

Aus dem Institut für Pathologie  
Der Universität Hamburg  
Direktor: Professor Doktor Udo Helmchen

Wachstum der humanen Tumor-Zelllinie 160/91  
auf der Nacktmaus  
unter Inhibition der Cholesterinsynthese

## Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt von

David Felix Heigener,

geboren in Hamburg.

Hamburg, 1997

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am 24. Okt. 1997

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches  
Medizin der Universität Hamburg.

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß  
Referent: Prof. Dr. A. Niendorf  
Koreferent: Prof. Dr. U. Helmchen

Für Angelika

## Liste der Abkürzungen

bidest.:	bidestillata
c-rt-PCR:	kompetitive, revers transkribierende Polymerase- Kettenreaktion
del.:	Kompetitor-RNA mit Deletion
dest.:	destillata
DNA:	Desoxy-Ribonukleinsäure
FFS:	freie Fettsäuren
GDP:	Guanosin-Diphosphat
GM-CSF:	Granulocyte/Macrophage- Colonystimulating-Factor
GTP:	Guanosin-Triphosphat
HDL:	High-Density-Lipoprotein
HE:	Hämalaun-Eosin-Färbung
HMG-CoA:	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl- Coenzym A
IDL:	Intermediate-Density-Lipoprotein
LDL:	Low-Density-Lipoprotein
LPL:	Lipoprotein-Lipase
NMRI:	Naval Medicine Research Institute
mRNA:	Boten-Ribonukleinsäure
PPS:	Phosphate-Buffered-Saline
rhM-CSF:	recombinant human Macrophage- Colonystimulating Factor
VLDL:	Very -Low-Density-Lipoprotein
wt:	Wildtyp (-RNA)

## **1. Einleitung**

1.1. Tumorassoziierte Hypocholesterinämie	8
1.2. Cholesterin	10
1.3. Die HMG-CoA Reduktase	11
1.4. Lipoproteine	12
1.5. Tumorassoziierter Verlust der negativen Rückkopplung	15
1.6. Mevalonat und Zellzyklus	15
1.7. Posttranslationelle Isoprenylierung	16
1.8. In-vivo-Hemmung der Zellteilung durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	17
1.9. Ziel der Arbeit	18

## **2. Material und Methoden**

2.1. Versuchsanordnungen	19
2.1.1. Dosisfindung	19
2.1.2. Versuch 1	20
2.1.3. Versuch 2	20
2.1.4. Versuch 3	21
2.2. Versuchsdurchführung	22
2.2.1. Eigenschaften der Tumorzellen	22
2.2.2. Versuchstiere	22
2.2.3. Zellkultur	23
2.2.3.1. Überführung des Tumorgewebes in die Zellkultur	23
2.2.3.2. Haltung und Züchtung der Tumorzellen in Zellkultur	23
2.2.4. Injektion und Transplantation von Tumorzellen und -gewebe	24
2.2.5. Antibiotische Prophylaxe	24
2.2.6. Bestimmung des Tumolvolumens	25
2.2.7. Tötung der Tiere und Explantation von Geweben	25
2.2.8. Materialien	26
2.2.8.1. Geräte	26
2.2.8.2. Verbrauchsmaterialien	26
2.2.8.3. Reagenzien	27
2.3. Histologische Weiterverarbeitung der Gewebe	28
2.3.1. Paraffineinbettung des formalin-fixierten Gewebes	28

2.3.2. Vorbereitung der paraffin-eingebetteten Schnitte zur Färbung	29
2.3.3. Färben der Schnitte	29
2.3.3.1. Hämalaun- Eosin	29
2.3.3.2. Kongorot-Färbung nach Puchtler	30
2.3.3.3. Perjodsäure-Schiff -Reaktion	30
2.3.4. Auswertung der histologischen Schnitte	31
2.3.5. Materialien	31
2.3.5.1. Geräte	31
2.3.5.2. Reagenzien	31
2.4. Weiterverarbeitung der Gewebe-RNA	32
2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	32
2.4.2. Fällung der RNA	33
2.4.3. Integritätskontrolle der RNA	34
2.4.4. Kompetitive, revers transkribierende Polymerase- Kettenreaktion	35
2.4.4.1. Prinzip	35
2.4.4.2. Reinigung der cRT-PCR Oligonukleotidprimer	35
2.4.4.3. Arbeitsablauf	36
2.4.4.4. Dokumentation	38
2.4.5. Materialien	39
2.4.5.1. Geräte	39
2.4.5.2. Verbrauchsmaterialien	40
2.4.5.3. Reagenzien	40
2.5. Bestimmung von Gesamt-Cholesterin in Leber- und Tumorgewebe und Serum	42
2.5.1. Materialien	43
2.5.1.1. Geräte	43
2.5.1.2. Reagenzien	43
2.6. Statistische Auswertung	44

### **3. Ergebnisse**

3.1. Dosisfindung	45
3.2. Versuch 1	45
3.2.1. Leukozytose	46
3.2.2. Tumorgroße und -gewicht	46
3.2.3. Tumormorphologie	46
3.2.4. Lebergewicht	46
3.2.5. Lebermorphologie	47
3.2.6. Serumcholesterin	47

3.3. Versuch 2	47
3.3.1. TumorgroÙe und -gewicht	47
3.3.2. Tumormorphologie	48
3.3.3. Lebergewicht	48
3.3.4. Lebermorphologie	48
3.3.5. Serumcholesterin	48
3.4. Versuch 3	48
3.4.1. Überlebensdauer	49
3.4.2. Integrität der mRNA	49
3.4.3. HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression im Tumorgewebe	49
3.4.4. Lebergewicht	50
3.4.5. Tumorcholesterin	50
3.4.6. Tumormorphologie	50
3.4.7. Lebercholesterin	50
3.4.8. Lebermorphologie	50
3.4.9. Serumcholesterin	51
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Tumorgewichte und Überlebenszeiten	76
4.2. HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression im Tumorgewebe	76
4.3. Cholesterin	78
4.4. Histologie	79
<b>5. Zusammenfassung</b>	81
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	82
<b>7. Danksagung</b>	88
<b>8. Lebenslauf</b>	89
<b>9. Erklärung</b>	90

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorassoziierte Hypocholesterinämie

Ein Zusammenhang zwischen Lipidstoffwechsel und Tumorerkrankungen wurde schon 1955 beim Vergleich von gesunden und solchen Frauen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom erkannt (Barclay et al., 1955). Letztere hatten signifikant erniedrigte Alpha-1-Lipoprotein-Werte im Serum. 1972 erweiterten Nydegger und Butler die Gruppe der involvierten Lipide um Phospholipide und Cholesterin, welche bei Krebserkrankungen verschiedenster Organsysteme gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe erniedrigt waren (Nydegger und Butler, 1972).

Es stellte sich nun die Frage, ob niedriges Cholesterin Folge oder Mit-Verursacher einer Krebserkrankung ist, zumal sich in epidemiologischen Studien -von denen die meisten den Zusammenhang zwischen Cholesterin und kardiovaskulären Erkrankungen untersuchten- zeigte, daß der Cholesterinspiegel schon vor der klinischen Manifestation einer malignen Erkrankung niedrig sein kann.

Diese Beobachtung wurde zuerst im Rahmen der Whitehall-Studie gemacht. In dieser Studie wurden bei 17.718 Männern im Alter von 40- 64 Jahren das Plasmacholesterin bestimmt und die krankheitsspezifische Mortalität über 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> (Rose und Shipley, 1980) bzw. 18 Jahre (Smith et al., 1992) beobachtet. Nach 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahren beobachteten sie eine J-förmige Relation zwischen der Gesamtsterblichkeit und dem Plasmacholesterinspiegel: In der Gruppe der Männer mit den niedrigsten Cholesterinspiegeln traten gehäuft Todesfälle auf. Dann sank das Risiko bei den mittleren Cholesterinspiegeln, um schließlich mit steigenden Cholesterinspiegeln wieder anzusteigen (Abbildung 1.1). Der Anstieg der Mortalität mit steigendem Plasmacholesterinspiegel war hauptsächlich auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen. Bei den Todesfällen in der Gruppe der niedrigsten Cholesterinspiegel (< 3,88 mmol/l) fiel auf, daß sie früh in der Studie auftraten und auf Krebs zurückzuführen waren. Schließt man die Todesfälle in den ersten Studienjahren - und somit die meisten Patienten, die bereits vor Studienbeginn an Krebs erkrankt waren- aus, verschwindet auch die Korrelation zwischen niedrigem Cholesterin und Krebs. Die Autoren schlossen hieraus, das niedriges Cholesterin nicht ein Risikofaktor, sondern Folge einer Krebserkrankung sei.

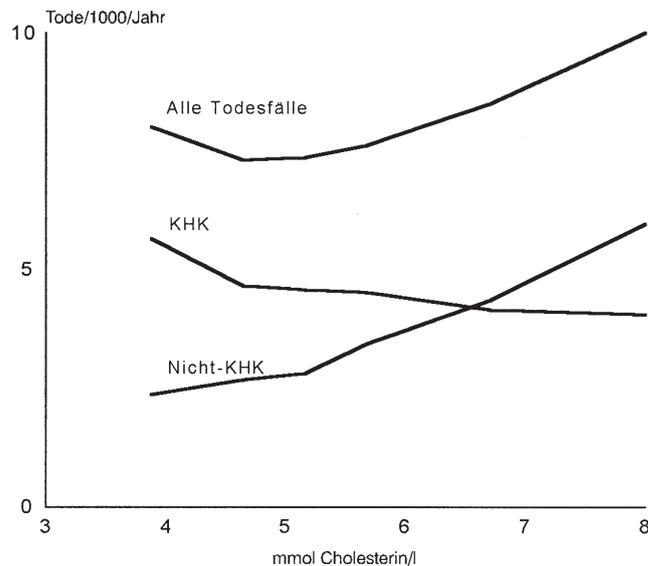


Abbildung 1.1: Beziehung zwischen dem Plasmacholesterinspiegel und der Sterblichkeit in der Whitehall-Studie (Aus Rose und Shipley, 1980; KHK: koronare Herzkrankheit)

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Metaanalyse, welche 11 Kohortenstudien aus Australien, Japan, den Vereinigten Staaten sowie fünf europäischen Ländern auswertete (International Collaborative Group, 1982). Ursprünglich hatten diese Studien verschiedene Zielsetzungen, wurden in diesem Rahmen jedoch auf den Zusammenhang zwischen Cholesterinspiegel und Krebsentstehung untersucht. Es zeigte sich, daß diejenigen Studienteilnehmer, die im jeweils ersten Studienjahr an Krebs starben, einen im Mittel um 24-35 mg/dl niedrigeren Cholesterinspiegel hatten als der Rest der Probanden. Nach 2-5 und 6-10 Jahren verringerte sich der Unterschied zum Rest der Teilnehmer um 5-6 beziehungsweise 2 mg/dl. Die inverse Relation zwischen Serumcholesterin und Lungenkrebs war im jeweils ersten Studienjahr deutlich, wohingegen es sich bei Colon-Karzinomen keine signifikante Korrelation ergab.

Das Phänomen der tumorassoziierten Hypocholesterinämie zeigt sich auch bei Probanden mit schon initial niedrigeren Cholesterinspiegeln: den Japanern, wo der mittlere Cholesterinspiegel bei Krebskranken im ersten Studienjahr um 8 mg/dl niedriger war als der Durchschnitt der japanischen Probanden, der bei nur 173 mg/dl lag (International Collaborative Group, 1982). Bei pathologisch erhöhten Cholesterinwerten, wie sie sich bei Typ IIa-Hypercholesterinämikern finden, wurde in einer retrospektiven Studie mit 3805 Patienten festgestellt, daß bei denjenigen, bei denen Krebs diagnostiziert wurde, das Serumcholesterin im Mittel 9,3 mg/dl niedriger war als erwartet (Kritchevsky et al., 1991).

In einer klinischen Untersuchung wurden 103 Krebspatienten bezüglich ihrer Gesamtcholesterin-, LDL- und HDL- Serumspiegel mit 100 Patienten, die an nicht neoplastischen Erkrankungen litten, verglichen (Alexopoulos et al., 1987). Das Gesamtcholesterin war in der Gruppe der Krebspatienten im Mittel 17 mg/dl, das LDL-Cholesterin um 16 mg/dl niedriger als in der Gruppe der nicht krebserkrankten. Daß der Cholesterinspiegel den klinischen Verlauf von bestimmten Leukämieformen widerspiegeln kann, zeigen zwei weitere Arbeiten: In der ersten wurden unter anderen 6 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie beobachtet. In der Blastenkrise hatten sie einen mittleren Gesamtcholesterinspiegel von  $111,5 \pm 47,9$  mg/dl, nach Remission der Krise stieg dieser auf  $162 \pm 61$  mg/dl an, die LDL-Cholesterinspiegel verhielten sich analog dazu (Budd und Ginsberg, 1986).

In der zweiten Arbeit wurden die Lipoprotein (a)- LDL- und HDL-Werte bei 22 Patienten mit akuter myeloblastischer Leukämie beobachtet. 10 von ihnen konnten durch Chemotherapie in die Remission gebracht werden. Bei neun dieser Patienten sank der Lipoprotein -(a)- Spiegel, verglichen mit dem zum Zeitpunkt der Diagnose, während LDL- und HDL- Cholesterin im selben Intervall anstiegen (Niendorf et al., 1992).

## 1.2 Cholesterin

Um nachvollziehen zu können, welche Mechanismen einer solchen tumor-assoziierten Hypocholesterinämie zugrundeliegen könnten, muß man sich den Cholesterinstoffwechsel des Menschen noch einmal vor Augen führen.

Cholesterin ist ein in allen mammalen Zellen ubiquitär vorkommendes Steroid, welches Membranbestandteil sowie Vorstufe für zahlreiche Hormone (Androgene, Östrogene, Gluco- und Mineralokortikoide), des Calciferols und der Gallensäuren ist. Obwohl theoretisch alle Körperzellen zur Cholesterinsynthese befähigt sind, entfällt der größte Teil der endogenen Produktion auf die Leber.

Cholesterin wird aus Acetyl-CoA aufgebaut. Zunächst kondensieren 3 Moleküle Acetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA. Nun wird dieses durch das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, der HMG-CoA-Reduktase, zu Mevalonat reduziert. Phosphorylierung sowie Abspaltung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O liefern die Isoprenvorstufe Isopentenylidiphosphat. Es folgt die Polymerisierung zu Farnesyl-Pyrophosphat. Zwei Moleküle Farnesyl-Pyrophosphat kondensieren zu Squalen,

dann erfolgt der Ringschluß zum Lanosterin, welches durch oxidative Entfernung der überzähligen Methylgruppen und Verlagerung bestimmter Doppelbindungen schließlich zu Cholesterin wird (Karlson, 1990).

Jede Körperzelle ist praktisch in der Lage, sich auf zwei Wegen mit Cholesterin zu versorgen: Entweder durch endogene Neusynthese aus Acetyl-CoA -das Schrittmacherenzym dieses Syntheseweges ist die HMG-CoA-Reduktase- oder durch rezeptorvermittelte Endozytose von LDL aus dem Blutstrom. Über die Endozytose wird in der Regel der Großteil des Cholesterinbedarfs der Zelle gedeckt (Brown und Goldstein, 1986).

### 1.3 Die HMG-CoA Reduktase

Das Enzym ist beim Menschen 888 Aminosäuren lang. Mit dem aminoterminalen Ende ist es an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden, welche sie siebenmal durchspannt. Dies ist insofern interessant, da diese aminoterminal Domäne für die Enzymfunktion keine Bedeutung hat (Goldstein und Brown, 1990). Wie das für die katalytische Aktivität verantwortliche karboxyterminale Ende ist es innerhalb der verschiedenen Spezies hochkonserviert (Trzaskos et al. 1989).

Die HMG-CoA Reduktase unterliegt einer vielschichtigen Regulation. Da ist zunächst die Ebene der Transkription. In der Promoterregion des Genes befindet sich ein Oktanukleotid, welches in der Anwesenheit von Steroiden in Verbindung mit bestimmten Molekülen als Genrepressor fungiert. Dies wurde am Beispiel des hydrophilen 25-Hydroxycholesterins untersucht. Dieses Steroid gelangt endozytose-unabhängig in die Zelle und in den Zellkern und vermag dort den HMG-CoA-Reduktase mRNA-Spiegel innerhalb von 6 Stunden um 40-70% zu senken. Da der Protein-Synthesehemmer Cycloheximid diesen Effekt des 25-Hydroxycholesterins aufhebt, kann man davon ausgehen, daß auch bis jetzt nicht identifizierte Proteine als Repressoren wirken (Trzaskos et al., 1989), bzw. daß sie die repressive Wirkung der Oxysterole vermitteln (Taylor et al., 1984).

Nichtsteroidale Zwischenprodukte aus Mevalonat führen auch zu einer negativen Rückkopplung der Enzymaktivität, allerdings auf post-transkriptioneller Ebene am Enzym selbst (Cohen et al., 1988, Ness et al., 1993). Schließlich wird auch die Degradation des Moleküls in

der Anwesenheit von Steroiden beschleunigt. Wenn man jedoch das membranständige, aminoternale Ende vom eigentlich katalytisch aktiven trennt, fällt dieser Rückkopplungsmechanismus weg (Goldstein und Brown, 1990; Luskey et al., 1985). Dies verdeutlicht, daß dieses aminoternale Ende zwar nicht für die Enzymfunktion, aber für die Enzymregulation mitverantwortlich ist.

Wenn man Zellen in vitro völlig Lipoprotein- (und damit Cholesterin-) defizienten Medien aussetzt, kann die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase dieser Zellen circa um das 200fache gesteigert werden. Dies geschieht auf drei Ebenen: Die Transkription kann bis um das 8fache gesteigert werden, die Translation der mRNA bis um das 5fache und die Degradation des Enzyms kann bis um das 5fache verlangsamt werden (Goldstein und Brown, 1990).

Wenn man andererseits das Kulturmedium mit Lipoproteinen sättigt und der Zelle somit ermöglicht, ihren Cholesterinbedarf vollständig durch exogene Zufuhr zu decken, bleibt eine Restaktivität der HMG-CoA-Reduktase bestehen. Diese dient der Herstellung der nicht-steroidalen Metaboliten des Mevalonates (Goldstein und Brown, 1990).

Zu diesen nicht-steroidalen Metaboliten werden verschiedene, biologisch wichtige Moleküle hergestellt: Aus Isopentenyl-Pyrophosphat wird Isopentenyl-Adenin, Bestandteil mancher Transfer-RNA, aus Farnesyl-Pyrophosphat werden u. a. Ubichinon und Haem A, welche für den Elektronen-Transport von Bedeutung sind, sowie Seitenketten für bestimmte Proteine (s.u.) (Brown und Goldstein, 1990; Abbildung 1.2).

#### 1.4 Lipoproteine

Cholesterin als hydrophobes Molekül wird im Blutstrom an Lipoproteine gebunden transportiert. Dies sind Partikel, welche aus Triglyceriden, Phospholipiden, Cholesterin, Cholesterinestern und sogenannten Apoproteinen bestehen. Den größten Cholesterinanteil weisen Lipoproteine geringer Dichte auf (LDL). Sie entstehen im Blutstrom aus Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) über Lipoproteine intermediärer Dichte via Abspaltung von Triacylglycerinen durch die in Kapillaren lokalisierte Lipoproteinlipase (Streeter, 1990; Abbildung 1.3).

Die LDL-Partikel können von allen Körperzellen rezeptorvermittelt aufgenommen werden. Der LDL-Rezeptor ist ein Glykoprotein von 839

Aminosäuren Länge (Yamamoto et al., 1984), das im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird. Die Rezeptoren gelangen zur Zelloberfläche, binden an das Apoprotein B100 des LDL-Partikels, „sammeln“ sich in sogenannten „coated pits“ und werden zusammen mit ihrem Ligand internalisiert. Durch Abfall des pH-Wertes unter 6,5 in diesem „Rezeptosom“ dissoziiert der Rezeptor von dem LDL-Partikel und kehrt zur Zelloberfläche zurück. Dieser Zyklus dauert circa 10 Minuten und wird vom Rezeptor unabhängig davon durchgeführt, ob er einen LDL-Partikel gebunden hat oder nicht (Brown und Goldstein, 1986).

