Staines A, et al.(2006) Statin use and risk of lymphoid neoplasms: results from the European Case-Control Study EPI-LYMPH. *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev* 15:921–5.
- 61 Frater JL, Kay NE, Goolsby CL, Crawford SE, Dewald GW, Peterson LC. Dysregulierte Angiogenese in B-CLL: morphologische, immunhistochemische und durchflusszytometrische Nachweis.*Diagnostische Pathol* . 2008; 3 (1, Artikel 16)
- 62 Fritz G. Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9:626–638.
- 63 Fulda, S., Los, M., Friesen, C., Debatin, K.M., Chemosensitivity of solid tumor *cells in vitro* is related to activation of the CD95 system. *Int. J. Cancer*, 1998, 76: 105-114

- 64 Georgakis GV, Yazbeck VY, Li Y, et al. The mTOR inhibitor temsirolimus (CCI-779) induces cell cycle arrest and autophagy in Hodgkin lymphoma (HL) cell lines and enhances the effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006;108:2259
- 65 Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol.* 2008 Aug 1;26(22):3777-84
- 66 Gingras, A. C., B. Raught u. N. Sonenberg (2001): Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15, 807-826
- 67 Gires , O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., und Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18, 3064-3073.
- 68 Gires , O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., und Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131-6140.
- 69 Goethals, I., et al., The clinical value of nuclear medicine in the assessment of irradiation-

- induced and anthracycline-associated cardiac damage. *Ann Oncol*, 2002. 13(9): p. 1331-9
- 70 Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug-Resistenz in der Krebstherapie: Rolle von ATP-abhängigen Transportern. *Nat Rev Cancer* 2002 ; 2 : 48 -58.
- 71 Han JY, Oh SH, Morgillo F, Myers JN, Kim E, Hong WK, and Lee HY (2005)
Hypoxia-inducible factor 1alpha and antiangiogenic activity of farnesyltransferase inhibitor SCH66336 in human aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:1272–1286.
- 72 Harris, N.L. (1999). Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol* 36, 220-232.
- 73 Harutaka Katano, Lesley Pesnicak, and Jeffrey I. Cohen* Simvastatin induces apoptosis of Epstein–Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas; Edited by Bernard Roizman, University of Chicago, Chicago, IL, and approved February 4, 2004 (received for review August 11, 2003)
- 74 Heinz J (2006): Hodgkin-Lymphom (M. Hodgkin). In: *Das Rote Buch – Hämatologie und Internistische Onkologie*. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R (Hrsg.), 3., überarbeitete und

erweiterte Auflage, ecomed Medizin Verlag,
Landsberg, Lech, 504-513

- 75 Heimpel H, Hoelzer D, Lohrmann HP, Seifried E (1996): Hämatologie in der Praxis. 2., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 137-147
- 76 Henle, G., Henle, W., und Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc Natl Acad Sci U S A 59, 94-101.
- 77 Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T: "FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis." J Exp Med 2001, (193):447-458.
- 78 Holstein SA, Knapp HR, Clamon GH, Murry DJ, Hohl RJ. Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies. Cancer Chemother Pharmacol 2006;57:155-64.
- 79 Jaffe, E.S., ed. (2001). WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (Lyon, IARC Press.).
- 80 Jaroszeskij M.J., Radcliff G.: Fundamentals of Flow Cytometry. Molecular Biotechnology 1999; 11: 37-53

- 81 Jarrett, R.F., und MacKenzie, J. (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36, 260-269.
- 82 Johnston PB, Inwards DJ, Colgan JP, Laplant BR, Kabat BF, Habermann TM, Micallef IN, Porrata LF, Ansell SM, Reeder CB, Roy V, Witzig TE; A Phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma; *Am J Hematol*. 2010 May;
- 83 Jonker DM, Visser SA, van der Graaf PH, Voskuyl RA, Danhof M. Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug-drug interactions *in vivo*. *Pharmacol Ther* 106:1-18, 2005
- 84 Jundt F, Raetzl N, Muller C, et al. A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF-{kappa}B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 2005;106:1801–1807.
- 85 Jun Wu¹, Yanhui Lu¹, Alice Lee^{1,2}, Xiaogang Pan^{1,2}, Xiaojuan Yang^{1,2}, Xiaobin Zhao^{1,3}, Robert J. Lee^{1,2,3*}; Reversal of Multidrug Resistance by Transferrin-Conjugated Liposomes Co-encapsulating Doxorubicin and Verapamil; *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspscanada.org) 10(3): 350-357, 2007