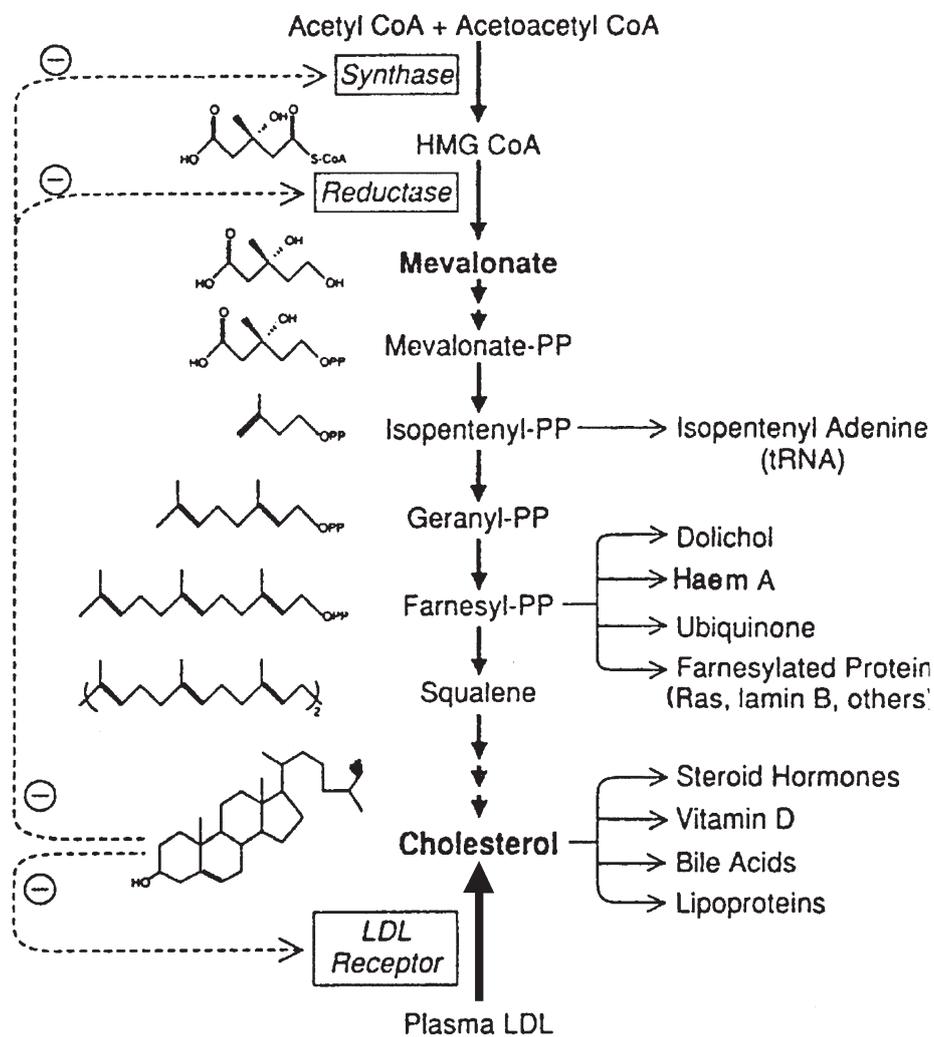


Abbildung 1.2: Syntheseweg des Cholesterins und der wichtigsten nichtsteroidalen Metaboliten des Mevalonates (aus Goldstein und Brown, 1990).

Der LDL-Rezeptor ist wie die HMG-CoA-Reduktase auf transkriptioneller Ebene reguliert. Ein sogenanntes „sterol regulatory Element“ (SRE) im 5' -Endbereich des Genes spielt hier eine wichtige Rolle. Wie bei der HMG-CoA-Reduktase verstärkt es die Transkription in der Abwesenheit von Steroiden (Goldstein und Brown, 1990).

Die HMG-CoA-Reduktase und der LDL-Rezeptor sind gleichsinnig reguliert: Bei Cholesterinmangel werden beide Moleküle verstärkt exprimiert bzw. bei Cholesterinüberschuß supprimiert (Brown und Goldstein, 1990, Powell und Kroon, 1994).

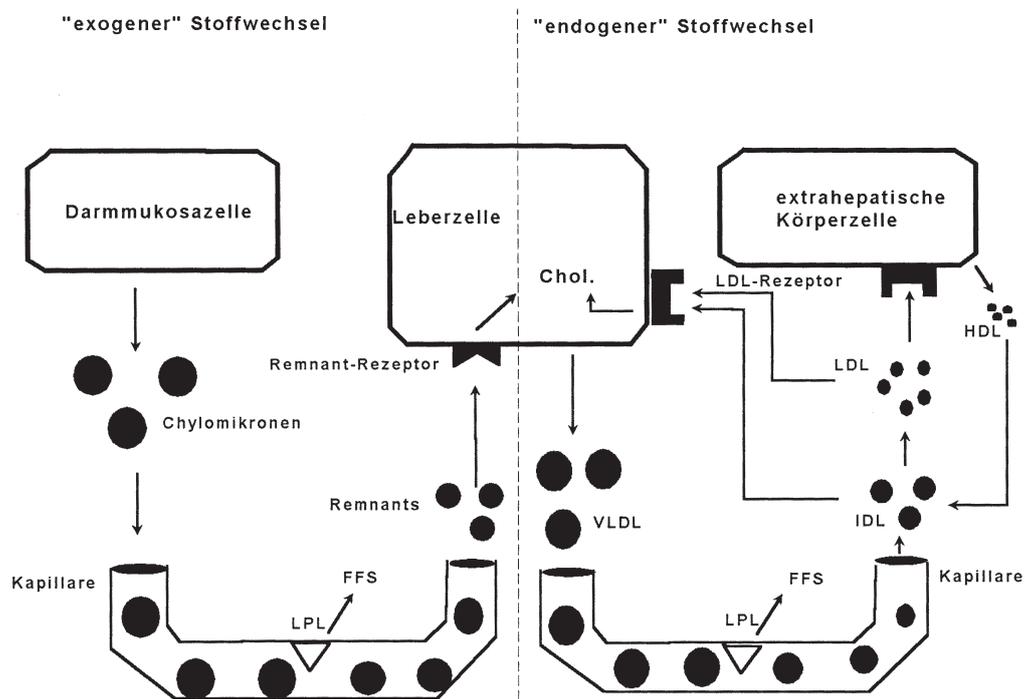


Abbildung 1.3: Übersicht über den Stoffwechsel des Cholesterins und der Lipoproteine beim Menschen.

Chol.: Cholesterin, FFS: freie Fettsäuren, HDL: high-density Lipoprotein, LDL: low-density Lipoprotein, LPL: Lipoprotein-Lipase (nach Brown und Goldstein, 1994)

## 1.5 Tumorassoziierter Verlust der negativen Rückkopplung

Die negative Rückkopplungs-Regulation der Cholesterinsynthese ist in bestimmten malignen Lebertumoren der Ratte, der Maus und des Menschen praktisch aufgehoben (Siperstein und Fagan, 1963). Ein Experiment zeigte den Mechanismus, der diesem Phänomen zugrundeliegt: Normalerweise wird die Aktivität des Schrittmacherenzymes der Cholesterinsynthese, die HMG-CoA-Reduktase, bei genügender exogener Cholesterinzufuhr auf eine geringe Restaktivität reduziert (s.u.). Dies war in malignem Lebergewebe nicht der Fall. Trotz suffizienter exogener Cholesterinzufuhr blieb die Aktivität der HMG-CoA Reduktase nahezu unverändert (Siperstein et al., 1971). Ob vielleicht dieser Verlust der negativen Rückkopplung der Entartung der Zelle vorausgeht, wurde an einem Mäusestamm mit einer hohen Inzidenz für spontane Hepatome untersucht. Es zeigte sich, daß der Rückkopplungsmechanismus in den Lebern dieser Tiere - solange sich dort kein bösartiger Tumor entwickelte - intakt war (Kandutsch und Hancock, 1971).

## 1.6 Mevalonat und Zellzyklus

Wie oben erwähnt, wird aus dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase -dem Mevalonat- nicht nur Cholesterin, sondern auch eine Reihe von nicht-steroidalen Molekülen.

1978 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die Hemmung der Mevalonatsynthese auch bei exogener Cholesterinzufuhr zur Hemmung des Zellwachstums führt. Daraus schloß man, daß Cholesterin und mindestens ein weiteres, nichtsteroidales Mevalonatprodukt -oder Mevalonat selbst- für den Zellzyklus von essentieller Bedeutung sind (Brown und Goldstein, 1980): Cholesterin wird in der frühen und mittleren G1-Phase zur Neusynthese von Membranen essentiell benötigt, jenes nichtsteroidale Produkt ist für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus unabdingbar. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß das Mevalonatprodukt Isopentenyl-Adenin eine 100-200mal stärkere Potenz hat, die DNA-Replikation wieder in Gang zu setzen als Mevalonat selbst (Quesney-Huneus et al., 1983). Dies legt nahe, daß jenes für den Zellzyklus essentielle Molekül jenseits von Isopentenyl-Diphosphat im Cholesterin-Syntheseweg entsteht.

## 1.7 Posttranslationelle Isoprenylierung

Schmidt et al. (1984) haben in einem Experiment die endogene Mevalonatsynthese durch einen kompetitiven Hemmer der HMG-CoA-Reduktase blockiert und radioaktives Mevalonat exogen zugeführt. Dieses radioaktive Material wurde nicht zum größten Teil zu Cholesterin, sondern wurde zu 40-50% in Moleküle eingebaut, welche sich als lipidunlöslich erwiesen. Diese Moleküle verhielten sich in weiteren Analysen wie Protein. In der Elektrophorese wurde es schließlich als ein Proteingemisch mit Molekulargewichten von 13.000 bis 58.000 Dalton identifiziert.

Da auch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid den Einbau von radioaktiv markiertem Mevalonat in die Proteinfraction nicht verhinderte, ließ dies den Schluß zu, daß dieser Einbau nicht während der Proteinsynthese geschah, sondern eine posttranslationelle Modifikation darstellt.

In der Folgezeit wurden einige Proteine identifiziert, welche durch Mevalonatderivate modifiziert werden: Lamin B und Prolamin A, Strukturproteine der Kernmembran (Wolda und Glomset, 1988), die Gamma-Untereinheit des Transducins (Lai et al., 1990) sowie Ras-Proteine (Hancock et al., 1989), welche eine wichtige Rolle in der Zellvermehrung spielen, und auf die deswegen später näher eingegangen werden soll.

Massenspektroskopische Untersuchungen identifizierten jenes Mevalonatderivat als Farnesylpyrophosphat (Farnsworth et al, 1989; Maltese, 1990). Der Sinn dieser als „Isoprenylierung“ bezeichneten Bindung zwischen Protein und Farnesylpyrophosphat besteht darin, den hydrophilen Proteinen eine hydrophobe Seitenkette anzugliedern, welche die Bindung an Membranstrukturen erlaubt. Die daraus resultierende Lokalisation an der Zellmembran ist für die Funktion der Proteine erforderlich.

Alle Ras-Proteine sowie das Lamin B haben am karboxyterminalen Ende ihrer Peptidkette folgendes Sequenzmuster: Cystein- Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette (abgekürzt Ali), eine weitere aliphatische und ganz zum Schluß eine beliebige Aminosäure (abgekürzt Xaa). Dieses Cys-Ali-Ali-Xaa- Muster ist für die posttranslationelle Isoprenylierung entscheidend. Die drei terminalen Aminosäuren werden abgetrennt und die Farnesyl-Seitenkette mittels einer Thioether-Verbindung an das Cystein geknüpft. Substituiert man dieses Cystein,

beispielsweise durch Serin, findet die Isoprenylierung nicht statt, was für Ras-Proteine bedeutet, daß die sonst durch das hydrophobe Farnesylpyrophosphat bewirkte Assoziation zur Zellmembran nicht stattfinden kann (Hancock et al., 1989).

Ras-Proteine könnten im Zusammenhang mit der tumorassoziierten Hypocholesterinämie eine wichtige Rolle spielen. Es handelt sich bei ihnen um Proteine von relativ niedrigem Molekulargewicht (18.000 bis 25.000 Dalton) mit einer hohen Affinität zu GTP und GDP. Sie funktionieren als biologische „Schalter“: Gebunden an GDP sind sie inaktiviert, gebunden an GTP aktiviert. Ras Proteine haben sich in bestimmten Zellen als unabdingbar für die Initiierung der DNA-Synthese, und somit der Zellvermehrung erwiesen. Mutationen, welche die GDP-Dissoziation oder die GTP-Hydrolyse des Proteins beeinflussen, können eine dauerhafte Aktivierung verursachen, welche unkontrolliertem Zellwachstum vorschub leistet (Haubruck und McCormick, 1991). Mutationen von Ras-Genen kommen in einer Reihe von malignen Tumoren vor (Khosravi-Far et al., 1992).

In Experimenten mit Zellen, deren Ras-Mutationen nicht isoprenyliert sondern mevalonat-unabhängig myristyliert werden, konnte allerdings gezeigt werden, daß ihr Wachstum durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Lovastatin genauso inhibiert wurde wie das von Zellen deren Ras-Proteine Mevalonat abhängig waren (DeClue et al., 1991).

### 1.8 In-vivo-Hemmung der Zellteilung durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmer

Es konnte gezeigt werden, daß HMG-CoA-Reduktasehemmer Zellwachstum in vitro hemmen. Nun wurde dieses Phänomen auch an einigen Tiermodellen in vivo bestätigt: Nach Behandlung von neuroblastom-tragenden Mäusen mit Mevilonin wurde das Wachstum der Tumoren signifikant unterdrückt (Maltese et al., 1985). Ein Adenokarzinom des Pankreas wurde auf Nacktmäuse transplantiert. Diese erhielten sieben Tage lang über eine implantierte Pumpe 50 µg Lovastatin pro Stunde beziehungsweise Placebo. Das Tumorstadium der mit Lovastatin behandelten Tiere war signifikant verlangsamt (Sumi et al., 1992). Bei AH-130-hepatomtragenden Ratten zeigte eine Dosis von 8mg/Kg Körpergewicht Pravastatin eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber einer Kontrollgruppe. Außerdem wurde das Tumorstadium in der mit Pravastatin behandelten Gruppe signifikant verkleinert (Kawata et al., 1992).

Pravastatin (CS-514), ein HMG-CoA-Reduktasehemmer der neueren Generation, unterscheidet sich gegenüber den anderen, insbesondere Compactin, Lovastatin und Simvastatin durch seine hohe Leberspezifität. Im Gegensatz zu den anderen HMG-CoA-Reduktasehemmern wirkt Pravastatin bevorzugt in Ileum und Leber, wo die Cholesterinsynthese um circa 90% verringert wurde. In Nieren, Nebennieren, Hoden, Milz, Prostata und Gehirn betrug die Inhibition jedoch weniger als 14%. Dies könnte auf die verminderte Aufnahme von Pravastatin in nichthepatische Körperzellen zurück zu führen sein (Koga et al., 1990). Pravastatin hat eine hohe Affinität zum sogenannten multispezifischen Anionentransporter, einem natriumunabhängigen Rezeptorsystem, welches normalerweise der Aufnahme von Gallensäuren in die Leberzelle dient. Dies erklärt die hohe Leberspezifität des Pravastatins (Yamazaki et al., 1993).

### 1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob HMG-CoA Reduktasehemmer einen zytostatischen Effekt gegenüber den verwendeten humanen Tumorzellen im Tiermodell haben. Daneben sollte untersucht werden, wie die hochdosierte Gabe von HMG-CoA-Reduktasehemmern sich auf die Expression des Schrittmacherenzymes der Cholesterinsynthese und den Cholesteringehalt verschiedener Gewebe auswirkt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsanordnungen

Alle Tiere wurden von der Tierpflegerin und Medizinisch-Technischen-Assistentin Frau Nina Ludwig betreut.

In den Versuchen 1 bis 3 sollte beobachtet werden, wie sich die Blockade der zellulären Cholesterinsynthese auf das Tumorstadium auswirkt. Dazu sollte den Tieren Pravastatin appliziert werden, ein kompetitiver Hemmstoff der HMG-CoA-Reduktase. Dies ist das Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese.

Um herauszufinden, welche Höchstdosis an Pravastatin die Tiere noch tolerieren, wurde ein Dosisfindungs-Versuch durchgeführt.

#### 2.1.1 Dosisfindung

Zu diesem Versuch wurden 20 ca. vier Wochen alte NMRI-Nu/Nu-Mäuse eingesetzt. Sie erhielten vor Versuchsbeginn drei Tage lang Chloramphenicol (s.u.) ins Trinkwasser, um sie vor bakteriellen Infektionen zu schützen. Dann wurden sie in fünf Gruppen mit je 4 Tieren aufgeteilt, die jeweils verschiedene Dosen Pravastatin erhielten:

Gruppe	Pravastatin pro kg Körpergewicht
1.	500 mg
2.	1000 mg
3 a)	3000 mg
3 b)	2000 mg
4.	1500 mg

Die Gruppen 3 b) und 4 wurden erst später gebildet, nachdem sich zeigte, daß 3000 mg/kg KG Pravastatin viel zu hoch dosiert war (s.u.).

Das Medikament wurde täglich (fünf Tage pro Woche) vier Wochen (Gruppe 4 nur drei Wochen) lang intraperitoneal gespritzt.

Es wurden verschiedene Verdünnungen angesetzt: Die Gruppen 1, 2 und 3 a) erhielten in den ersten beiden Versuchswochen 40

mg/ml (Gruppe 3a nur einmalig, da alle Tiere nach der ersten Injektion verstarben), dann 120 mg/ml. Die Gruppen 3 b) und 4 erhielten von Anfang an 120 mg/ml.

Lösungsmittel war in den Versuchswochen 1-3 0,9% Natriumchlorid-lösung mit einem pH von 8,2, in der letzten Woche Aqua ad injectabilia mit einem pH von 7,4.

### 2.1.2 Versuch 1

Zu diesem Versuch wurden 30 ca. vier Wochen alten NMRI-Nu/Nu-Mäusen Tumorzellen der Linie 160/91, 13. Passage in Zellkultur, subcutan in die Leistenbeuge injiziert. Rechts wurden 1.000.000 Zellen in 200 µl Lösung, links 750.000 Zellen in 150 µl Volumen appliziert. Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Menge an Zellen in vitro angezüchtet, die Dichte mit der Zählkammer unter dem Phasenkontrast-Invert-Mikroskop bestimmt und die oben angegebene Menge injiziert, die aus der Zelldichte resultierte.

Unmittelbar danach wurden die Tiere zufällig in zwei Gruppen mit je 15 Tieren aufgeteilt: Die Mäuse der Behandlungsgruppe erhielt 1000 mg Pravastatin pro kg Körpergewicht in einer Lösung von 80 mg pro ml isotoner NaCl intraperitoneal injiziert, die der Kontrollgruppe zugeordneten Mäuse bekamen 200 µl isotope NaCl-Lösung auf dem gleichen Weg appliziert. Diese Injektionen wurden täglich (fünf Tage pro Woche) acht Wochen lang wiederholt.

Wöchentlich wurden die Tiere gewogen und die Tumorumfänge bestimmt (s.u.).

Nach acht Wochen wurden die noch verbliebenen Tiere getötet (s.u.) und ihre Leber, Milz sowie die Tumoren entnommen und gewogen. Von allen Geweben wurde Material in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 Celsius gelagert. Darüberhinaus wurden von allen Geweben auch Teile in gepuffertem Formalin zur späteren histologischen Aufarbeitung eingelegt (siehe unten).

### 2.1.3 Versuch 2

In diesem Versuch wurde den Tieren im Gegensatz zu Versuch 1 ein Stück solider Tumor implantiert.

Zunächst wurden analog zu Versuch 1 Mäusen Tumorzellen subcutan gespritzt. Diese ließ man einige Wochen anwachsen, dann wurde der Tumor unter sterilen Bedingungen unter einer Bench explantiert, geteilt und erneut auf Mäuse retransplantiert. Diese Prozedur wurde insgesamt viermal (vier Passagen) wiederholt, so daß genug Material für 30 Tiere zur Verfügung stand. Nun wurde jedem Versuchstier ein ca 30 cmm großes Stück Tumor in jede Leistenbeuge implantiert. Diese ließ man 10 Tage lang anwachsen. Die ersten acht Tage nach der Transplantation erhielten alle Tiere als antibiotischen Schutz Chloramphenicol (s.u.) ins Trinkwasser. Nach 10 Tagen wurden die Tiere derart in zwei Gruppen geteilt, daß in jeder Gruppe das mittlere Tumolvolumen (Bestimmung siehe 2.2.6) ungefähr gleich war.

Eine Gruppe erhielt 1000 mg Pravastatin pro kg Körpergewicht (80 mg/ml isotoner NaCl-Lösung), die andere nur 200 µl isotonische NaCl-Lösung intraperitoneal gespritzt. Wie in Versuch 1 geschah dies täglich, fünf Tage pro Woche. Nach 40 Tagen wurde der Versuch beendet, weil zu diesem Zeitpunkt schon sechs Kontrolltiere getötet werden mußten, weil zumindest einer ihrer Tumoren eine für das Tier nicht mehr tolerable Größe (mehr als 2500 cmm) erreicht hatte.