- 86 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* 1997, (388):190-195.
- 87 Kaelin WG, Jr. Die von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein und klarzelligen Nierenzellkarzinoms *Clinical Cancer Research* . 2007; 13 (2):. 680S-682s
- 88 Kanavaros, P., Vlychou, M., Stefanaki, K., Rontogianni, D., Gaulard, P., Pantelidaki, E., Zois, M., Darivianaki, K., Georgoulas, V., Boulland, M.L., *et al.* (1999). Cytotoxic protein expression in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Anticancer Res* 19, 1209-1216
- 89 Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, Wolf J, Diehl V, Rajewsky K and Kuppers R (1996).Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, 87, 3429-3436.
- 90 Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipsword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M, *et al.*

- (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*, 189, 1939-1946.
- 91 Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, et al. 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*. 2001;97(11):3361-3369.
- 92 Katano H, Pesnicak L, Cohen JI (2004) Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4960–5;
- 93 Kenneth A Field, Soratree Charoenthongtrakul¹, J Michael Bishop² and Yosef Refaeli Farnesyl transferase inhibitors induce extended remissions in transgenic mice with mature B cell lymphomas *Molecular Cancer* 2008,
- 94 Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., und Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 17, 1700-1709.
- 95 Kirschbaum, Synold, Stein, Tuscano, Zain, Popplewell, Karanes, R.

- O'Donnell, Pulone, Rincon, Wright, Paul Frankel, J. Forman, M. Newman; A Phase 1 Trial Dose Escalation Study of Tipifarnib on a Week-On, Week-Off Schedule in Relapsed, Refractory or High-Risk Myeloid Leukemia
- 96 Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, Cattoretti G, Cfanò A, Dalla-Favera R: "Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, (100):2639-2644.
- 97 Klohs W.D., Steinkampf R.W., The effect of lysosomotropic agents and secretory inhibitors on anthracycline retention and activity in multiple drug-resistant cells. *Mol Pharmacol*, 34: 180-185, 1988.
- 98 Krenacs, L., Wellmann, A., Sorbara, L., Himmelmann, A.W., Bagdi, E., Jaffe, E.S., und Raffeld, M. (1997). Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood* 89, 980-989.
- 99 Krishna R., Mayer L.D., Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs, *Eur J Pharm Sci*, 11: 265-283, 2000

- 100 Krüger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S: "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 2001, (276):20633-20640.
- 101 Kuppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5:251-62
- 102 Küppers, R., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1998a). Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol 9 Suppl 5*, S17-20.
- 103 Kutok, J.L., und Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol 1*, 375-404
- 104 Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1387-94. Epub 2006 Nov 2.
- 105 Landgren, O., und Caporaso, N.E. (2007). New aspects in descriptive, etiologic, and molecular

- epidemiology of Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 21, 825-840.
- 106 Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:89–118
- 107 Lin, S.C., Liu, C.J., Lin, J.A., Chiang, W.F., Hung, P.S., und Chang, K.W. (2010). miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and *in vitro* analysis. *Oral Oncol* 46, 204-208.
- 108 Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher Hp, Bommert K, Stein H, Dörken B: "c-FLIP mediates resistance of Hodgkin Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis". *J Exp Med* 2004, 199:1041-1052
- 109 Mavrakis KJ, Zhu H, Silva RL, et al. Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase. *Genes Dev.* 2008; 22(16):2178-2188.
- 110 Medeiros BC, HJ Landau, M Morrow, RO Lockerbie, T Pitts und SG Eckhardt; Die Farnesyltransferaseinhibitor, tipifarnib, ist ein potenter Inhibitor des MDR1-Genprodukt, das P-Glykoprotein, und zeigt signifikante zytotoxische Synergismus gegen menschliche Leukämie-Zelllinien *Leukemia* (2007) 21, 739-746. doi:

10.1038/sj.leu.2404539; online veröffentlicht 1.
Februar 2007

- 111 Medinger, Fischer Tzankov ;Vascular Endothelial Growth Factor-Related Pathways in Hämato-Lymphmalignitäten;J Oncol. 2010; 2010: 729725.
- 112 Merlin J., Bour-Dill C., Marchal S., Ramacci C., Poullain M., Giroux B., Modulation of daunorubicin cellular resistance by combination of P-glycoprotein blockers acting on drug efflux and intracellular drug sequestration in Golgi vesicles. Cytometry, 41: 62-72, 2000
- 113 Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, Liberi G, Animati F, Cipollone A, Manzini S, Maggi CA; Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. Chem Res Toxicol. 2000 Dec;13(12):1336-41.
- 114 Mitchell CL. Statistical analysis of drug interactions. NIDA Res Mongr 68:41-64, 1986
- 115 Mross K, Hamm K., Hossfeld D.K., Effects of verapamil on the pharmacokinetics and metabolism of epirubicin. Cancer Chemother Pharmacol, 31: 369-375, 1993

- 116 Müller NE, Grufferman S, Chang ET (2007):
The epidemiology of Hodgkin
Lymphoma. In: Hodgkin Lymphoma. Hoppe RT,
Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM
(Hrsg.), 2nd Edition, Lippincott Williams &
Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, 7-
23
- 117 Munoz, N., Davidson, R.J., Witthoff, B.,
Ericsson, J.E., und De-The, G. (1978). Infectious
mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J
Cancer* 22, 10-13.
- 118 O'Grady, J.T., Stewart, S., Lowrey, J., Howie,
S.E., und Krajewski, A.S. (1994). CD40
expression in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*
144, 21-26.
- 119 O'Regan RM, Khuri FR. Farnesyl transferase
inhibitors: the next targeted therapies for
breastcancer? *Endocr Relat Cancer*.
2004;11(2):191-205.
- 120 Oudejans, J.J., Kummer, J.A., Jiwa, M., van der
Valk, P., Ossenkoppele, G.J., Kluin, P.M., Kluin-
Nelemans, J.C., und Meijer, C.J. (1996).
Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells
of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 148, 233-240
- 121 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global
cancer statistics, 2002. *Ca-A Cancer Journal for
Clinicians*. 2005;55(2):74-108.

- 122 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- 123 Pettengell R, Coiffier B, Narayanan G, de Mendoza FH, Digumarti R, Gomez H, Zinzani PL, Schiller G, Rizzieri D, Boland G, Cernohous P, Wang L, Kuepfer C, Gorbachevsky I, Singer JW. Pixantrone dimaleate versus other chemotherapeutic agents as a single-agent salvage treatment in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: a phase 3, multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jul;13(7):696-706. doi: 10.1016/S1
- 124 Piccart-Gebhart MJ, Branle F, de Valeriola D, et al. A phase I, clinical and pharmacokinetic (PK) trial of the farnesyl transferase inhibitor (FTI) R115777 + docetaxel: a promising combination in patients (pts) with solid tumors. Program and abstracts of the 37th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; May 12-15, 2001; San Francisco, California. Abstract 318.
- 125 Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Langhoff, E., Matsumura, F., Yamashiro, S., Mosialos, G., and Said, J.W. (1997). Fascin, a sensitive new marker