Analog zu Versuch 1 wurden wöchentlich das Mausgewicht und die Tumorumfänge bestimmt. Auch wurden die Tierkadaver genauso aufgearbeitet wie in Versuch 1.

#### 2.1.4 Versuch 3

Da sich das Tumolvolumen nach einem festgelegten Zeitraum als Zielgröße nicht optimal eignete da zu viele Tiere vor dem als Versuchsende festgelegten Zeitpunkt getötet werden mußten, wurde in diesem Versuch die Überlebenszeit als Zielgröße beobachtet. Die Überlebenszeit wurde als die Zeit definiert, die von dem ersten Behandlungstag bis zu dem Zeitpunkt verging, an dem einer der Tumoren eines Tieres eine Größe von 2500 cmm erreicht hatte. Dieses Volumen hatte sich nach der Erfahrung aus den Versuchen 1 und 2 als gerade noch tolerabel für die Versuchstiere herausgestellt.

Die Tumorimplantation, Randomisierung und Behandlung der Tiere ist mit der in Versuch 2 bis auf folgende Punkte identisch: Der auf die Versuchstiere transplantierte Tumor war zuvor zehn anstatt vier Passagen auf der Maus vermehrt worden, es wurden nur 13 Tiere pro Gruppe eingesetzt, es wurde keine antibiotische Behandlung unter-

nommen und es wurde jeweils ein nur ca 20 cmm großes Stück Tumor implantiert, um eine längere Versuchsdauer zu ermöglichen.

55 Tage nach Behandlungsbeginn wurden die letzten Tiere getötet. Wie in Versuch 1 und 2 wurden Lebern und Tumoren post mortem unter sterilen Bedingungen explantiert und gewogen. Die Lebern sowie die in der rechten Leistenbeuge angewachsenen Tumoren wurden geteilt: ein Teil wurde in gepuffertem Formalin zur histologischen Aufarbeitung eingelegt, der andere in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °Celsius gelagert.

## 2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.1 Eigenschaften der Tumorzellen

Die Zellen der Linie 160/91 entstammen einem Operationsresektat eines niedrig differenzierten, vorwiegend soliden Adenokarzinoms der Lunge eines bei Operation 45jährigen, männlichen Patienten, welche in Vitro kultiviert wurden. Das Serumcholesterin des Patienten betrug unmittelbar vor der Operation 110 mg/dl.

### 2.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche, thymusaplastische NMRI-Nu/Nu-Mäuse aus der Eigenzucht der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE), Leitung Dr. Dimigen, eingesetzt. Bei diesen Nacktmäusen handelt es sich um einen Auszuchtstamm, der sich gegenüber Inzuchtstämmen durch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit auszeichnet.

Da die verwendete Tumorzelllinie Geschlechtshormon-unabhängig ist, wurden ausschließlich weibliche Tiere in den Versuchen eingesetzt, da diese zu mehreren in einem Käfig gehalten werden können, ohne sich gegenseitig anzugreifen oder gar zu verletzen wie es bei Mausböcken der Fall gewesen wäre. So konnten zehn Tiere zusammen in einem Käfig gehalten werden, was aus tierpflegerischer Sicht eine große Arbeitserleichterung darstellt.

Die Versuchs- und Haltungsräume sind von den übrigen Tierhäusern durch Barrieren abgetrennt. Das Autoklavieren gesamter Käfigein-

heiten inklusive Streu und der Einsatz von sterilem Hochleistungsfutter gewährleisten pathogen-limitierende Bedingungen. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten, welche in Laminar-Flow-Gestellen untergebracht waren. Die Luftfeuchtigkeit betrug durchschnittlich 65% und die Raumtemperatur lag zwischen 24 und 26 °C. Futter und Trinkwasser wurden den Tieren ad libitum zugeführt.

### 2.2.3 Zellkultur

Die Zellkulturen wurden von der Medizinisch-Technischen-Assistentin Frau Daisy Gerding betreut. Alle Reagenzien und Geräte waren steril.

#### 2.2.3.1 Überführung des Tumorgewebes in die Zellkultur

Das steril gewonnene Tumorsektat wurde in PBS aufgenommen, zweimal mit selbigem gespült und dann in eine Petrischale überführt. Nun wurde das Gewebstück mit Trypsin überschichtet und mit zwei Skalpellenspitzen so lange zerteilt, bis die Stückchen mit einer 10ml-Pipette aufsaugbar waren. Der so entstandene Gewebepbrei wurde solange im Inkubator belassen, bis unter dem Mikroskop eine gewisse Desintegration des Zellverbandes erkennbar war. Nun wurden die inzwischen aufgequollenen Gewebstückchen erneut mit Skalpellenspitzen zerkleinert, der Überstand abpipettiert und frisches Trypsin zugegeben. Die nachfolgende Inkubation währte solange, bis aus den Gewebstückchen keine Zellen mehr herauslösbar waren.

Der so gewonnene Überstand wurde mit ca. 10 ml frischem Medium vermischt und bei 1000 U/Min 5 Minuten lang zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, wiederholte man diesen Vorgang 1-2 mal. Zum Schluß wurde das Sediment in eine Zellkulturflasche überführt, mit ca. 15 ml Medium überschichtet und in den Inkubator verbracht.

#### 2.2.3.2 Haltung und Züchtung der Tumorzellen in Zellkultur

Die Zelllinie 160/91 wurde in Zellkulturflaschen, in circa 20 ml angereichertem L-15 Medium gehalten und im Inkubator bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Beimischung aufbewahrt. Circa zweimal in der Woche wurden die Flaschen unter dem Phasenkontrastmikroskop hinsichtlich Ausdehnung des Zellrasens und eventueller Kontamination begutachtet.

Wenn der Flaschenboden vollständig mit Zellen bedeckt war, wurde auf einer Werkbank das Medium abgegossen. Nach Spülung mit circa 10 ml PBS wurden 5 ml Trypsin zugesetzt. Nun kamen die Zellkulturflaschen für 15-20 Minuten zurück in den Inkubator. Nachdem sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten (mikroskopische Kontrolle), wurde der Inhalt entweder zu zwei Dritteln verworfen oder auf zwei weitere Zellkulturflaschen verteilt und mit 20 ml angereichertem L-15 Medium überschichtet. Am nächsten Tag wurde die Zellhaftung am Flaschenboden mikroskopisch kontrolliert.

#### 2.2.4 Injektion und Transplantation von Tumorzellen und -gewebe

Zunächst wurde den Tieren zur Betäubung 0,01 ml pro g Körpergewicht folgender Mischung intraperitoneal appliziert:

2,4 ml Ketanest  
0,8 ml Rompun  
6,8 ml Natriumchlorid, 0,9%

Dann wurden die Tiere in eine Bench gelegt, so daß unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden konnte.

Für die Tumorzell-Injektion wurde die Haut der Tiere mit einer Pinzette gefasst, angehoben und die vorbereitete Spritze (siehe 2.1.2) jeweils in die linke bzw. rechte Leistenbeuge injiziert.

Zur Tumorzell-Transplantation wurde das Spendertier getötet (s.u.) und der Tumor unter der Bench explantiert und auf eine mit 0,9%iger NaCl-Lösung benetzter Petrischale verbracht und dort mit Hilfe einer Pinzette und eines chirurgischen Skalpell in circa 20 ccm bzw. 30 cmm große Stücke zerteilt. Nun wurde das Empfängertier betäubt (s.o.) und ebenfalls unter der Bench wurde mit einer Schere die Haut über der Wirbelsäule circa 1 cm lang aufgeschnitten. Durch diesen Schnitt wurden die vorbereiteten Tumorfragmente mit einer Pinzette in die Leistenbeuge vorgeschoben. Danach wurde der Hautschnitt mit resorbierbarem, chirurgischen Nahtmaterial durch 2-3 Einzelknopfnähte verschlossen.

#### 2.2.5 Antibiotische Prophylaxe

Die absolute Notwendigkeit einer antibiotischen Prophylaxe ist bei Versuchen dieser Art mit NMRI-Nu/Nu-Mäusen nicht gegeben. Trotz-

dem wurde sie im Dosisfindungsversuch vor Versuchsbeginn drei Tage lang und in Versuch 2 für acht Tage nach der Transplantation durchgeführt.

Dazu wurde dem Trinkwasser der Tiere 1g Chloramphenicol pro Liter zugegeben.

#### 2.2.6 Bestimmung des Tumorumens

Die Tumorumina wurden auf folgende Weise bestimmt: Der Tumor wurde durch die Haut des Tieres mit einer Schublehre in zwei Achsen, welche im Winkel von 90 Grad zueinander stehen, gefaßt. Die kurze Achse wurde als Breite, die lange als Länge des Tumors definiert. Aus diesen beiden Werten wurde mit Hilfe der Formel für das Rotationsellipsoid:

$$(\text{Breite}^2 + \text{Länge})/2$$

das ungefähre Volumen des Tumors errechnet.

#### 2.2.7 Tötung der Tiere und Explantation von Geweben

Zur Tötung wurden die Tiere in einen Behälter gesetzt, der zuvor mit 100%igem Kohlendioxyd-Gas geflutet wurde. Innerhalb von circa 30 Sekunden sind die Tiere verstorben. Dann wurden die Kadaver unter die Bench verbracht, wo mit einem Schnitt von ventral Thorax und Abdomen eröffnet wurden. Nun wurden die inneren Organe entnommen und in 4 prozentiges, gepuffertes Formalin zur späteren histologischen Aufarbeitung fixiert. Von den Milzen, den Lebern sowie dem Tumor aus der rechten Leistenbeuge wurde zusätzlich ein Stück in flüssigen Stickstoff eingetaucht und danach jeweils in 2ml-Reaktionsgefäße verbracht. Diese wurden in einem Gefrierschrank bei -80 Celsius aufbewahrt.

Zur Blutentnahme intra vitam wurde mit Hilfe einer Glaskapillare peribulbär in die Orbita des Tieres gestochen und so Blut angesogen.

## 2.2.8 Materialien

### 2.2.8.1 Geräte

Makrolonkäfige: Fa. Ehret

Luftbefeuchter: Fa. Weiss, Lindenstroth

Inkubator: IR 1500, Flow Laboratories, Meckenheim

Mikroskop: Axiovert 35M, Fa. Zeiss

Zentrifuge: Rotanda RP, Fa. Hettich, Tuttlingen

Werkbank: Bench BSB 4A „Gelaire“, Fa. Flow Laboratories, Meckenheim

Schublehre: „Tajima“, Nr. 6950, Fa. Royal

Gefrierschrank: Modell Nr. IUF 8513 V-O-D, Fa. Romulus Holding Company, New York, Vereinigte Staaten

Destillator: Bi-dest 2108, Fa. GFL

Autoklav: Pavie Fedegari NF 1003 PV 174014 ATE 2, Italia

pH-Meter: CG-811, Fa. Schott Geräte

### 2.2.8.2 Verbrauchsmaterialien

Nahtmaterial: Vicryl, 3\*0, Fa. Ethicon, Norderstedt

Petrischalen: Fa. Greiner Labortechnik

Skalpelle: Fa. Bayha

10-Pipetten: Falcon Nr. 7551, Fa. Becton Dickinson, England

25ml-Pipetten: Falcon Nr. 7525, Fa. Becton Dickinson, England

Automatische Pipettierhilfe: Pipetus-Akku, Flow Laboratories

Zellkulturflaschen: 75 cm<sup>3</sup> , Falcon 3024, Fa. Becton Dickinson, England

2ml Reaktionsgefäße: Safe Lock, Nr. 0030 120.094, Fa. Eppendorf

### 2.2.8.3 Reagenzien

Pravastatin: Fa. Bristol Myers Squibb

Hochleistungsfutter: Nr. 1314, Fa. Altromin, Lage

Phosphate Buffered Saline (PBS): PBS-Dulbecco, Seromed Nr. L 1825, Fa. Biochrom

Trypsin: Trypsin-EDTA, Nr. 1074474, Fa. Boehringer Mannheim  
1:10 mit PBS verdünnt.

#### Medium:

500 ml L-15 Medium (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 209 848)  
50 ml foetales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco, Nr. 011-06290 M)  
7,5 ml Natriumbicarbonat 7,5% (Fa. Gibco, Nr. 043-05080H )  
5 ml MEM Vitamine 100X ( Fa. Seromed K 0373)  
5 ml L-Glutamin (Fa. Seromed, Nr. K 0282)

#### 0,5 ml Transferrin/ Fetuin:

100 mg Transferrin eisengesättigt, 30mg/ml (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 652 202) lösen in 5 ml sterilem Aqua bidest. und  
Fetuin 250 mg (Fa. Sigma, Nr. F 6131) ebenfalls in 5 ml sterilem Aqua bidest. lösen  
mit 30 ml Phosphate-Buffered Saline (PBS-Dulbecco, Seromed Nr. L1825) mischen. In Aliquots bei -20 °C einfrieren.

0,5 ml Gentamycin, 10mg/ml in sterilem Aqua bidest. (Fa. Gibco, Nr. 043-05750 H)

#### 1 ml Insulin aus folgender Stammlösung:

100 mg Insulin ( Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1376497)  
lösen in 10 ml sterilem Aqua bidest., aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.  
1 ml Glucose 50% (Fa. Pharma Hameln).

100 ml des fertigen Mediums werden zur Überprüfung auf Kontamination einige Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Ketanest: Ketaminhydrochlorid, 50mg/ml, Fa. Parke-Davis, Freiburg

Rompun: Xylazin, 20mg/ml, Fa. Bayer, Leverkusen

Chloramphenicol: Chloromycetin Suspension ad usum veterinarium, Fa. Parke-Davis, Freiburg

4% gepuffertes Formalin:

40 ml Formalin (Formaldehyd 37%, Säurefrei; Fa. Merck, Nr. 3999) wurde mit 320 ml Phosphatpuffer nach Sørensen vermischt. Dieser Puffer besteht aus

3,029 g Natriumhydrogenphosphat-1-Hydrat (Fa. Merck, Nr. 6346) und

14,1365 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat (Fa. Merck, Nr. 6580) ad 1 Liter mit

Aqua bidest. eingestellt auf pH 7,4.

## 2.3 Histologische Weiterverarbeitung der Gewebe

Die histologischen Präparate wurden von den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Constanze von Bonin von Ostau und Frau Nina Ludwig geschnitten und gefärbt.

### 2.3.1 Paraffineinbettung des formalin-fixierten Gewebes

Die Entwässerung formalin-fixierten Gewebes in aufsteigender Alkoholreihe mit anschließender Paraffindurchtränkung erfolgten im Autotechnicon nach folgendem Schema:

2 mal 1 Stunde	80% Äthanol
2 mal 1 Stunde	96% Äthanol

2 mal 1 Stunde	100% Äthanol
2 mal 1 Stunde	Aceton
2 mal 1 Stunde	Xylol

Danach wurden die Präparate zweimal bei 56 °Celsius in Paraffin eingetaucht, einmal für eine Stunde, dann für sechs Stunden. Zum Schluß wurden die Präparate in Einbettungsrahmen mit Paraffin ausgegossen.

### 2.3.2 Vorbereitung der paraffin-eingebetteten Schnitte zur Färbung.

Mit dem Mikrotom wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte gefertigt. Diese ließ man in ein warmes Wasserbad gleiten aus dem sie auf Objektträger aufgezogen und anschließend für 12 Stunden bei 60 Grad Celsius getrocknet wurden. Vor der Färbung wurde das Gewebe in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert:

2 mal 5 Minuten	Xylol
2 mal 5 Minuten	100% Äthanol
2 mal 5 Minuten	96% Äthanol
2 mal 5 Minuten	80% Äthanol
1 mal 5 Minuten	in Aqua bidest. gut spülen

### 2.3.3 Färben der Schnitte

#### 2.3.3.1 Hämalaun- Eosin

Bei dieser Färbung stellen sich Zellkerne, Kalk, saurer Schleim und grampositive Bakterien blau dar, alles andere erscheint in verschiedenen Tonabstufungen rot.

Zuerst werden die Schnitte zur Kernfärbung in Mayer's Hämalaun für 3-8 Minuten eingestellt. Nach Abspülen in Aqua dest. werden sie für 10 Minuten unter Leitungswasser gebläut. Dann werden die Schnitte 5-15 Minuten in Eosin gefärbt. Es sollte eine mäßige Überfärbung erreicht werden. Es folgt die Differenzierung in 80% Äthanol, die Spülung in 96% Äthanol für 2x2 Minuten sowie das Einstellen der Schnitte in Xylol für 5 Minuten. Zum Schluß werden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

### 2.3.3.2 Kongorot-Färbung nach Puchtler

Im Hämalaun-Eosin-gefärbten Schnitt zeigten sich in den Lebern der Versuchstiere homogene, blaßrote Ablagerungen in den Sinusoiden. Zur Abklärung der Art dieser Ablagerungen wurde exemplarisch von einem Schnitt eine Kongorot-Färbung hergestellt. Bei dieser Färbung erscheint Amyloid rot, Hyalin und Kolloid bleiben ungefärbt. Durch die gerichtete Einlagerung der Farbmoleküle kann man am Polarisationsmikroskop in amyloidhaltigen Arealen einen Dichroismus beobachten, sofern die Schnitte dünner als 10 µm sind.

Zuerst wurden die Kerne mit Hämalaun für 5 Minuten angefärbt. Dann wurden die Schnitte in Aqua dest. abgespült und 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Nun folgte die Vorbehandlung der Schnitte in alkalischer NaCl-Lösung. Diese Lösung wird aus 1%iger Natronlauge und 100 ml mit NaCl gesättigter, 80%iger Äthanollösung hergestellt. Sie wurde immer frisch zubereitet. Die Schnitte verbleiben für 20 Minuten in dieser Lösung. Dann wurden sie für 50 Minuten in frisch zubereiteter Kongorotlösung (s.u.) gefärbt. Zum Schluß folgte die Entwässerung in drei Portionen (80, 96 und 100%) Alkohol, abschließend in Xylol, bevor die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt wurden.

### 2.3.3.3 Perjodsäure-Schiff –Reaktion

Mit Perjodsäure-Schiff-Reagens werden glykogenhaltige Bestandteile der Zellen rot angefärbt. Danach erfolgt eine Kernfärbung mit Hämalaun.

Zunächst werden die Schnitte für 10 Minuten in 1 prozentiger Perjodsäure eingestellt. Danach werden sie zunächst unter Leitungswasser und dann zweimal in Aqua dest. gespült. Nun werden die Präparate 10 Minuten in Schiff'sches Reagens eingelegt und danach in einer Natrium-Disulfid-Waschlösung vierzigmal geschwenkt. Es folgt die ausgiebige Spülung unter Leitungswasser und Aqua dest.. Schließlich werden die Schnitte 10 Minuten in Hämalaun gefärbt und weitere 10 Minuten unter Leitungswasser gebläut.

Die Entwässerung und Eindeckelung der Schnitte erfolgt dann wie oben beschrieben.

### 2.3.4 Auswertung der histologischen Schnitte

An den histologischen Schnitten wurden folgende Parameter bestimmt:

Der Flächenanteil noch vitalen Tumorgewebes am Gesamt-Flächenanteil des Tumorschnittes wurde in drei Abstufungen nach Augenmaß geschätzt: Mehr als zwei Drittel, ein bis zwei Drittel und weniger als ein Drittel des Gesamt-Flächenanteiles des Tumorschnittes.

Die Quantität der extramedullären Blutbildung in der Leber wurde ebenfalls in drei Abstufungen nach Augenmaß geschätzt: geringgradige Ausprägung, mittelgradige und starke Ausprägung.

Auch die Quantität der homogenen, blaßroten Ablagerungen in der Leber (Amylodoid) wurde in drei Abstufungen nach Augenmaß geschätzt: kein Amylodoid vorhanden oder geringe Menge von Amylodoidablagerungen, mittelgradige Menge und große Menge von Amylodoidablagerungen.

### 2.3.5 Materialien

#### 2.3.5.1 Geräte

Mikrotom: Fa. Jung, Heidelberg

Autotechnicon: Technicon Company, New York, Vereinigte Staaten

Mikroskop: Axioplan, Fa. Zeiss

Fotoapparat: M35W, Fa. Zeiss

Kameraobjektiv-Adapter: Nr. 456012, Fa. Zeiss

Camera-Control-Unit: Fa. AVT-Horn, Aalen

Belichtungselektronik: MC 63, Fa. Zeiss

#### 2.3.5.2 Reagenzien

Äthanol 80, 96 und 100%: Apotheke des UKE

Aceton: Fa. Biesterfeld

Xylol: Nr. 16446, Fa. Riedel-de Haën

Eosin: Eosin G, Certistain\_, Nr. 15935, Fa. Merck 0,1% in Aqua destillata.

Eukitt: Apotheke UKE

Natronlauge: NaOH, Nr. 9137, Fa. Merck

Natriumchlorid: NaCl, Nr. 6404, Fa. Merck

Mayer's Hämalaun:

1g Hämatoxylin (Hämatoxylin krist., Fa. Merck, Nr. 4302) wurde in 1 l Aqua bidest gelöst.

Es wurden 200 mg Natriumjodat (NaJO<sub>3</sub>, Fa. Merck, Nr. 6525) und

50g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecylhydrat, Fa. Merck, Nr. 1042) zugegeben und unter Schütteln gelöst. Es entsteht eine blauviolette Lösung. Nach Zugabe von

50g Chloralhydrat ( Riedel-de Haën AG, Nr. 15307) und

1 g Zitronensäure (Zitronensäure-1-Hydrat, Fa. Merck, Nr. 443) nimmt die Lösung eine rotviolette Farbe an.

Kongorot nach Puchtler:

Die Stammlösung besteht aus

0,2 g Kongorot (Nr. 1340, Fa. Merck) und

100ml mit NaCl gesättigter, 80%iger Äthanollösung. Kurz vor Gebrauch wird

1%ige, filtrierte NaOH-Lösung zugegeben.

Perjodsäure-Schiff-Reaktion:

Schiff's Reagens, Nr. 109033, Fa. Merck

Perjodsäure zur Analyse, Nr. 100524, Fa. Merck

Waschlösung bestehend aus 36 ml Natrium-Disulfid 10%

(Apotheke UKE) und 36 ml 1n HCl (Fa. Merck) ad 750 ml Aqua bidest.

## 2.4 Weiterverarbeitung der Gewebe-RNA

Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis mit autoklaviertem Material durchgeführt.

### 2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Von -80°C gefrorenem Tumorgewebe wurden ca. 0,2 g abgeschlagen und unter Zugabe von Flüssigstickstoff in einem Mörser fein zerrieben. Das in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen überführte Gewebe wurde

mit 2 ml RNazol pro 0,1 g Tumorgewebe durchmischt, dann mit 100 µl pro ml Volumen Chloroform versetzt, einige Sekunden auf dem Schüttler durchmischt und für ca. 15 Min. auf Eis gestellt. Nun wurde diese Suspension gleichmäßig auf eine gerade Zahl 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und für 15 Minuten bei 12000 upm und 4 °C zentrifugiert. Es entstehen drei Phasen: eine obere wäßrige, eine Zwischenschicht aus Feststoffen und eine untere Chloroformphase. Die RNA befindet sich in der wäßrigen Phase, so daß diese mittels einer Pipette zurück in ein neues 50ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Diese RNA-haltige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol überschichtet, für einige Sekunden auf dem Schüttler durchmischt und für 45 Minuten bei -20 °C im Gefrierfach gefällt. Anschließend erfolgte erneut die Aufteilung auf eine gerade Zahl von 2 ml-Reaktionsgefäßen und die Zentrifugation bei 12.000 upm und 4 °C für 15 Minuten. Die nun entstandenen Pellets wurden sorgfältig vom Überstand befreit und mit 200 µl 75% Äthanol überschichtet, auf dem Schüttler so lange durchmischt, bis sich das Pellet vom Boden des Röhrchens ablöste und wie oben beschrieben zentrifugiert. Erneut wurde nun der Überstand abpipettiert und der Reinigungsvorgang mit 75% Äthanol wiederholt. Zum Schluß wurde das durch Abpipettieren und kurzes Trocknen bei Raumtemperatur völlig vom Alkohol befreite Pellet in 200µl sterilem Aqua bidest. gelöst, mit 500 µl 100% Äthanol durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

#### 2.4.2 Fällung der RNA

Um die bei -80 °C in Äthanol gelagerte RNA molekularbiologisch aufarbeiten zu können, muß sie gefällt werden. Zu diesem Zweck wurde die benötigte Menge RNA-Alkohol-Mischung in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dort mit 1/10 Volumen 3 molaren Natrium-Acetates vermischt und für mindestens eine Stunde oder ber Nacht bei -80 °C gefällt. Es folgte die Zentrifugation bei 12.000 upm und 4 °C für 30 Minuten. Danach wurde der Überstand sorgfältig vom Pellet abpipettiert und durch 200 µl 75% Äthanol ersetzt. Es wurde nun erneut 15 Minuten lang bei 12.000 upm und 4 °C zentrifugiert, wieder der Überstand abpipettiert und durch frisches 75% Äthanol ersetzt. Nach der folgenden Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wie oben wurde der Alkohol wiederum abpipettiert, die Pellets wurden kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 30 µl Aqua bidest. gelöst. 2 µl dieser Lösung wurden mit 798 µl Aqua bidest. vermischt und in eine Quarzküvette umgefüllt. Aus diesem Ansatz wurde die RNA-Konzen-

tration (c) im Photometer bei 260 nm Wellenlänge nach folgender Formel bestimmt :

$$c = OD * 400 * 40 : 1000 ; [c] = \mu\text{g}/\mu\text{l. (OD: optische Dichte)}$$

### 2.4.3 Integritätskontrolle der RNA

Mindestens 5 µg RNA, ad 5 µl mit sterilem Aqua bidest. wurden mit 10 µl eines Ansatzes aus

67% deionisiertem Formamid

1\* MOPS

7% filtriertes Formaldehyd

und einer Pipettenspitze Bromphenolblau vermischt.

Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 60 °C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurden in einem Erlenmeyerkolben 1,25g Agarose , 103 ml steriles Aqua bidest. und 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer im Mikrowellenherd zum Kochen gebracht. Dann wurde das Gefäß vorsichtig unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und unter den Abzug verbracht. Hier wurden der Lösung 9,375 ml filtriertes Formaldehyd und 25 µl Ethidiumbromid zugegeben und gleichmäßig vermischt. Dieses Gel wurde nun in eine Form gegossen und ein kleiner Kamm eingesetzt, welcher nach ca. 30 Minuten aus der nun harten Masse herausgezogen wurde und kleine Vertiefungen für die Aufnahme der Proben hinterließ.

Das Gel wurde nun in eine mit 1 x MOPS -Puffer und 5 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefüllte, horizontale Elektrophoresekammer eingehängt und die RNA-Proben wurden in die Vertiefungen des Gels einpipettiert. Nun wurde mit einem Generator so lange eine Spannung von 100 mV bei einer Stromstärke von 50 mA angelegt bis zwei Banden der ribosomalen RNA (18S und 28S) deutlich voneinander abgrenzbar waren. Das Ergebnis wurde auf einem Schwarz-Weiß-Bild festgehalten (s.u.).

## 2.4.4 Kompetitive, revers transkribierende Polymerase- Kettenreaktion

### 2.4.4.1 Prinzip

Mit der cRT-PCR kann man die Expression einer bestimmten RNA quantifizieren. Hierfür wird die RNA zunächst revers transkribiert und dann mit einer DNA-Polymerase amplifiziert. Welche RNA transkribiert und amplifiziert wird, wird durch die, dem Ansatz zugegebenen, Oligonucleotid-Primer determiniert. Diese Primer entsprechen in diesem Fall Sequenzen des 3' - und des 5' - Endes des HMG-CoA-Reduktase-Gens. Beide Primer sind 24 Basen lang:

3'-Primer: 5'-ATGCTCCTTGAACACCTAGCATCT-3'  
(Komplementär zur codierenden Sequenz)

5'-Primer: 5'-AGGTTCCAATGGCAACAACAGAAG-3'  
(Gebhardt et al. 1994).

Die Quantifikation wird durch Zugabe eines internen Standards ermöglicht. Dieser besteht aus einer RNA, welche sich von der Wildtyp-HMG-CoA-Reduktase-mRNA nur dadurch unterscheidet, daß sie aufgrund einer internen Deletion um 98 Basen kürzer ist (725 anstatt 823 Basenpaare). Dadurch wandert diese Kompetitor- (c) RNA im elektrischen Feld weiter als die Wildtyp-RNA und ist so von dieser abgrenzbar. Sie verfügt über die gleichen Primer-Regionen wie der Wildtyp. Da sich c- und Wildtyp-RNA im selben Ansatz befinden, unterliegen sie identischen Reaktionsbedingungen. Es kommt nun zu einer Kompetition um die im Ansatz vorliegenden Reagenzien. Diejenige RNA, die in größerer Konzentration vorliegt, wird auch stärker Amplifiziert. Da die Konzentration der c- RNA in jedem Ansatz bekannt ist, und man mehrere Ansätze mit immer gleicher Menge Proben-RNA und absteigender Konzentration c- RNA herstellt, kann man die Menge der Wildtyp-(Proben-)RNA in demjenigen Ansatz mit bloßem Auge ablesen, in dem Wildtyp- und c- RNA im Elektrophoresegelel gleichstarke Intensität zeigen (Abb. 2.1).

### 2.4.4.2 Reinigung der cRT-PCR Oligonucleotidprimer

In das Gefäß, welches den lyophilisierten Oligonucleotidprimer enthielt, wurden 500 µl steriles Aqua bidest. gegeben und solange gemischt bis das Pellet vollständig gelöst war. Nach 4 Minuten Zen-

trifugation bei 12.000 upm wurde der Überstand auf eine vorher mit 10 ml sterilem Aqua bidest. gespülten NAP-10 Fertigsäule gegeben. Dann wurden 5 ml steriles Aqua bidest. dazugegeben und das Filtrat in 10 Fraktionen aufgefangen. Aus jeder Fraktion wurde die optische Dichte aus einer 100fachen Verdünnung im Photometer bei 260 nm Wellenlänge bestimmt, ein bis drei Gipfelfraktionen wurden vereint und so verdünnt, daß ca. eine 20 µM Lösung vorlag. Diese wurde in 200 µl-Aliquots bei 20 °C eingefroren.

Die Konzentration  $c$  berechnet sich aus der im Photometer mit einer Wolframlampe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessenen optischen Dichte OD gemäß:

$$c = OD * 100 * 33 : 11,5 \quad [c] = \mu\text{mol/l.}$$

#### 2.4.4.3 Arbeitsablauf

Zunächst werden 6 µg Gewebe-RNA wie oben beschrieben gefällt und in 5 µl pro µg RNA Aqua bidest. gelöst. Dann wurden in  $n+1$ facher Menge ( $n$  = Zahl der Reaktionsansätze) folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

4,75 µl Aqua dest.  
2 µl 10\* PCR-Puffer  
2 µl 10mM desoxy-Nucleotid-Primer (dNTP)  
0,25 µl RNase-Inhibitor  
1 µl 3' Oligonucleotidprimer und  
0,05 µl reverse Transkriptase  
10 µl dieser Mischung wurden 5 µl Proben-RNA-Lösung zugesetzt.

Nun wurden 500 ng Kompetitor-RNA, die in 5µl Aqua bidest. bei -80 °C eingefroren waren, so verdünnt, bis eine Konzentration von 1 pg RNA pro 5 µl Wasser vorlag. 25 µl dieses Ansatzes wurden mit 75 µl Aqua dest. vermischt, hieraus wiederum 1 zu 1 mit Aqua dest. usw. bis folgende Verdünnungsreihe vorlag:

$$250-125-62,5-31,25-15,625 \text{ fg/5 } \mu\text{l.}$$

(Der letzte Verdünnungsschritt wurde nicht in allen Versuchen angesetzt).

## Kompetitive RT-PCR

1. Isolation zellulärer Gesamt-RNA (wt) und in vitro-Synthese von Kompetitor-RNA (del). Titrationsreihe von Kompetitor-RNA mit 1 µg pro Reaktionsansatz zellulärer RNA.
2. Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges durch reverse Transcription.
3. Synthese des zweiten DNA-Stranges im 1. Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion.
4. Amplifikation der DNA im 2. und den folgenden Zyklen.
5. Gelelektrophoretische Analyse der DNA.

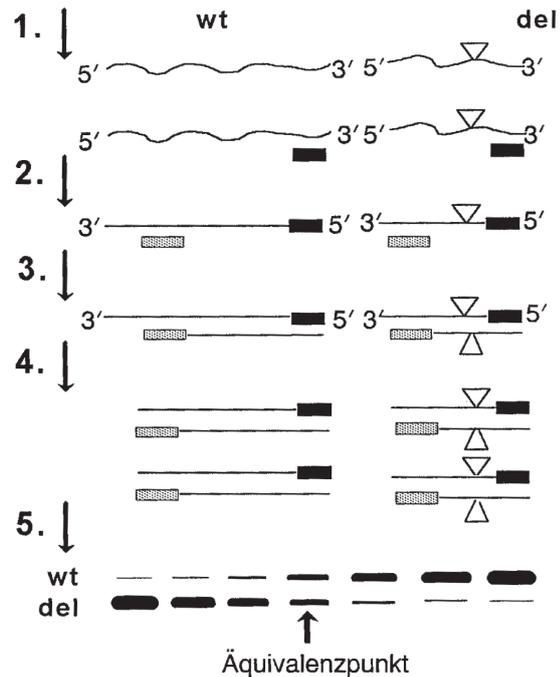


Abbildung 2.1: Prinzip der kompetitiven, revers transkribierenden Polymerase-Kettenreaktion (aus Niendorf und Gebhardt, 1994)

5 µl jeder Verdünnung wurden jeweils einem Ansatz mit Wildtyp-RNA, zu einem fünften wurden 5 µl Aqua bidest. ohne Kompetitor-RNA zugegeben. Die Einpipettierung erfolgte in aufsteigender Konzentration.

In manchen Fällen, in denen die Wildtyp-RNA höher konzentriert war als 250 fg/ 5 µl, wurde analog folgende Verdünnungsreihe eingesetzt:

500-250-125-62,5-31,25 fg/ 5 µl.

Zur Umrechnung von „fg/µl“ zu „Molekülen Kompetitor-RNA pro Ansatz“ multipliziert man die fg mit 0,001352 und erhält die Molekülzahl x 10<sup>6</sup>.

Nun wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C zur reversen Transkription in den Thermoblock gesteckt.

In der Zwischenzeit wurden folgende Reagentien n + 1fach (n = Zahl der Reaktionsansätze) zusammenpipettiert:

25,5 µl Aqua bidest.  
1,5 µl 20\* Replitherm-Puffer

1 µl 5' Primer  
2 µl EDTA und  
0,2 µl DNA-Polymerase

30 µl dieser Mischung wurden jedem Ansatz zugegeben. Für jeden Ansatz wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.

Zum Schluß wurde jeder Ansatz mit 50 µl Öl überschichtet und erneut in den Thermoblock bei folgendem Programm gesteckt:

1. Zyklus: 5 Min. Denaturierung bei 94 °C; 2 Min. „Annealing“ bei 60 °C und 3 Min. Extension bei 72 °C.

2.-36. Zyklus: 1 Min. Denaturierung bei 94 °C; 2 Min. „Annealing“ bei 60 °C und 3 Min. Extension bei 72 °C.

37. Zyklus: 1 Min. Denaturierung bei 94 °C; 2 Min. „Annealing“ bei 60 °C und 10 Min. Extension bei 72 °C.

#### 2.4.4.4 Dokumentation

Ethidiumbromid lagert sich an DNA und RNA und fluoresziert im ultravioletten Licht. Dadurch können diese Moleküle in Ethidiumbromidhaltigen Gelen mit Hilfe einer ultravioletten Lichtquelle sichtbar gemacht werden.

Die Herstellung eines Gels zur Auftrennung und Sichtbarmachung von RNA ist bereits oben beschrieben worden. Ein DNA-Gel wird folgendermaßen angefertigt:

1,25 g Agarose werden mit  
100 ml Aqua bidest. und  
25 ml 5\*TBE

in einem Erlenmeyerkolben im Mikrowellenherd zum Kochen gebracht. Dann wird das Gefäß vorsichtig unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. Der handwarmen Lösung wird 12,5 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und durch schwenken des Kolbens gleichmäßig verteilt. Dann wird das Gemisch in eine Form gegossen, in die zwei Kämmen eingesteckt sind. Diese werden nach ca. 20 Minuten aus dem nun erhärteten Gel entfernt und hinterlassen kleine Vertiefungen für die Aufnahme der Proben.

10 µl der Probenlösung wurden aus dem Probengefäß so entnommen, daß nichts von dem PCR-Oel in die Pipettenspitze gelangte. Die Probenlösung wurde mit 4 µl DNA-Probenpuffer vermischt. Der Ansatz wurde nun in die dafür vorgesehene Vertiefung im Ethidiumbromid-Gel instilliert. Dieses Gel wurde in die horizontale Elektrophoresekammer, welche mit 1 x TBE in Aqua bidest. und 5 µg/µl Ethidiumbromid gefüllt wurde, eingehängt.

Nun legt man solange eine Spannung von 200 mV bei 100 mA Stromstärke an, bis sich drei Banden klar voneinander trennen: Oben die Wildtyp-DNA, in der Mitte ein Hybrid aus Wildtyp- und Kompetitor-DNA und unten Kompetitor-DNA. An dem Ansatz, an dem obere und untere Banden gleich intensiv sind, konnte man die Konzentration der Wildtyp-RNA mit dem bloßen Auge ablesen.

Als dieser Zustand erreicht war, wurde das Gel auf dem Transilluminator liegend mit einer auf einem Repröstander befestigten Kamera auf Schwarz-Weiß-Sofortbildern fotografiert. Das Positiv wurde mit einer der Packung beiliegenden Legierung versiegelt, das Negativ wurde in 18% Natriumsulfidlösung ca. 1 Minute lang fixiert und dann sorgfältig mit Aqua bidest. gespült.

## 2.4.5 Materialien

### 2.4.5.1 Geräte

Mörser: Fa. Halbenwänger, Berlin

Schüttler: Vortex VF 2, IKA-Labortechnik, Fa. Jahnke und Kunkel

Zentrifuge: Mikro Rapid, Fa. Hettich, Tuttlingen

Quarzküvette: Fa. Hellma

Photometer: Ultrospec III, Fa. Pharmacia LKB, Biochrom LTD.

Mikrowellenherd: Cooktronic 7915, Fa. Philips

Rahmen für Elektrophorese-Gele: Fa. Consort, Turnout, England

Elektrophoresekammern: Fa. Consort, Turnout, England

Generator: Sartophor 3000, Fa. Sartorius GmbH und Co. KG,  
Göttingen

Thermoblock: Trio-Thermoblock TB 1, Fa. Biometra, Göttingen

UV- Lichtquelle: Transilluminator TM 20, Fa. UVP, Kalifornien,  
Vereinigte Staaten

Reprostände: RS 3, Fa. Kaiser Fototechnik GmbH und Co. KG,  
Buchen

Kamera: Polaroid 60 SE, Objektiv 127mm mit 3 Aufsätzen:

Kaiser Close up +3 und +1 (Fa. Kaiser) sowie gelber Farbfilter HOYA  
55 mm y (k2), Japan

#### 2.4.5.2 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße, 50ml: Opticul Tube Blue Max, Falcon 2070, Fa.  
Becton Dickinson, New Jersey, Vereinigte Staaten

Reaktionsgefäße, 0,5 ml: Nr. 96.4625.9.01, Fa. Treff

Reaktionsgefäße, 2 ml: Safe Lock, Nr. 0030 120.094, Fa.  
Eppendorf

Pipettenspitzen: 10 µl: Nr. 2612172, 100 µl: Nr. 2114602, 1000 µl: Nr.  
2114612, Fa. Wilke und Witzel

Schwarz/Weiß-Filme: Nr. 665, Fa. Polaroid

NAP-10 Fertigsäulen: Nr. 17-0854-01, Fa. Pharmacia

#### 2.4.5.3 Reagenzien

RNAzol: Fa. Biotecx Laboratories, Inc., Texas, Vereinigte Staaten

Chloroform: Nr. 2445, Fa. Merck

Isopropanol: Nr. 405-7, Fa. Sigma

Äthanol: 100%, Nr. 983, Fa. Merck

3M Natrium-Acetat: 40,824 g Natriumacetat (Apotheke UKE) ad 100ml mit Aqua bidest., pH einstellen auf 5,3

deionisiertes Formamid:

100 ml Formamid, Fa. Sigma, Nr. F-7503 werden eine Stunde lang mit

10g Mixed Bed Resin AG-501-XB, Fa. Bio Rad, Nr. 142-6424 vermischt und dann filtriert durch

Papierfilter 595 1/2, 185mm Durchmesser, Nr. 311647, Fa. Schleicher und Schuell; Lagerung bei -20 C.

10\* MOPS:

10,47 g MOPS ,Fa. Sigma, Nr. M-8899,  
1,63 g NaOAc, Fa. Sigma, Nr. 2889,  
0,93g EDTA, Fa. Sigma, Nr. ED-2-ss, pH 7,  
ad 250 ml mit Aqua bidest.