- for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease.
Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* 150, 543-562.
- 126 Pro B, Younes A, Albitar M, et al. . Thalidomid für Patienten mit rezidivierenden Lymphom *Krebs* .2004; 100 . (6) :1186-1189
- 127 Raffael. A., Nebe C.TH., Valet G.: .: Grundlagen der Durchflußzytometrie in Schmitz-Rothe (Hrsg): Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik.
- 128 J. Rak , Y. Mitsuhashi , L. Bayko , J. Filmus , S. Shirasawa , T. Sasazuki,
Kerbel RS 2; Mutierte *ras*- Onkogene hochregulieren VEGF / VPF Expression: Implikationen für die Induktion und Hemmung der Tumorangiogenese; *Cancer Res.* 15. Oktober 1995 55;4575
- 128 Rank A, Buske C, Siefert A, Hiller E (2008): Morbus Hodgkin (Lymphogranulomatose). In: Manual Maligne Lymphome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Dreyling M (Hrsg.), 7. Überarbeitete Auflage, Tumorzentrum München, 51-65
- 129 Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27,

- independent of p53. *Oncogene*. 1998;17:2393–2402
- 130 Raymond F. Greene, Jerry M. Collins, Jean F. Jenkins, et al; Plasma Pharmacokinetics of Adriamycin and Adriamycinol: Implications for the Design of *in Vitro* Experiments and Treatment Protocols; *Cancer Res* 1983;43:3417-3421.
- 131 Robert Koch Institut; ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN . Krebs in Deutschland 2007/2008; 8. Ausgabe, 2012
- 132 Robin V ,Debusscher L ,Bosly A ,André M ,El Housni H,Soree A ,Bron D , Martiat P, (2008) Farnesyltransferaseinhibitor (Lonafarnib) bei Patienten mit myelodysplastischen Syndroms oder sekundärer akuter myeloischer Leukämie: Eine Phase-II-Studie . *Ann Hematol* 87 : 881 - 885
- 133 Ruan J, K Hajjar, Rafii S, Leonard JP. L'angiogenesi e la terapia antiangiogenica nel linfoma non-Hodgkin. *Annals of Oncology* . 2009; 20 (3) :413-42
- 134 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME: The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 1999, (274):1541-1548

- 135 Santos ES, Rosenblatt JD, Goodman M. Role of farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2004;4(5):843-856
- 136 Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009, 4, S. 151-74
- 137 Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., und Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 299, 65-67.
- 138 Sebti SM, Adjei AA. Farnesyltransferase inhibitors. *Semin Oncol.* 2004; 31(1 suppl1):28-39
- 139 Scudiero, D.A., R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, and M.R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.
- 140 Sebti SM. Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell.* 2005;7(4):297-300

- 141 Seger R, Krebs EG (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9(9): 726-735.
- 142 Sehested M., Skovsgaard T., Roed H., The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates *in vitro* resistance in daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 1988 Sep 1;37(17):3305-10
- 143 Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Rands E, et al. A Peptidomimetic Inhibitor of Farnesyl: Protein Transferase Blocks the Anchorage-Dependent and -Independent Growth of Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research.* 1995;55(22):5302-5309.
- 144 Serban D, Kiel J ,Cheresh D (2008) H-ras reguliert Angiogenese und vaskuläre Permeabilität durch die Aktivierung verschiedener Effektoren . *Circ Res.* 102 :1350 - 1358 .
- 145 Shen F, Chu S, Bence AK, Bailey B, Xue X, Erickson PA, Montrose MH, Beck WT, Erickson LC Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells; *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jan;324(1):95-102. Epub 2007 Oct 18.

- 146 Simon SM, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3497–504.)
- 147 Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trumper LH, von Bonin F, Kapp U, Patterson B, Snow BE and Mak TW (2001a). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 97, 250-255.
- 148 Skinnider, B.F., und Mak, T.W. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 4283-4297.
- 149 Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2005): Unraveling the mechanism of the farnesyltransferase enzyme. *J Biol Inorg Chem*. 10, 3-10
- 150 Sparano JA, Moulder S, Kazi A, et al. Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIc breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(8):2942-2948.
- 151 Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G and Falini B (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease

correlates with immunoglobulin transcription.
Blood, 97, 496-501

- 152 Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer,
Congestive heart failure in patients treated with
doxorubicin: a retrospective analysis of three
trials. *Cancer*, 2003. 97(11): p. 2869-79.
- 153 Takada, Y., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B.,
Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH
66336)abolishes NF-kappaB activation induced
by various carcinogens and inflammatory stimuli
leading to suppression of NF-kappaB-regulated
gene expression and up-regulation of apoptosis. *J
Biol Chem.*, 2004, 279: 26287-2699
- 154 Takahashi Y, Ohta H, Takemori T: "Fas is
required for clonal selection in germinal centers
and the subsequent establishment of the memory
B cell repertoire." *Immunity*
2001, (14):181-192
- 155 Tebbi CK, London WB, Friedman D, et al.
(2007)J. Dexrazoxane-associated risk for acute
myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome
and other secondary malignancies in pediatric
Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*; 25:493-500
- 156 Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD,
Cooper MR, Hohl RJ, et al. Phase I study of
lovastatin, an inhibitor of the mevalonate
pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer
Res* 1996;2:483-91

- 157 Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Causes Control* 2003; 10:159–65.
- 158 Thomas, Kallenborn, Wickenhauser, Schultze, Draube, Vockerodt, Re, Diehl, Wolf; Constitutive Expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells; *Am J Pathol.* 2002 April; 160(4): 1521–1528.PMCID: PMC1867202
- 159 Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J: "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." *Nature* 1997, (386):517-521.
- 160 Trümper L, Pfreundschuh M, Jacobs G, von Bonin F, Loftin U, Möller P, Daus H. (1996); N-ras genes are not mutated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single cell polymerase chain-reaction examinations. *Leukemia.* 1996 Apr;10(4):727-30.
- 161 van den Berg, A., Visser, L., und Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell

- infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 154, 1685-1691.
- 162 von Bossanyi P, Dietsch S, Dietzmann K, Kirches MW, Kirches E. Immunohistochemical expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferases in cerebral gliomas and response to chemotherapy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;94: 605–11.
- 163 von Tresckow B, von Strandmann EP, Sasse S, Tawadros S, Engert A, Hansen HP. Simvastatin-dependent apoptosis in Hodgkin's lymphoma cells and growth impairment of human Hodgkin's tumors *in vivo*. *Haematologica*. 2007 May;92(5):682-5
- 164 Wang E, Johnson WW; The Farnesyl Protein Transferase Inhibitor Lonafarnib (SCH66336) Is an Inhibitor of Multidrug Resistance Proteins 1 and 2; Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Schering-Plough Research Institute, Lafayette, N.J., USA; *Chemotherapy* 2003;49:303-308
- 165 Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 is a potent inhibitor of MDR1 product P-glycoprotein. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7525-9.

- 166 Wörnberg, White, Anderson, Knox, Clarkel, Morris, Bundred; Effect of a farnesyl transferase inhibitor (R115777) on ductal carcinoma *in situ* of the breast in a human xenograft model and on breast and ovarian cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*; *Breast Cancer Research* 2006, **8**:R21
- 167 Weiss, L.M., Warnke, R. and Hansmann, M.L., ed. (2007). Pathology of Hodgkin Lymphoma. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins).
- 168 Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., und Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320, 502-506.
- 169 Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, et al. Lenalidomid-Monotherapie bei rezidiviertem oder refraktärem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom. *Journal of Clinical Oncology* .2008; 26 (30) :4952-4957.
- 170 Witzig TE, Tang Hui; Micallef Ivana N M; Stephen M Ansell; Brian K Link; David J Inwards; Luis F Porrata; Patrick B Johnston; Joseph P Colgan; Svetomir N Markovic; et al. Multi-institutional phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777) in patients with relapsed and refractory lymphomas. *Blood* 2011;118(18):4882-9.