Filtriertes Formaldehyd: Formaldehyd, säurefrei, Fa. Merck Nr. 3999 mit 10 ml-Spritze aspirieren und durch einen Filter (Minisart NML, Nr. 16555 K, Fa. Sartorius) in ein Gefäß geben.

Bromphenolblau: Nr. 8122, Fa. Merck

Agarose : Nr. 11404, Fa. Serva

Ethidiumbromidlösung 10mg/ml: Nr. E-1510, Fa. Sigma

6\*DNA-Probenpuffer: 2,5 mg Bromphenolblau, 4 g Sucrose (Nr. S-9378, Fa. Sigma) in 10 ml H<sub>2</sub>O

Oligonukleotidprimer: lyophilisierter Feststoff von Dr. Kullmann, Institut für Zellbiochemie und molekulare Neurobiologie des UKE.

Deletions-RNA: Zur Verfügung gestellt in 500 ng-Aliquots von Fr. Dr. Gebhardt, Institut für Pathologie, UKE.

10\*PCR-Puffer:

500 mM KCl, Fa. Merck, Nr. 4936;  
100 mM Tris/HCl, Merck, Nr. 8382, pH 8,3;

20 mM MgCl<sub>2</sub> Fa. Sigma, M-0250;  
0,1% Gelatine, Sigma, Nr. G-9382).

10 mM dNTP's (dATP, Nr. 27-2050; dCTP, Nr. 27-2060, dGTP, Nr. 27-2070, dTTP, Nr. 27-2080, Fa. Pharmacia; alles 100mM Stammlösungen mit Aqua bidest 1:10 verdünnt),

RNAse-Inhibitor (Fa. Pharmacia, Nr. 27-0815-01),

Reverse Transkriptase 200 Units/  $\mu$ l: M-MLV, Nr. 8025 SA, Fa. Gibco-BRL

20\*Replitherm-Puffer: Nr. 100001, Fa. Biozym

5 mM EDTA, pH 8,0

DNA-Polymerase, 500 Units :Nr. 100050 incl. Replitherm Puffer, Fa. Biozym

Mineralöl: Mineralöl, leicht, Nr. M-3516, Fa. Sigma

5\*TBE:

54 g Tris, Tris[hydroxymethyl]-aminomethan, Fa. Merck, Nr. 8382;  
27,5 g Borsäure, Fa. Merck, Nr. 165;  
20 ml 0,5 M Na-EDTA, pH 8;  
ad 1 l mit Aqua bidest.

18% Natriumsulfitlösung: 110g Natriumsulfit (Nr 6657, Fa. Merck) ad. 500 ml Aqua bidest.

## 2.5 Bestimmung von Gesamt-Cholesterin in Leber- und Tumorge-webe und Serum

Zunächst wurde für jede Gewebeprobe ein steriles 2ml-Reaktionsgefäß gewogen und mit der Probennummer versehen. Nun wurde von dem Gewebe ein ca. 0,2g schweres Stück abgeschlagen und im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein zerrieben. Das entstandene Pulver wurde in das entsprechende Reaktionsgefäß umgefüllt und erneut gewogen. Die Differenz zum Leergewicht des Reaktionsgefäßes entsprach der exakten Probenmenge. Nachdem

das Gewebe aufgetaut war, wurde es mit 25 µl CHOL-Puffer pro mg Gewebe im Dounce-Homogenisator für 3-4 Minuten homogenisiert. Dann wurde das Ganze bei 4 °C und 12.000 upm für 3 Minuten zentrifugiert und aus dem Überstand der Cholesteringehalt photometrisch bestimmt.

Dazu wurden 20 µl Lysat mit 1 ml Reagenz für 15 Minuten inkubiert und die Konzentration bei 546 nm Wellenlänge im Photometer mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Die Konzentration (c) berechnet sich aus der optischen Dichte wie folgt:

$$c = OD * 1,25 * k / dOD$$

$$c = \mu\text{g} / 1 \text{ mg Gewebe}$$

OD: optische Dichte des Probenlysates

dOD: Durchschnittliche optische Dichte bei einer Konzentration von 1 µl Standard ad 20 µl CHOL2-Puffer, ermittelt an einer Eichkurve mit 2/5/10 µl Standard ad 20 µl CHOL2-Puffer.

$$k = \text{Konzentration des Standards} = 1,24 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Zur Blutentnahme bei den Mäusen wurde mit einer Glaskapillare peribulbär in die Orbita gestochen. Das so durch Kapillarsog gewonnene Blut wurde 5 min bei ca. 10.000 U/ min zentrifugiert. Aus dem Überstand (Plasma) wurde der Cholesteringehalt photometrisch bei 546 nm Wellenlänge bestimmt.

## 2.5.1 Materialien

### 2.5.1.1 Geräte

Feinwaage: AE 100, Fa. Mettler, Zürich, Schweiz

Dounce- Homogenisator: Nr. S 914, Fa. Braun Melsungen

### 2.5.1.2 Reagenzien

10x CHOL- Puffer:  
100 mM Tris, Nr. 8382, Fa. Merck

1,54 molare NaCl  
10 mM EDTA

ansetzen und autoklavieren.

CHOL 2- Puffer:

1/10 davon vermischen mit

1% Triton X, Nr. X -100, Fa. Sigma und

2 mM PMSF, Nr. 7626, Fa. Sigma.

Reagenz: Monotest Cholesterin-Kit, Fa. Boehringer

Eichkurve: Precilip Cholesterin Standard, Fa. Boehringer

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Mann Whitney Two-Sample Tests bzw. des Wilcoxon Signed Rank Tests auf Signifikanz ( $p$  kleiner als 0,05) geprüft. Unterschiedliche Parameter wurden über Korrelationskoeffizienten gegenübergestellt und auf Zusammenhänge untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Dosisfindung

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe wurde die für die Versuchstiere optimale Dosis-Wirkungs-Relation ermittelt. Dazu diente der Dosisfindungs-Versuch. Hier wurden 5 Gruppen mit je vier Tieren gebildet (siehe 2.1.1).

Das Pravastatin wurde den Tieren täglich (fünf mal pro Woche) drei Wochen lang intraperitoneal in einer 0,9% NaCl-Lösung von 40mg pro ml (Gruppen 1 u. 2) bzw. 120 mg pro ml (Gruppen 3,3b u. 4) appliziert. In der 4. Woche wurde die NaCl-Lösung durch Aqua ad injectabilia ersetzt.

Die höhere Konzentration (120 mg/ml) erwies sich aufgrund des geringeren zu injizierenden Volumens als praktikabler.

Tiere, die mehr als 1000 mg Pravastatin pro kg Körpergewicht erhielten, erlitten unmittelbar nach der Injektion krampfartige Anfälle die mehrere Minuten andauerten. In der Gruppe, welche 3000 mg Pravastatin pro kg Körpergewicht erhielt, starben alle Tiere nach der ersten Injektion innerhalb von Minuten unter dem Bild von starken Krämpfen. Bei einer Konzentration von 120 mg/ml zeigten die Tiere ebenfalls leichte Krämpfe. In Aqua ad injectabilia war das Pravastatin schlecht löslich, so dass die i.p. Injektion problematisch war. Daraufhin entschied man sich für isotone NaCl als Lösungsmittel in den Versuchen 1-3.

#### 3.2 Versuch 1

Bei diesem Versuch wurden 30 Nacktmäusen in vitro kultivierte Tumorzellen subcutan in die Leistenbeuge injiziert. Rechts wurden 1.000.000 Zellen in 200 ml Lösung, links 750.000 Zellen in 150 ml Lösung injiziert. Unmittelbar danach wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt: 15 Tiere erhielten Pravastatin (1000 mg/kg Körpergewicht; 80 mg pro ml Lösung) intraperitoneal gespritzt, den anderen 15 Tieren wurde 200ml isotone Kochsalzlösung ebenfalls intraperitoneal appliziert. Diese Prozedur wurde täglich (außer Wochenenden) acht Wochen lang wiederholt, und dabei das Tumolvolumen jeweils bestimmt. Nach neun Wochen wurden die Tiere getötet. Tumolvolumen, -gewicht,

Serumcholesterinspiegel sowie Lebergewicht wurden am Kadaver bestimmt (Tab. 1). In der 7. Woche mußten 7 Tiere (zwei Behandelte und fünf Kontrolltiere) getötet werden, da ihre Tumoren so groß geworden waren, daß eine Fortsetzung des Versuches ethisch nicht mehr vertretbar war. Ein Kontrolltier ging in den ersten Versuchstagen verloren.

### 3.2.1 Leukozytose

Bei allen tumortragenden Tieren fiel schon makroskopisch bei der Blutentnahme eine massive Leukozytose auf. Diese bestätigte sich auch histologisch (Daten nicht gezeigt). Es fanden sich keinerlei Anzeichen für eine Infektion wie z. B. Fieber. Diese Beobachtung gilt analog für die Versuche V2 und V3.

### 3.2.2 Tumorgröße und -gewicht

Die Tumoren in der rechten Leistenbeuge waren nach sechs Wochen Versuchsdauer bei den Kontrolltieren hochsignifikant größer als bei den Behandelten ( $p = 0,0089$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Abb. 3.1; Tab 1), auf der linken Seite ergab sich kein signifikanter Unterschied. Nach neun Wochen ergaben sich für die verbliebenen Tiere bezüglich des Tumorumfanges beiderseits keine signifikanten Unterschiede (rechts  $p = 0,3743$ ; links  $p = 0,1827$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Abb. 3.1; Tab 1).

Die Tumoren in der rechten Leistenbeuge waren nach dem Exitus der Tiere in der Behandlungsgruppe im Mittel 1,31g schwer, in der Kontrollgruppe 1,65g ( $p = 0,3411$ ; Mann-Whitney Two Sample Test). Die Tumoren der linken Leistenbeuge waren im Mittel 1,35 beziehungsweise 1,83g schwer ( $p=0,4464$ ; Mann-Whitney Two Sample Test).

### 3.2.3 Tumormorphologie

Der Anteil an vitalem Tumorgewebe am Gesamtquerschnitt war bei behandelten und unbehandelten Tieren etwa gleich groß (Tab. 1).

### 3.2.4 Lebergewicht

Das Lebergewicht betrug nach Versuchsende bei den behandelten Tieren im Mittel 2,0g, bei den Kontrolltieren 2,2g ( $p = 0,5676$ , Mann-Whitney Two Sample Test).

### 3.2.5 Lebermorphologie

In allen Lebern fanden sich Herde von extramedullärer Blutbildung, wobei sich bezüglich der Quantität kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ergab (Tab. 1).

### 3.2.6 Serumcholesterin

Das Serumcholesterin vor Versuchsbeginn betrug in der Gruppe der behandelten Tiere im Mittel 107 mg/dl, bei Versuchsende lag der Mittelwert bei 76 mg/dl. Dieser Abfall im Serumcholesterin war hochsignifikant ( $p = 0,0015$ ; Wilcoxon signed rank test; Tab. 1). In der Kontrollgruppe lag das mittlere Serumcholesterin vor Versuchsbeginn bei 115 mg/dl und stieg zum Versuchsende auf 147 mg/dl an ( $p = 0,1514$ ; Wilcoxon signed rank test; Tab. 1).

## 3.3 Versuch 2

Bei diesem Versuch wurde 30 Mäusen ein 3 cm großes Stück etablierter Tumor jeweils in die rechte und linke Leistenbeuge subcutan implantiert. Dann wurden sie analog zu Versuch 1 in zwei Gruppen geteilt. 10 Tage nach Implantation wurde der Behandlungsgruppe 1000 mg pro kg Körpergewicht Pravastatin intraperitoneal gespritzt (80 mg pro ml Lösung), die Kontrolltiere erhielten eine Injektion von 200 ml NaCl. Diese Prozedur wurde täglich (außer Wochenenden) wiederholt. Das Tumolvolumen wurde wöchentlich mit Hilfe einer Schublehre bestimmt. Nach Versuchsende wurden Tumolvolumen, -gewicht, Lebergewicht sowie Serumcholesterin bestimmt. Nach sechs Wochen waren schon 6 Kontrolltiere auf Grund ihres großen Tumors aus ethischen Gründen getötet worden, so daß der Versuch nach sieben Wochen beendet wurde.

### 3.3.1 Tumorgroße und -gewicht

Bis zum Beginn der 4. Woche waren noch alle Tiere am Leben. Zu diesem Zeitpunkt war das Tumolvolumen der Kontrolltiere signifikant höher als das der Behandelten (rechte Leistenbeuge  $p = 0,0467$ ; linke Leistenbeuge  $p = 0,0565$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Abbild 3.2; Tab 2). Bei Versuchsabschluß nach sieben Wochen ließ sich kein signifikanter Unterschied des Tumolvolumens zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe ermitteln (rechte Leistenbeuge  $p = 0,2051$ ;

linke Leistenbeuge  $p = 0,8430$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Abb. 3.2; Tab 2).

Das postmortal bestimmte Tumorgewicht war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen (rechte Leistenbeuge  $p = 0,3364$ ; linke Leistenbeuge  $p = 0,2423$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Tab 2).

### 3.3.2 Tumormorphologie

Der Anteil an vitalem Tumorgewebe an der Querschnittsfläche war bei den Kontrolltieren etwas größer (zwei Drittel der Gesamtfläche) als bei den behandelten (zwischen einem und zwei Dritteln,  $p = 0,165$ ; Mann-Whitney Two Sample Test, Tab. 2).

### 3.3.3 Lebergewicht

Das Lebergewicht der behandelten Tiere betrug im Mittel 1,9 g, das der Kontrolltiere 2,1 g ( $p = 0,2073$ ; Mann - Whitney Two Sample Test; Tab. 2).

### 3.3.4 Lebermorphologie

In allen Lebern fanden sich Herde von extramedullärer Blutbildung, deren Ausprägung im Mittel zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gleich war ( $p = 0,9051$ , Mann-Whitney Two Sample Test, Tab. 2).

### 3.3.5 Serumcholesterin

Die Serumcholesterinspiegel vor Versuchsbeginn sind nicht ermittelt worden. Die Serumcholesterinspiegel bei Versuchsende waren in der Kontrollgruppe hochsignifikant höher als in der Gruppe der behandelten Tiere ( $p = 0,0096$ ; Mann-Whitney Two Sample Test; Tab. 2).

## 3.4 Versuch 3

In diesem Versuch wurde 26 Tieren analog zu Versuch 2 in beide Leistenbeugen ein 30 cmm großes Stück etablierter Tumor implantiert.

10 Tage später wurden die Tiere in zwei Gruppen zu 13 Tieren aufgeteilt und wie in den Versuchen 1 und 2 mit Pravastatin bzw. NaCl behandelt. Wenn einer der beiden implantierten Tumoren ein Volumen von 2500 cmm erreicht hatte, wurde das entsprechende Tier getötet. Diese TumorgroÙe hat sich durch die Erfahrung mit Versuch 1 und 2 als Schwellenwert erwiesen, da es eine gerade noch tolerable Tumormasse für das Tier darstellt. Der Zeitraum vom Behandlungsbeginn bis zu dieser Tötung wurde als Überlebenszeit definiert. Nach Tötung der Tiere wurden alle Tumoren gewogen und ihr Volumen bestimmt. Die Tumoren, die in der rechten Leistenbeuge angewachsen waren, wurden histologisch aufgearbeitet und es wurde Material davon in flüssigem Stickstoff eingelagert. Aus diesem wurde später die HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression sowie der Cholesteringehalt bestimmt (Tab.3).

#### 3.4.1 Überlebensdauer

Die Tiere der Behandlungsgruppe hatten eine mediane Überlebenszeit von 42 Tagen (Mittelwert: 43 Tage), die der Kontrollgruppe eine von 36 Tagen (Mittelwert 37,5 Tage,  $p = 0,031$  Mann-Whitney Two Sample Test ; Abb. 3.3; Tab.3).

#### 3.4.2 Integrität der mRNA

Alle Proben enthielten intakte mRNA mit abgrenzbaren 18S- und 28S-Banden (Abb. 3.4).

#### 3.4.3 HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression im Tumorgewebe

Die Menge der HMG-CoA-mRNA im Tumorgewebe der Tiere der Behandlungsgruppe zum Zeitpunkt der Tötung betrug im Mittel  $8,72 \times 10^4$  Moleküle pro mg Gesamt-RNA; die der unbehandelten Kontrolltiere  $1,52 \times 10^5$  Moleküle pro mg Gesamt-RNA ( $p = 0,0778$ ; Mann-Whitney Two Sample Test: Abb. 3.5 bis 3.9).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Tumorgewicht und dem Gehalt an HMG-CoA-Reduktase-mRNA pro mg Gesamt-RNA ( $r = 0,86$ ;  $p = 0,0003$ ; Least squares linear regression; Abb. 3.10).

#### 3.4.4 Lebergewicht

Das Lebergewicht der behandelten Tiere lag im Mittel bei 2,65 g, das der Kontrolltiere bei 2,76 g ( $p = 0,7777$ , Mann-Whitney Two Sample Test).

#### 3.4.5 Tumorcholesterin

In der Behandlungsgruppe lag der mittlere Cholesteringehalt bei 2,64 mg pro mg Tumorgewebe, in der Kontrollgruppe bei 2,54 mg pro mg Tumorgewebe. Der Unterschied ist nicht signifikant ( $p = 0,7072$ ; Mann-Whitney Two Sample Test).

#### 3.4.6 Tumormorphologie

Die rechtsseitig lokalisierten Tumoren der Mäuse zeigten eine Nekrosezone, die im Durchschnitt einem Drittel des Querschnittes entsprach (Abbildungen 3.11 und 3.12).

#### 3.4.7 Lebercholesterin

In der Behandlungsgruppe war das Gewebecholesterin hochsignifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (im Mittel 3,5 mg pro mg Gewebe gegenüber 4,00 mg pro mg Gewebe;  $p = 0,0035$ , Mann-Whitney Two Sample Test; Abb. 3.13).

#### 3.4.8 Lebermorphologie

Es zeigten sich in allen Lebern Herde extramedullärer Blutbildung verschiedenen Ausmaßes. Die Tiere 3, 5 und 8 der Pravastatin-Gruppe wiesen einen besonders hohen Flächenanteil an extramedullärer Blutbildung auf, insgesamt ergab sich jedoch kein signifikanter quantitativer Unterschied bezüglich dieses Phänomens zwischen Tieren der Pravastatin- und der Kontrollgruppe (Abbildung 3.14, 3.15). Die Gesamttumormasse ist bei den unbehandelten Tieren positiv mit dem Ausmaß der extramedullären Blutbildung korreliert ( $p = 0,0391$ ; Least squares linear regression). Dieser Zusammenhang deutet sich auch für die Versuche 1 und 2 an, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 3.16).

In den Sinusoiden fanden sich homogen-eosinophile Ablagerungen (Abb. 3.17), deren Menge mit dem Ausmaß der extramedullären Blutbildung in der Kontrollgruppe deutlich ( $r = 0,5838$ ;  $p = 0,0362$ , Least squares linear regression), in der Behandlungsgruppe weniger deutlich ( $r = 0,5305$ ;  $p = 0,076$ , Least squares linear regression) ansteigt. Exemplarische Darstellung von Amyloid in den portalen Gefäßwänden einer Mausleber (Abbildung 3.18) läßt darauf schließen, daß es sich bei diesen Ablagerungen um Amyloid-Vorläufer (Amylodoid) handeln könnte.

#### 3.4.9 Serumcholesterin

Das Serumcholesterin vor Versuchsbeginn betrug in der mit Pravastatin behandelten Gruppe im Mittel 109 mg/dl, in der Kontrollgruppe 100 mg/dl. Dieser Unterschied ist grenzwertig signifikant ( $p = 0,0771$ , Mann-Whitney Two Sample Test). Die nach der Tötung gemessenen Serumcholesterinwerte zeigten in der Behandlungsgruppe einen Abfall auf 106 mg/dl, in der Kontrollgruppe einen Anstieg auf 104 mg/dl des Mittelwertes. Die Signifikanz der Differenz geht völlig verloren ( $p = 0,9387$ , Mann-Whitney Two Sample Test).

Die intraindividuellen Veränderungen des Serumcholesterins zwischen Versuchsbeginn und Tötung der Tiere betragen im Mittel in der Behandlungsgruppe  $-0,76\%$  des Ausgangswertes und in der Kontrollgruppe  $+3,61\%$ .