- 171 Witzig TE, Wiernik PH, Moore T, et al. Lenalidomid oralen Monotherapie produziert lang anhaltenden Remissionen bei rezidivierten oder refraktären indolenten Non-Hodgkin-Lymphom. *Journal of Clinical Oncology* . 2009; 27 (32) :5404-5409.
- 172 Wong, W. W., Dimitroulakos, J., Minden, M. D. & Penn, L. Z. (2002) HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis
- 173 van de Donk NW, Schotte D, Kamphuis MM, van Marion AM, van Kessel B, Bloem AC, et al. (2003) Protein geranylgeranylation is critical for the regulation of survival and proliferation of lymphoma tumor cells. *Clin Cancer Res* 9:5735–48.
- 174 van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C: "Death-receptor contribution to the germinal-center reaction." *Trends Immunol* 2001, (22):677-682
- 175 van Eijk M(a), Medema JP, de Groot C: "Cutting edge: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein protects germinal center B cells from apoptosis during germinal center reactions." *J Immunol* 2001, (166):6473-6476.

- 176 Vezmar M., Georges E., Reversal of MDR-mediated doxorubicin resistance with quinolone-based drugs. *Biochem Pharmacol*, 59: 1245-1252, 2000.
- 177 Vitols S, Angelin B, Juliusson G., Simvastatin impairs mitogen-induced proliferation of malignant B-lymphocytes from humans--*in vitro* and *in vivo* studies; *Lipide*. 1997 Mar; 32 (3):255-62
- 178 Volm M., Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res*, 18: 2905-2918, 1998
- 179 von Tresckow Bastian, Annette Plütschow, Michael Fuchs, Beate Klimm, Jana Markova, Andreas Lohri, Zdenek Kral, Richard Greil, Max S. Topp, Julia Meissner, José M. Zijlstra, Martin Soekler, Harald Stein, Hans T. Eich, Rolf P. Mueller, Volker Diehl, Peter Borchmann, and Andreas Engert. Dose-Intensification in Early Unfavorable Hodgkin's Lymphoma: Final Analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 Trial. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* March 20, 2012 vol. 30 no. 9 907-913
- 180 von Tresckow B, von Strandmann EP, Sasse S, Tawadros S, Engert A, Hansen HP. Simvastatin-dependent apoptosis in Hodgkin's lymphoma cells and growth impairment of human Hodgkin's tumors *in vivo*. *Haematologica*. 2007 May;92(5):682-5.

- 181 Yuanzheng Qiu ,Xiangguo Liu ,Zou Wei ,Ping Yue ,Sagar koloniale ,Fadlo R. Khuri und Shi Yong Sun-Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology:The Farnesyltransferase Inhibitor R115777 Up-regulates the Expression of Death Receptor 5 and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Human Lung Cancer Cells;*Cancer Res.* 15 Mai 2007 67 : 4973 - 4980 , doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4044
- 182 Yanamandra N, Colaco NM, Parquet NA, Buzzeo RW, Boulware D, Wright G, Perez LE, Dalton WS, Beaupre DM (2006) Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 12:591–599.
- 183 Yung, L., und Linch, D. (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361, 943-951.
- 184 Zhang, B., Prendergast, G. C., Fenton, R. G., Farnesyltransferase Inhibitors Reverse Rasmediated Inhibition of Fas Gene Expression. *Cancer Research*, 2002, 62: 450-458.
- 185 Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, Vauthey JN, Carbone A, Younes A; MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by

- CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):1019-27. Epub 2003 Apr 10.
- 186 Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins – Basic research and clinical perspectives. *Circ J*. 2010;74:818–826.
- 187 Zhu K, Gerbino E, Beaupre DM, et al. Farnesyltransferase inhibitor R115777 (Zarnestra, Tipifarnib) synergizes with paclitaxel to induce apoptosis and mitotic arrest and to inhibit tumor growth of multiple myeloma cells. *Blood* 2005; 105:4759–66.
- 188 Zimmerman TM, Harlin H, Odenike OM, et al. Dose-ranging pharmacodynamic study of tipifarnib (R115777) in patients with relapsed and refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2004;22(23):4816-4822.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.