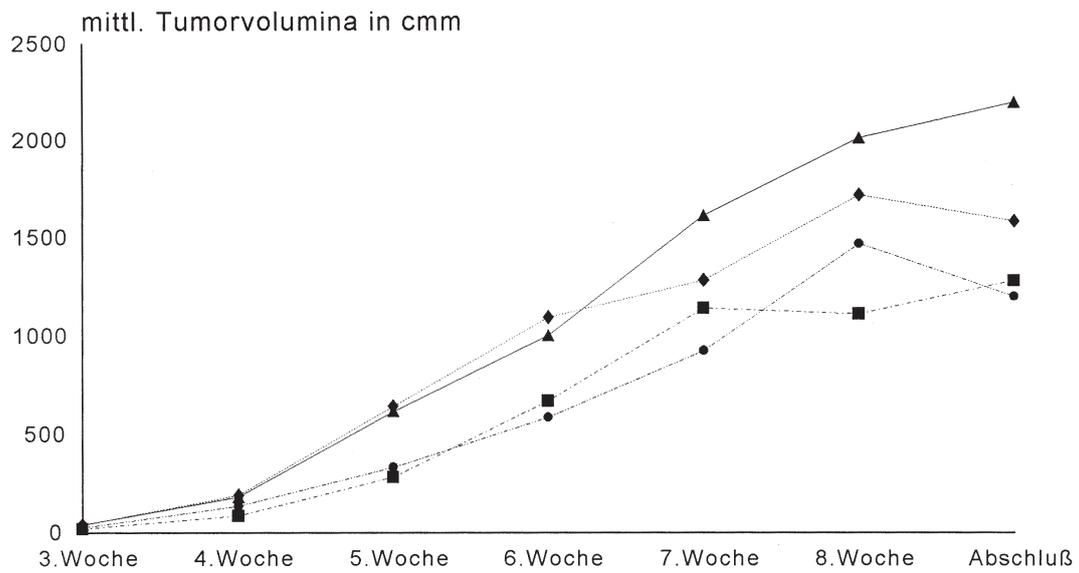


Abb. 3.1: Zunahme der Tumorumvolumina über die Zeit in Versuch 1 (arithmetische Mittel).

Dreiecke:	Tumoren der Kontrolltiere links
Quadrate:	Tumoren der behandelten Tiere links
Rauten:	Tumoren der Kontrolltiere rechts
Kreise:	Tumoren der behandelten Tiere rechts

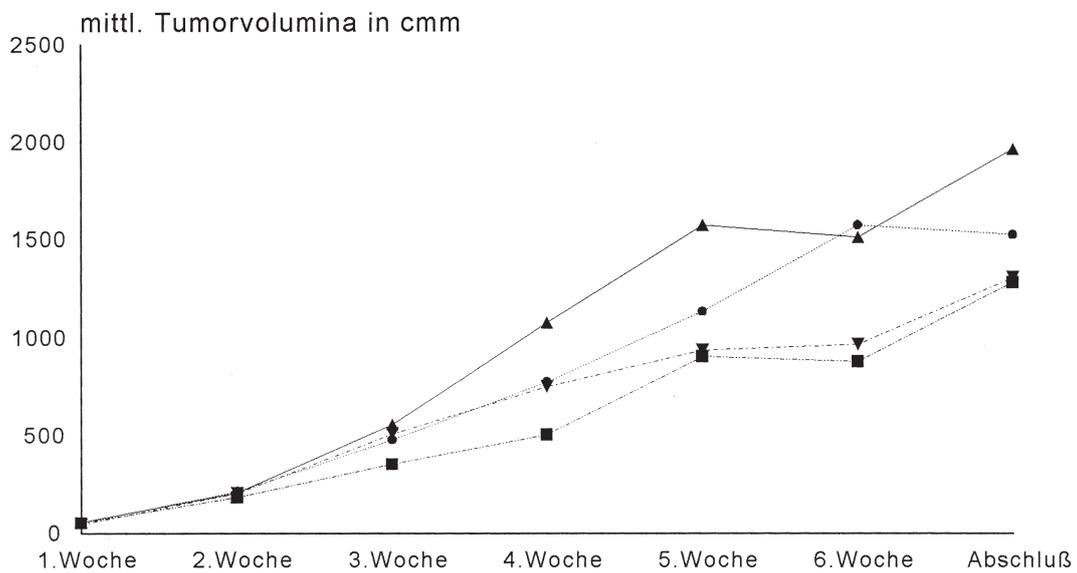


Abbildung 3.2: Zunahme der Tumorumvolumina über die Zeit in Versuch 2 (arithmetische Mittel).

Keile:	Tumoren der Kontrolltiere links
Quadrate:	Tumoren der behandelten Tiere links.
Dreiecke:	Tumoren der Kontrolltiere rechts.
Kreise:	Tumoren der behandelten Tiere rechts.

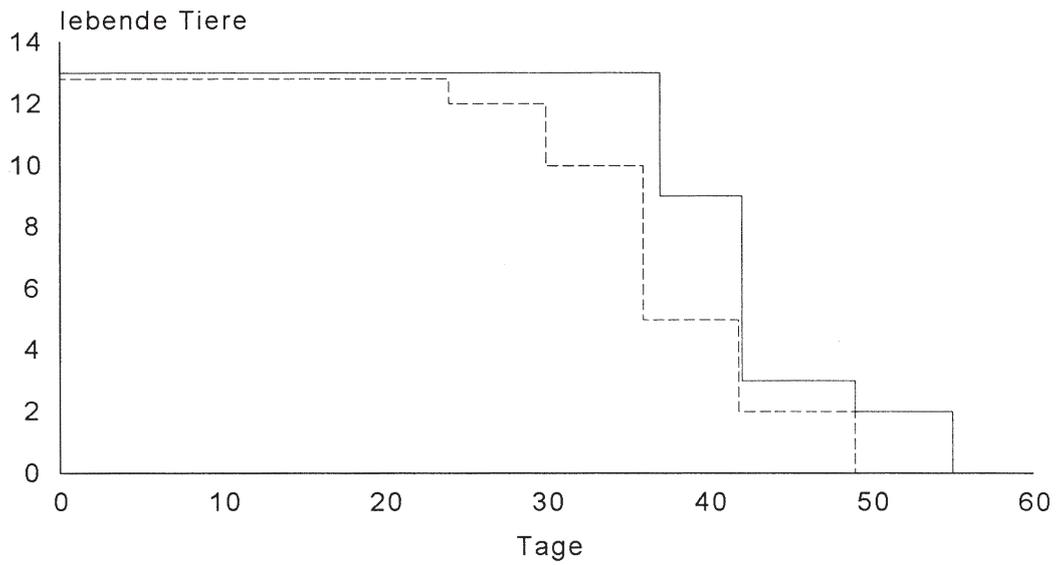


Abbildung 3.3: Darstellung der Überlebenszeiten der Tiere aus Versuch 3 nach Kaplan-Meyer.

Geschlossene Linie: behandelte Tiere  
 Gestrichelte Linie: Kontrolltiere

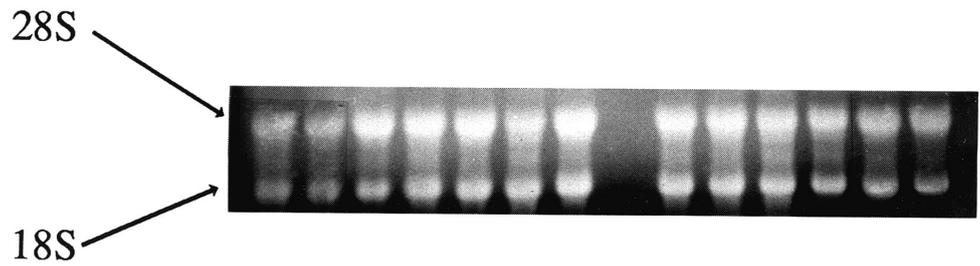
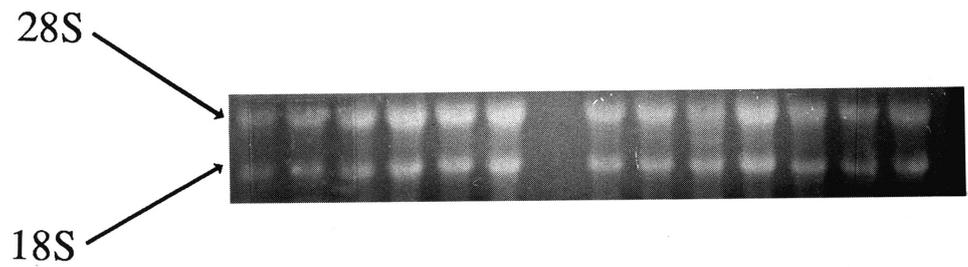


Abbildung 3.4: Integritätskontrolle der RNA: Die jeweils obere Bande entspricht der 28S-RNA, die untere der 18S-RNA.

Oberes Bild: Von links nach rechts Tumoren der behandelten Tiere (P) Nr. 8, 9, 10, 11, 12, 13 sowie der Kontrolltiere (K) Nr. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13.

Unteres Bild von links nach rechts: P Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sowie K Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6.

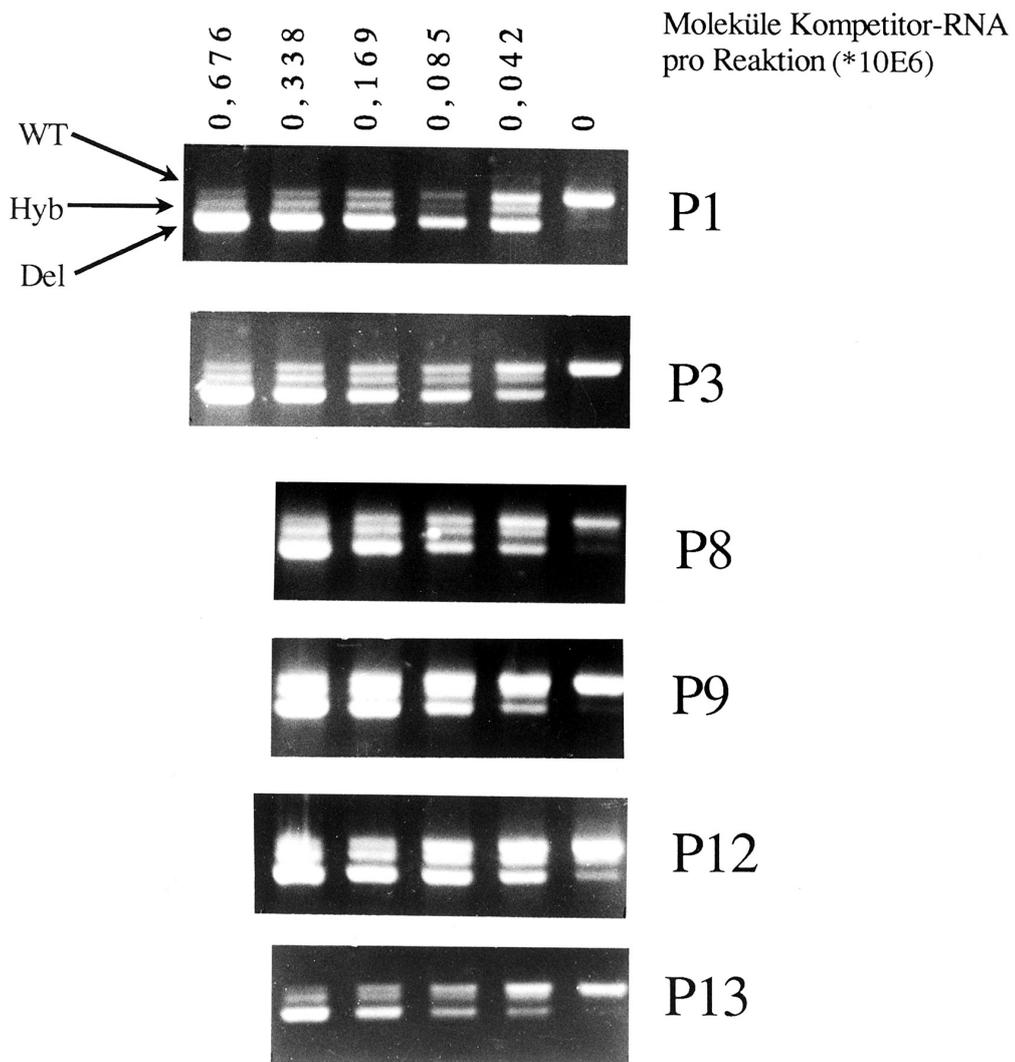


Abbildung 3.5: Ergebnisse der cRT-PCR der Tumoren der behandelten Tiere (P) Nr. 1, 3, 8, 9, 12 und 13.

Dort wo obere und untere Bande gleichstarke Intensität zeigen, kann man den Gehalt an Wildtyp-RNA ablesen. Wenn dieser Äquivalenzpunkt zwischen zwei Verdünnungsstufen liegt, wurde zur Annäherung der arithmetische Mittelwert aus den beiden flankierenden Verdünnungsstufen gebildet.

„WT“ steht für Wildtyp, „Hyb“ bezeichnet das Hybridisierungsprodukt aus Wildtyp- und Kompetitor-DNA und „Del“ steht für die eine Deletion beinhaltende Kompetitor-DNA.

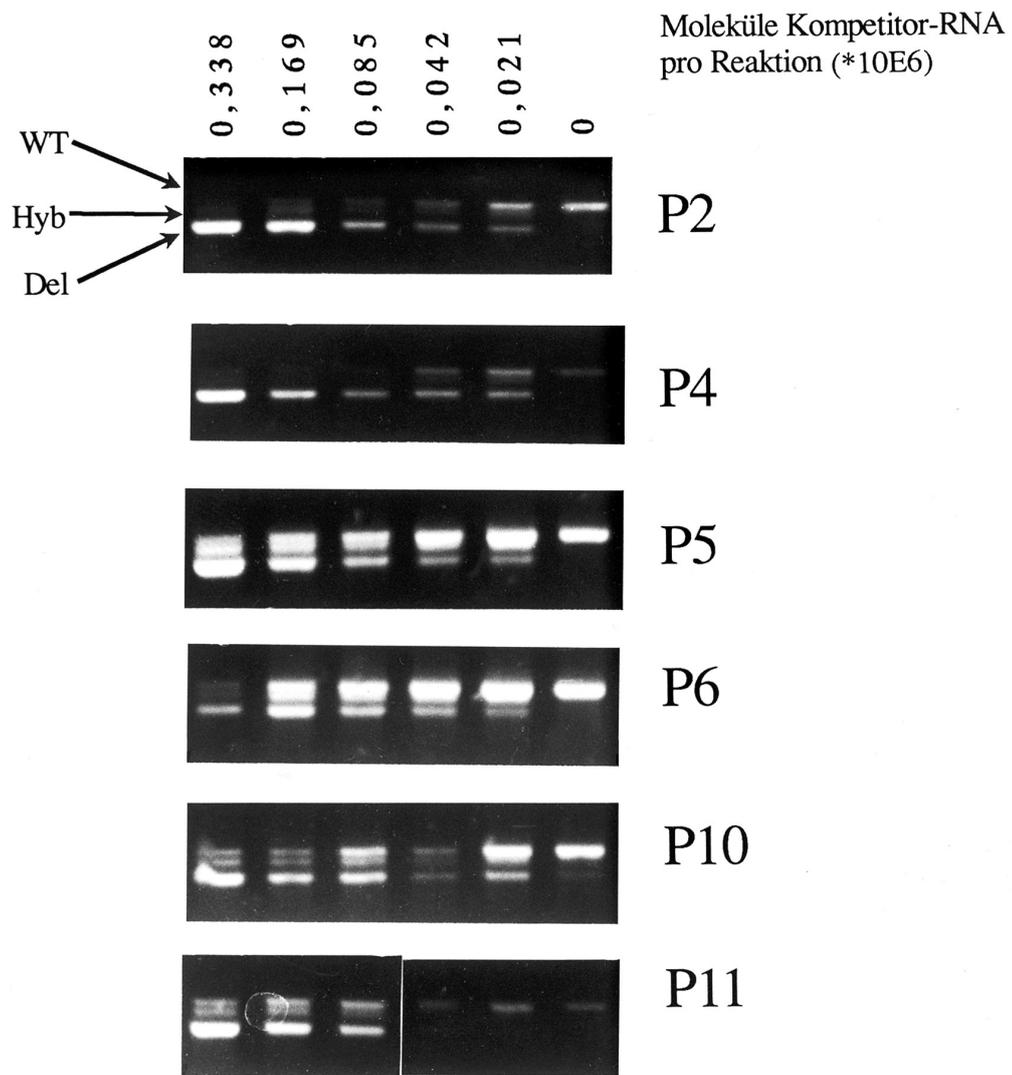


Abbildung 3.6: Ergebnisse der CRT-PCR der Tumoren der behandelten Tiere (P) Nr. 2, 4, 5, 6, 10 und 11.  
Erklärungen und Legende s. Abb. 3.5.

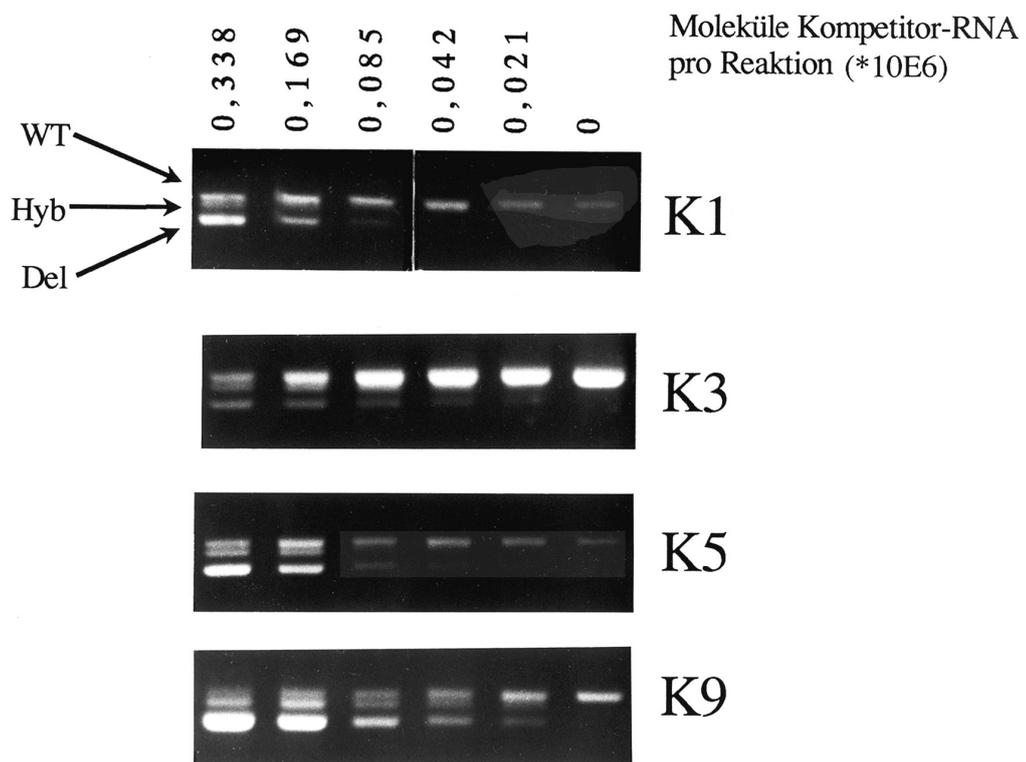


Abb. 3.7: Ergebnisse der cRT-PCR der Tumoren der Kontrolltiere (K) Nr. 1, 3, 5 und 9. Erklärungen und Legende s. Abb. 3.5.

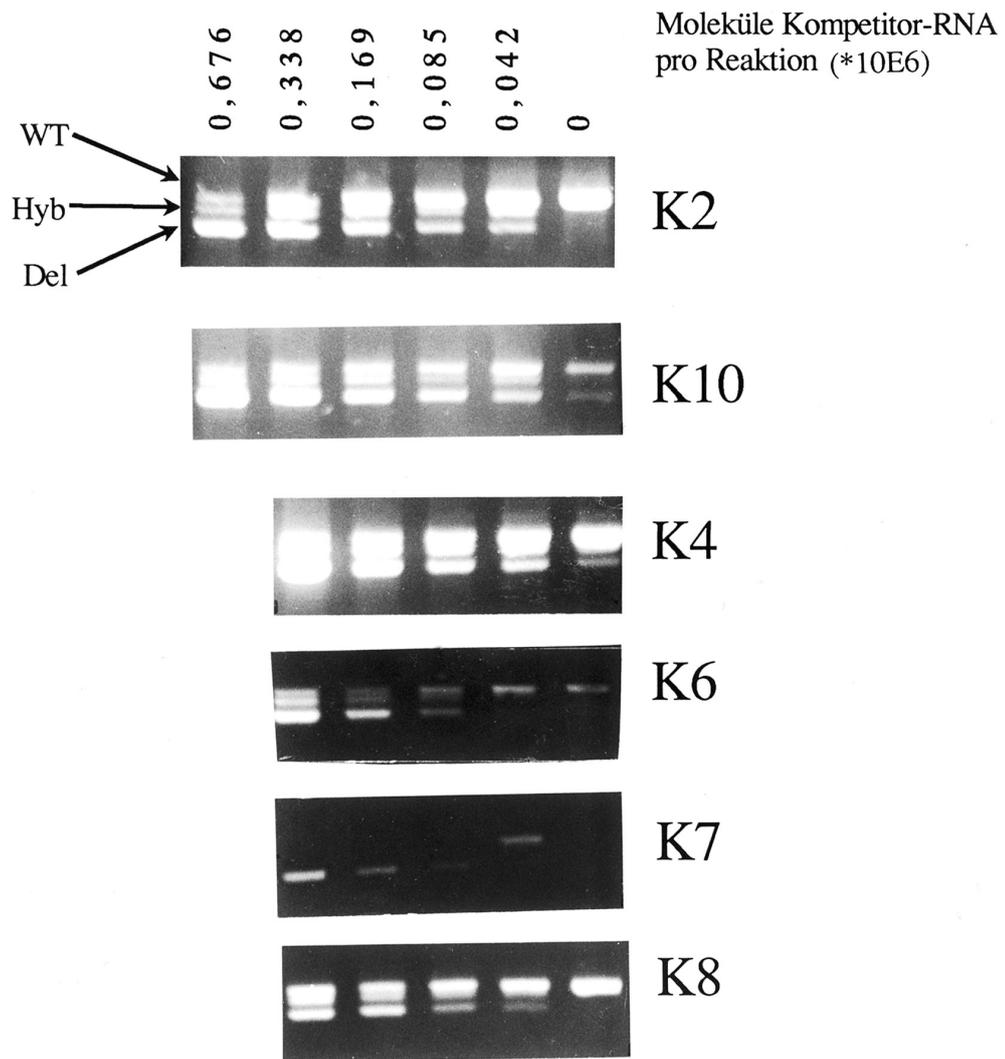


Abbildung 3.8: Ergebnisse der cRT-PCR der Tumoren der Kontrolltiere (K) Nr. 2, 4, 6, 7, 8 und 10.  
Erklärungen und Legende s. Abb. 3.5.

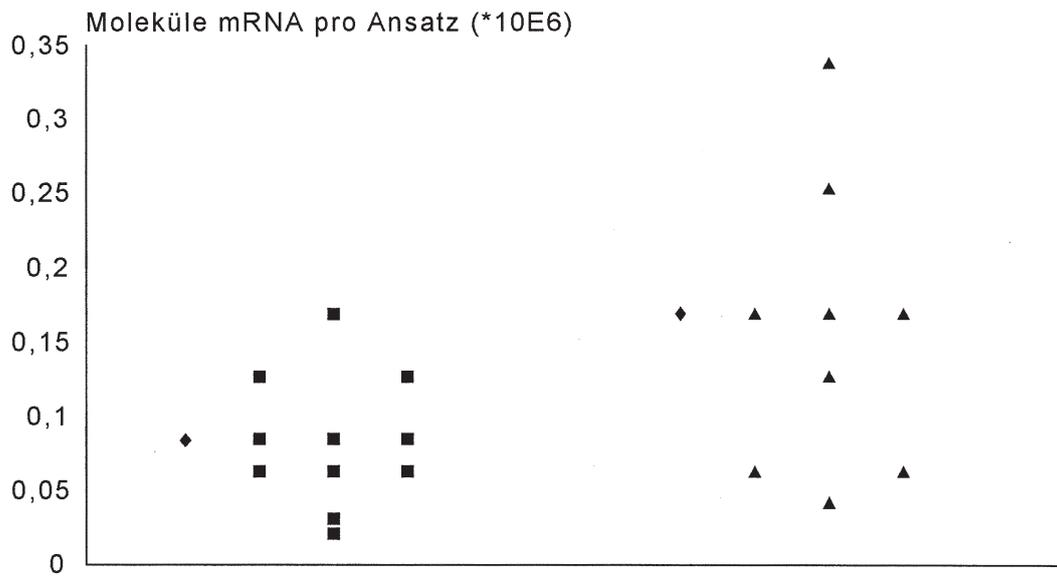


Abbildung 3.9: Anzahl der HMG-CoA-Reduktase-mRNA Moleküle pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, ermittelt aus den rechtsseitig lokalisierten Tumoren der behandelten (Quadrate) und der Kontrolltiere (Dreiecke). Die Rauten markieren das arithmetische Mittel.

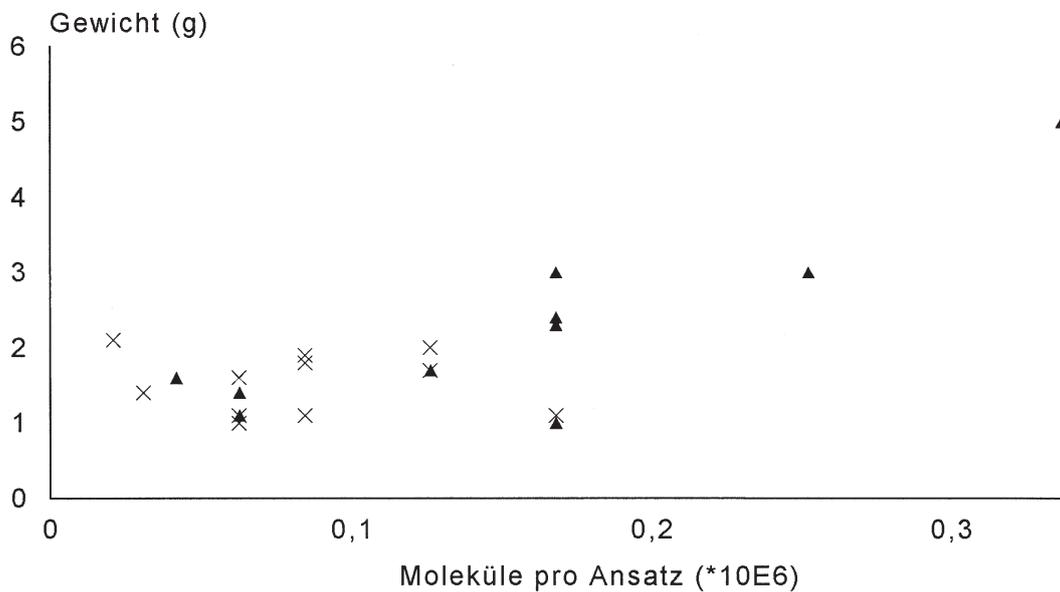


Abbildung 3.10: Zusammenhang zwischen dem Tumorgewicht und der Expression der HMG-CoA-Reduktase-mRNA.

Kreuze:            Behandlungsgruppe  
 Dreiecke:         Kontrollgruppe

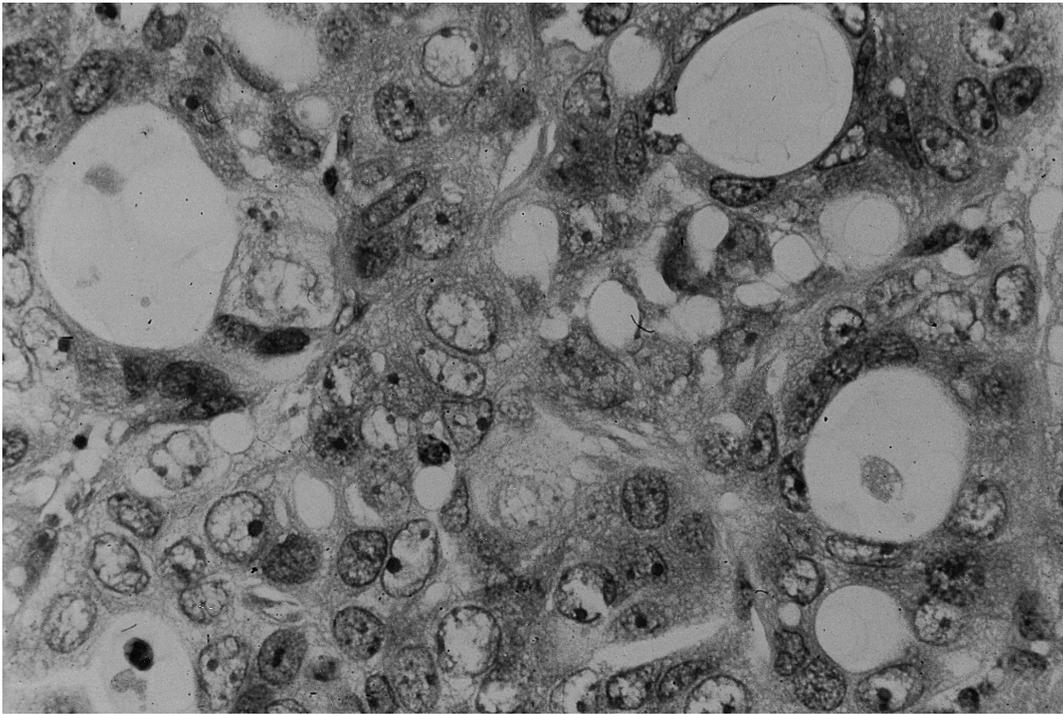


Abbildung 3.11: Originalschnitt vom Tumorsektat (HE, 200fach vergrößert).

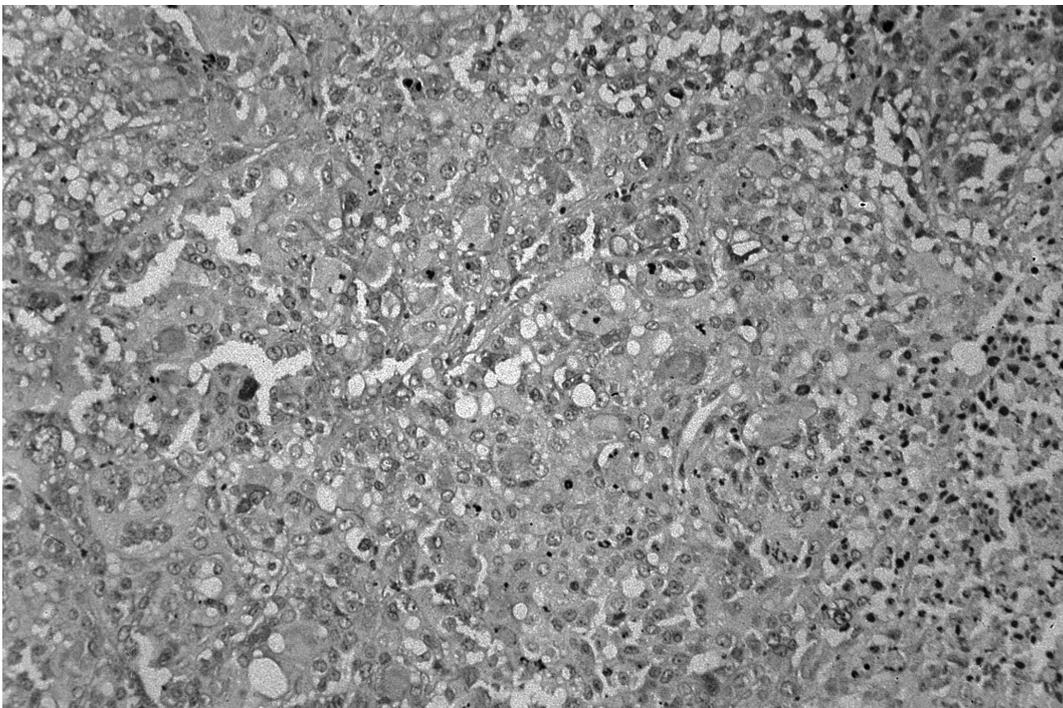


Abbildung 3.12: Der Tumor 160/91 nach mehreren Passagen auf der Nacktmaus (PAS, 125fach vergrößert).

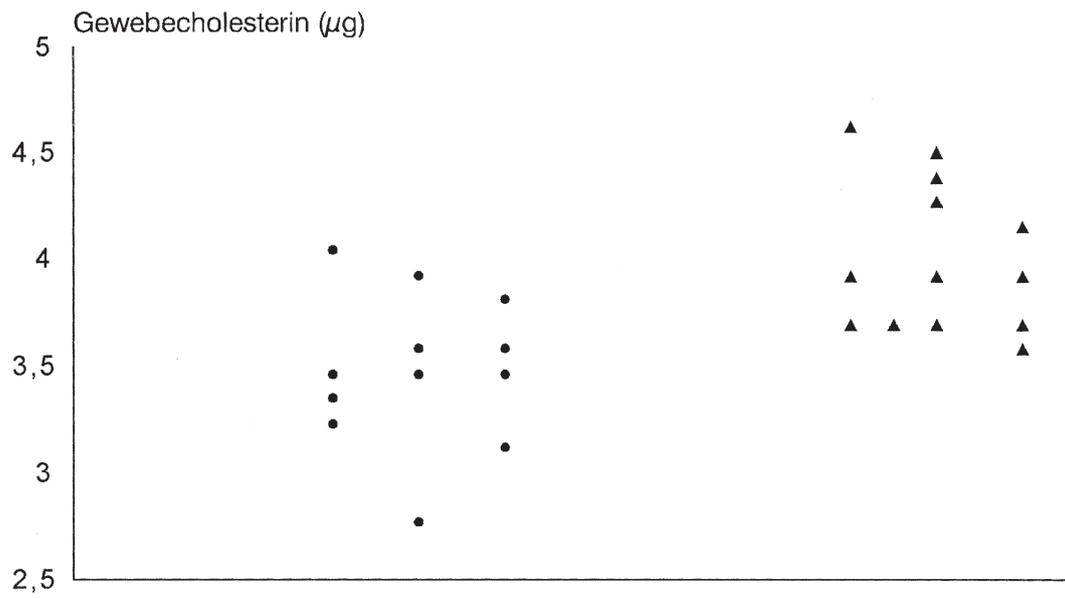


Abbildung 3.13: Unterschied im Gewebe-Cholesteringehalt der behandelten (Kreise) und der Kontrolltiere (Dreiecke)

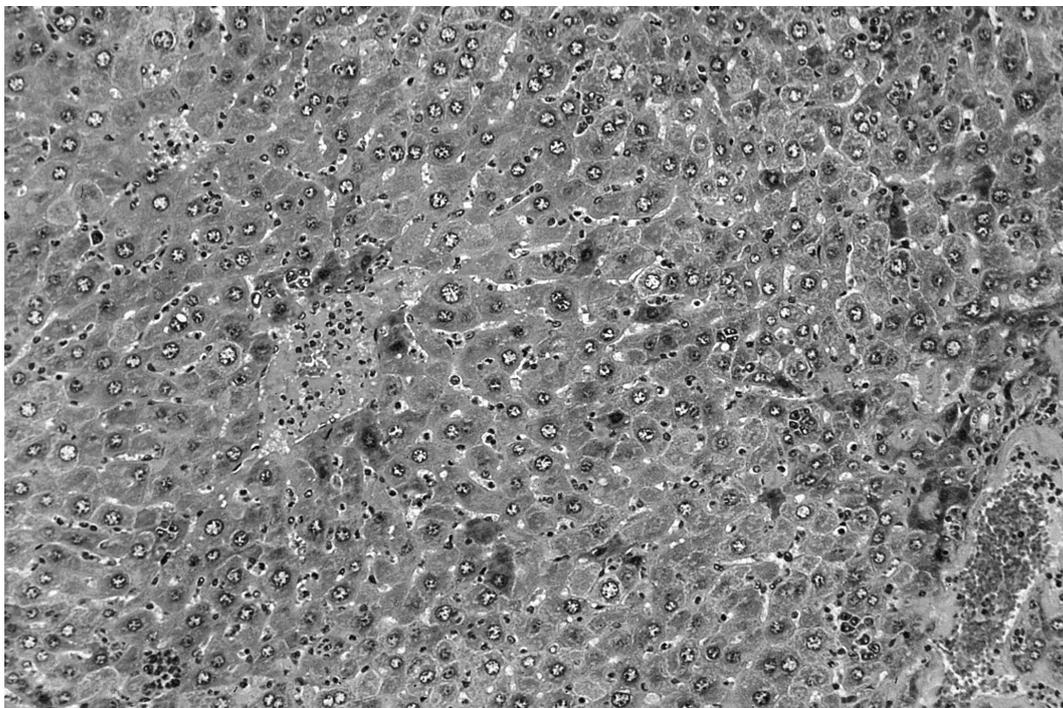


Abbildung 3.14: Leber eines mit Pravastatin behandelten Tieres aus Versuch 3: Keine extramedulläre Blutbildung, kaum amyloidoide Ablagerungen (HE, 125fach vergrößert).

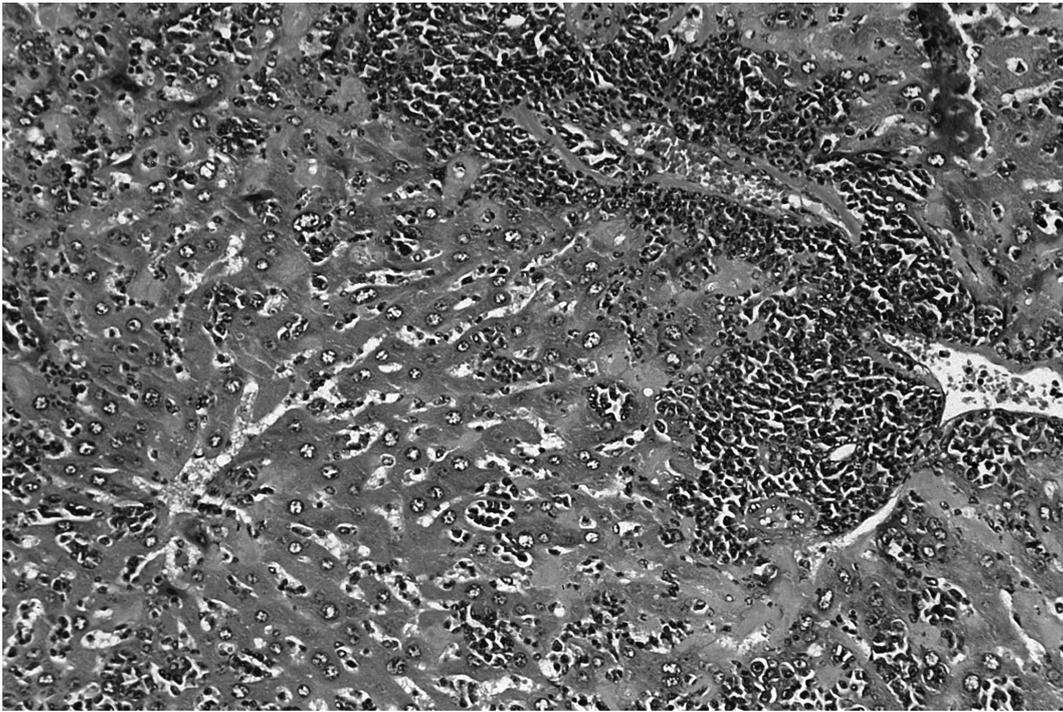


Abbildung 3.15: Leber eines anderen, behandelten Tieres aus Versuch 3: Blutbildung füllt fast das gesamte Portalfeld aus, kleinere Herde extramedullärer Blutbildung sind zwischen den Hepatozyten zu sehen (HE, 125fach vergrößert).

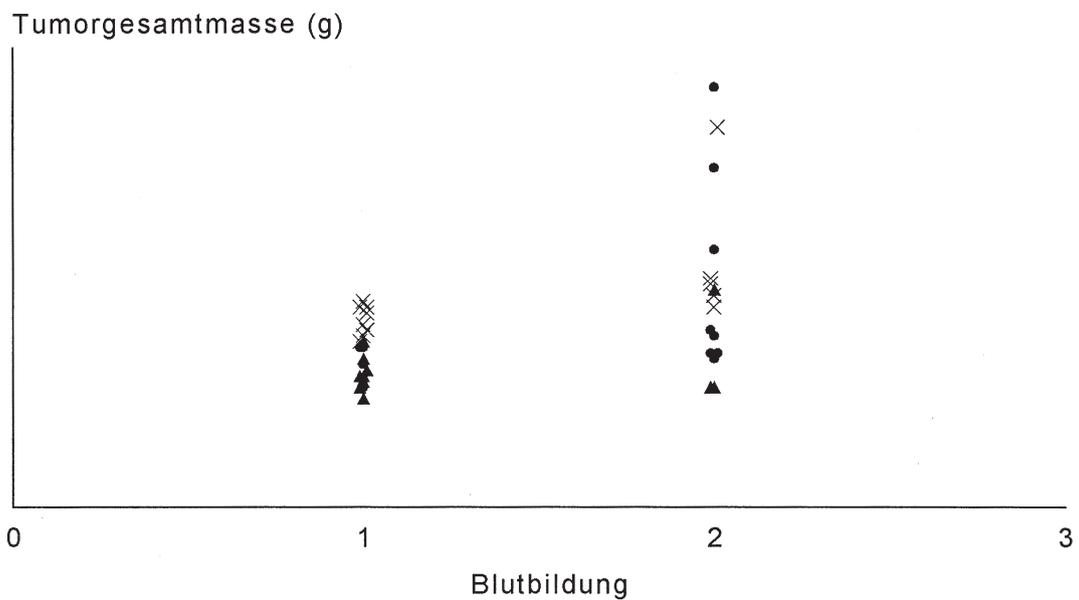


Abbildung 3.16: Zusammenhang zwischen dem Flächenanteil an extramedullärer Blutbildung in der Leber ( 1: gering ausgeprägt, 2: mittelgradig ausgeprägt, 3: stark ausgeprägt) und der Gesamt-Tumormasse bei den Kontrolltieren aus den Versuchen 1 (Kreise), 2 (Dreiecke) und 3 (Kreuze).

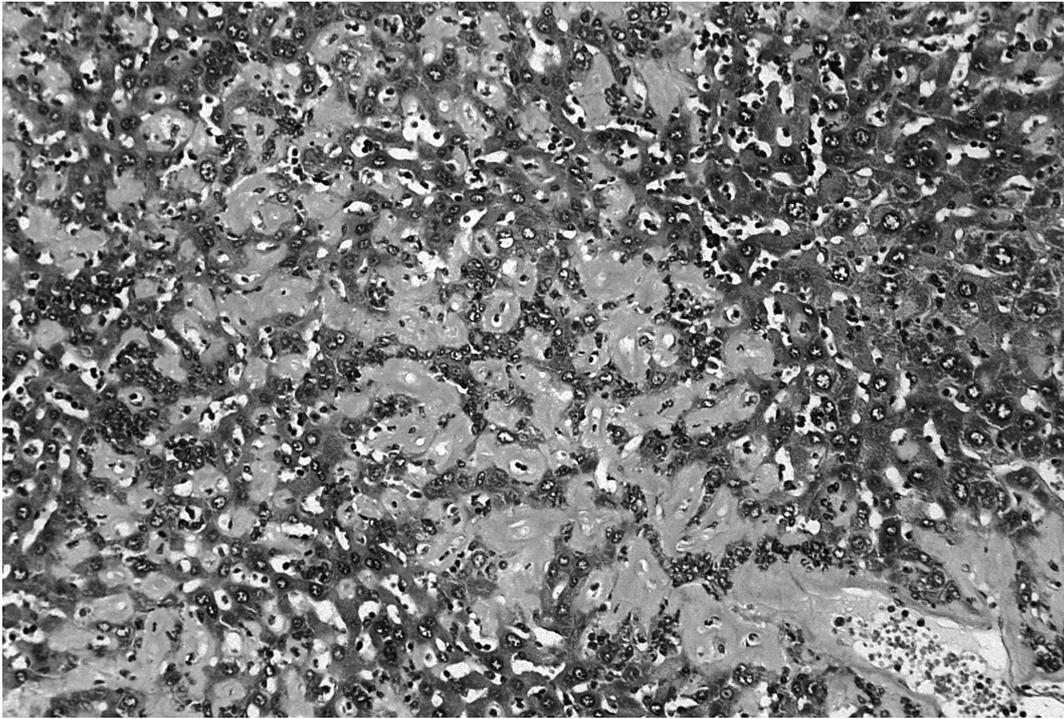


Abbildung 3.17: Massive Einlagerung von amyloidem Material in den Lebersinusoiden eines weiteren behandelten Tieres aus Versuch 3 (HE, 125 vergrößert).

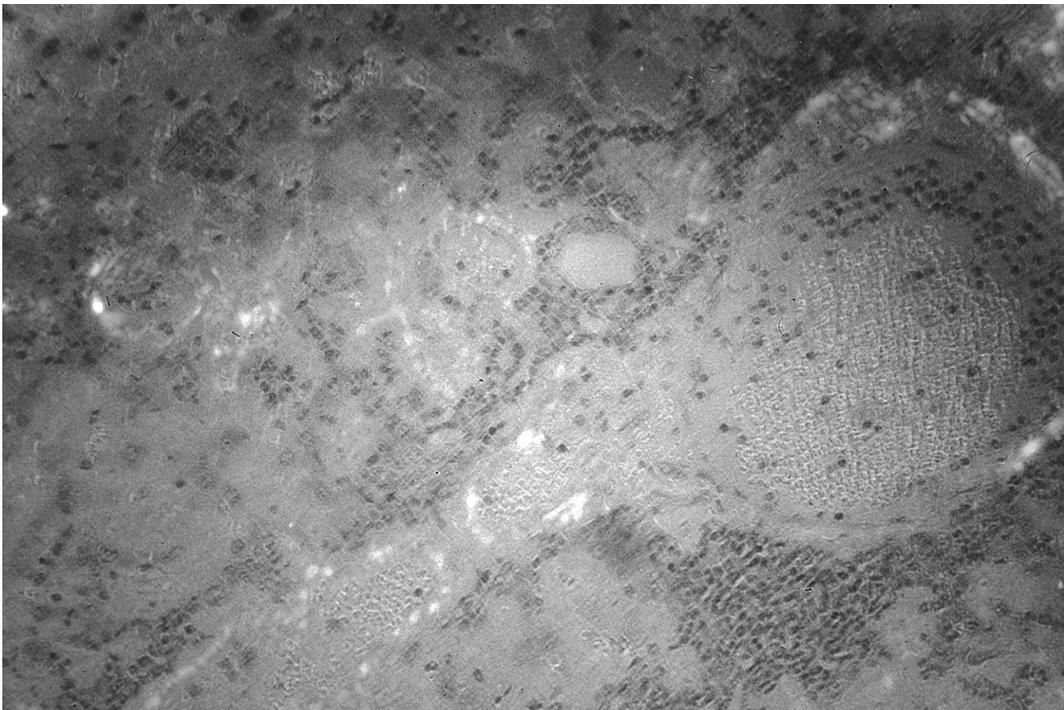


Abbildung 3.18: Leber eines mit Pravastatin behandelten Tieres. Nachweis von Amyloid als helle Konturen im polarisierten Licht (Kongorot-Färbung, 200fach vergr.)

**Tabelle 1**

Gewicht, Datum der Tötung und Cholesterinwerte der Tiere aus Versuch 1.

Tier Nr.	Gew. (g) (nach Tötung)	Getötet am	Cholesterin	
			im Serum Versuchs- anfang	(mg/dl) Versuchs- ende
P1	28	<b>29.12.92***</b>	115	78
P2	28	12.1.93	109	55
P3	27	12.1.93	120	66
P4	<i>n. e.*</i>	12.1.93	103	<i>n. e.</i>
P5	24	12.1.93	109	106
P6	25	12.1.93	107	86
P7	<i>n. e.</i>	12.1.93	100	108
P8	23	12.1.93	111	67
P9	<i>n. e.</i>	<b>2.1.93</b>	104	<i>n. e.</i>
P10	<i>n. e.</i>	12.1.93	96	<i>n. e.</i>
P11	21	12.1.93	114	91
P12	27	12.1.93	103	55
P13	22	<b>29.12.92</b>	122	83
P14	22	12.1.93	109	62
P15	25	12.1.93	86	50
K1	23	12.1.93	109	305
K2	22	12.1.93	131	171
K3	26	12.1.93	93	136
K4	23	12.1.93	101	131
K5	26	<b>29.12.92</b>	109	136
K6	28	<b>29.12.92</b>	128	95
K7	22	12.1.93	131	224
K8	25	12.1.93	115	83
K9	fehlt**			
K10	31	12.1.93	109	<i>n. e.</i>
K11	21	<b>29.12.92</b>	103	110
K12	24	12.1.93	127	115
K13	<i>n. e.</i>	<b>10.1.93</b>	122	<i>n. e.</i>
K14	23	<b>29.12.92</b>	100	63
K15	20	<b>29.12.92</b>	127	193

\*: nicht ermittelt; \*\*: Dieses Tier ist in den ersten Versuchstagen verlorengegangen, folglich konnten keine Parameter ermittelt werden; \*\*\*: Die Todesdaten vorzeitig verstorbener Tiere sind fettgedruckt.

**Tabelle 1 (Fortsetzung)**

Tumorum volumina nach 6 Wochen, dem Zeitpunkt, als noch alle Tiere aus Versuch 1 am Leben waren und Abschlußparameter links

Tier Nr.	Tumor re. Vol. (cmm) (6.Woche)	Tumor li Vol. (cmm) (6.Woche)	Tumor li. Gew. (g) (Abschluß)	Vol. (cmm) (Abschluß)
P1	1352	1800	1,3	<i>n. e.</i>
P2	665	416	1,8	648
P3	1080	0	#	#
P4	726	1267	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
P5	550	1098	2,3	2688
P6	486	550	1,9	1960
P7	#****	1267	3,5	3179
P8	108	607	2	1775
P9	550	480	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
P10	392	1150	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
P11	108	0	0,2	256
P12	907	0	#	#
P13	446	1267	2	<i>n. e.</i>
P14	256	0	0,5	269
P15	1183	180	0,7	2058
K1	936	900	1,5	1775
K2	126	726	2,6	2890
K3	800	850	3,1	3726
K4	1080	446	0,8	1521
K5	1521	1008	1,2	<i>n. e.</i>
K6	2688	4200	4,3	<i>n. e.</i>
K7	1080	526	1,1	1521
K8	550	650	1,6	2176
K9	fehlt			
K10	864	936	1,4	2432
K11	1267	1183	1	<i>n. e.</i>
K12	1080	162	3,3	1521
K13	800	1008	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
K14	1352	446	0,7	<i>n. e.</i>
K15	1183	1008	1,2	<i>n. e.</i>

\*\*\*\*: Diese Tumoren waren nicht angewachsen.

**Tabelle 1** (Fortsetzung)

Tumorparameter rechts nach Abschluß von Versuch 1.

Tier Nr.	Tumor re. Gew. (g) (Abschluß)	Vol. (cmm) (Abschluß)	Anteil an vitalem Gewebe
P1	1,3	<i>n. e.</i>	++
P2	2	2890	+
P3	3,1	1775	++
P4	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
P5	1,2	1352	++
P6	2,1	750	++
P7	#	#	+
P8	0,4	343	++
P9	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
P10	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
P11	0,1	221	+++
P12	1,7	2137	++
P13	0,4	<i>n. e.</i>	++
P14	1	700	++
P15	2,4	1862	++
K1	1,3	1352	++
K2	0,5	392	+
K3	1,4	1512	++
K4	1,9	2176	++
K5	1,3	<i>n. e.</i>	++
K6	3	<i>n. e.</i>	+++
K7	1,9	1690	++
K8	1	1436	++
K9	fehlt		
K10	1,8	2362	<i>n.e.</i>
K11	1,7	1764	+++
K12	2,6	<i>n. e.</i>	+
K13	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
K14	1,4	<i>n. e.</i>	++
K15	1,6	<i>n. e.</i>	++

+ : weniger als ein Drittel vitales Tumorgewebe

++ : ein bis zwei Drittel vitales Tumorgewebe

+++ : mehr als zwei Drittel vitales Tumorgewebe

**Tabelle 1** (Fortsetzung)

Leberparameter nach Abschluß von Versuch 1

	Leber Gew (g) (Abschluß)	Ausprägung der Blutb.	Ausprägung Amylodoid
P1	1,7	*	*
P2	1,7	***	*
P3	1	**	*
P4	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
P5	2,3	**	*
P6	2,8	***	*
P7	2,9	**	*
P8	2,4	*	*
P9	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
P10	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
P11	1,2	*	*
P12	2,5	**	*
P13	1,8	**	*
P14	1,8	**	*
P15	2	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K1	1,7	*	*
K2	1,8	**	*
K3	2,2	**	**
K4	2,2	**	*
K5	2,3	*	*
K6	2,3	**	*
K7	2,6	**	*
K8	2,6	**	*
K9	fehlt		
K10	3,7	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K11	1,3	**	*
K12	1,9	**	*
K13	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K14	1,8	*	*
K15	2,2	*	*

\*:gering ausgeprägt; \*\*:mittelgradig ausgeprägt; \*\*\*:stark ausgeprägt

**Tabelle 2**

Gewicht, Datum der Tötung und Cholesterinwerte der Tiere aus Versuch 2.

Tier Nr.	Gew. (g) (nach Tötung)	Getötet am	Cholesterin	
			im Serum Versuchs- anfang	(mg/dl) Versuchs- ende
P1	22	12.1.93	<i>n. e.</i>	127
P2	22	12.1.93	"	213
P3	22	12.1.93	"	78
P4	21	12.1.93	"	50
P5	21	12.1.93	"	85
P6	21	12.29.93	"	78
P7	19	12.1.93	"	120
P8	25	12.1.93	"	99
P9	25	<b>29.12.92</b>	"	50
P10	25	12.1.93	"	87
P11	23	12.1.93	"	76
P12	22	12.1.93	"	136
P13	19	12.1.93	"	97
P14	16	12.1.93	"	70
P15	22	12.1.93	"	88
K1	22	12.1.93	"	232
K2	22	12.1.93	"	81
K3	24	12.1.93	"	195
K4	27	12.1.93	"	138
K5	<i>n. e.</i>	<b>10.1.93</b>	"	<i>n. e.</i>
K6	21	<b>29.12.92</b>	"	92
K7	22	<b>29.12.92</b>	"	118
K8	21	12.1.93	"	426!
K9	<i>n. e.</i>	12.1.93	"	<i>n. e.</i>
K10	18	12.1.93	"	83
K11	22	<b>29.12.92</b>	"	270
K12	<i>n. e.</i>	<b>11.1.93</b>	"	<i>n. e.</i>
K13	<i>n. e.</i>	12.1.93	"	<i>n. e.</i>
K14	19	12.1.93	"	230
K15	23	12.1.93	"	131

**Tabelle 2 (Fortsetzung)**

Tumorum volumina der vierten Woche, dem Zeitpunkt, als in Versuch 2 noch alle Tiere lebten und Abschlußparameter des linken Tumors.

<b>Tier</b>	<b>Tumorvol. re</b>	<b>Tumorvol. li</b>	<b>Tumor li.</b>	
<b>Nr.</b>	<b>(4.Woche)</b>	<b>(4.Woche)</b>	<b>Gew (g)</b>	<b>Vol (cmm)</b>
	<b>(cmm)</b>	<b>(cmm)</b>	<b>(Abschluß)</b>	<b>(Abschluß)</b>
<b>P1</b>	1008	550	0,8	1080
<b>P2</b>	1912	288	0,8	1089
<b>P3</b>	550	405	0,9	786
<b>P4</b>	448	288	0,5	486
<b>P5</b>	544	446	0,6	700
<b>P6</b>	1008	196	0,3	<i>n. e.</i>
<b>P7</b>	847	486	1,2	672
<b>P8</b>	847	665	1	1666
<b>P9</b>	936	405	0,6	<i>n. e.</i>
<b>P10</b>	550	600	1	1605
<b>P11</b>	607	500	0,9	786
<b>P12</b>	448	1008	2	3323
<b>P13</b>	1152	750	1,7	1089
<b>P14</b>	550	650	1,1	1271
<b>P15</b>	256	384	0,5	2137
<b>K1</b>	726	600	1	1271
<b>K2</b>	1436	256	0,6	968
<b>K3</b>	1687	288	0,5	600
<b>K4</b>	968	1267	2,3	2700
<b>K5</b>	864	968	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
<b>K6</b>	2304	550	1,3	<i>n. e.</i>
<b>K7</b>	1296	1470	1,7	<i>n. e.</i>
<b>K8</b>	405	726	0,9	1436
<b>K9</b>	936	726	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
<b>K10</b>	1183	864	1,2	<i>n. e.</i>
<b>K11</b>	665	1436	1,1	<i>n. e.</i>
<b>K12</b>	968	600	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
<b>K13</b>	1008	550	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>
<b>K14</b>	786	500	0,9	1149
<b>K15</b>	936	500	0,9	1028

**Tabelle 2 (Fortsetzung)**

Tumorparameter rechts nach Abschluß von Versuch 2

Tier Nr.	Tumor re. Gew (g) (Abschluß)	Vol (cmm) (Abschluß)	Anteil vitales Gewebe
P1	1,8	2688	<i>n.e.</i>
P2	2,3	2700	<i>n.e.</i>
P3	0,6	950	+
P4	0,9	1050	<i>n.e.</i>
P5	1	1200	++
P6	1,4	<i>n. e.</i>	+++
P7	0,9	1352	++
P8	1,6	2250	<i>n.e.</i>
P9	1,4	<i>n. e.</i>	+++
P10	0,8	850	+
P11	1	1149	<i>n.e.</i>
P12	0,9	1568	+
P13	0,9	2250	+
P14	1,2	1224	+
P15	1,2	600	<i>n.e.</i>
K1	1,3	2048	++
K2	1,8	2058	++
K3	1,8	2058	++
K4	1,5	2156	++
K5	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
K6	1,3	<i>n. e.</i>	++
K7	1,2	<i>n. e.</i>	++
K8	1,2	1862	++
K9	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
K10	1	<i>n. e.</i>	++
K11	0,8	<i>n. e.</i>	+++
K12	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
K13	<i>n. e.</i>	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>
K14	1	1521	++
K15	1,2	2025	++

+: weniger als ein Drittel vitales Tumorgewebe

++: ein bis zwei Drittel vitales Tumorgewebe

+++ : mehr als zwei Drittel vitales Tumorgewebe

**Tabelle 2** (Fortsetzung)

Leberparameter nach Abschluß von Versuch 2

Tier Nr.	Leber Gew. (g) (Abschluß)	Anteil Blutbildung	Anteil Amyloid
P1	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
P2	2	*	*
P3	1,8	*	*
P4	2,2	**	*
P5	1,9	*	*
P6	2	*	*
P7	1,6	*	*
P8	2,3	*	*
P9	1,9	**	*
P10	1,9	*	*
P11	1,8	*	*
P12	2	*	*
P13	1,6	**	*
P14	1,6	**	*
P15	2,1	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K1	2,2	*	*
K2	2	*	*
K3	2,5	*	*
K4	2,8	**	*
K5	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K6	1,7	*	*
K7	2	*	*
K8	2,2	**	*
K9	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K10	1,9	*	*
K11	1,2	*	*
K12	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K13	<i>n. e.</i>	<i>n.e.</i>	<i>n.e.</i>
K14	1,9	*	*
K15	2,2	**	*

\*:gering ausgeprägt; \*\*:mittelgradig ausgeprägt; \*\*\*:stark ausgeprägt

### **Tabelle 3**

Abschlußgewicht und Überlebenszeiten der Tiere aus Versuch 3.

<b>Tier Nr.</b>	<b>Gew. (g) (nach Tötung)</b>	<b>Get. am</b>	<b>Überlebens- zeit  (Tage nach Behandlungs- beginn)</b>
<b>P1</b>	28	9.24.93	42
<b>P2</b>	27	9.19.93	37
<b>P3</b>	27	9.19.93	37
<b>P4</b>	25	9.24.93	42
<b>P5</b>	30	10.7.93	55
<b>P6</b>	28	9.24.93	42
<b>P7</b>	28	9.19.93	37
<b>P8</b>	28	9.24.93	42
<b>P9</b>	32	10.7.93	55
<b>P10</b>	22	9.19.93	37
<b>P11</b>	22	9.24.93	42
<b>P12</b>	24	1.10.93	49
<b>P13</b>	32	9.24.93	42
<b>K1</b>	28	9.18.93	36
<b>K2</b>	28	9.24.93	42
<b>K3</b>	29	9.24.93	42
<b>K4</b>	23	10.1.93	49
<b>K5</b>	27	9.18.93	36
<b>K6</b>	27	9.18.93	36
<b>K7</b>	28	10.1.93	49
<b>K8</b>	29	9.12.93	30
<b>K9</b>	25	9.24.93	42
<b>K10</b>	31	9.18.93	36
<b>K11</b>	26	9.6.93	24
<b>K12</b>	24	9.12.93	30
<b>K13</b>	24	9.18.93	36

**Tabelle 3** (Fortsetzung)

Serumcholesterin und Abschlußparameter der rechten Tumoren.

Tier Nr.	Cholesterin		Tumor re.	
	Serum Versuchs- anfang	(mg/dl) Versuchs- ende	Gew. (g)	Vol. (cmm)
P1	110	140	1,4	<b>2587</b>
P2	116	115	1,4	<b>2746</b>
P3	145	71	1,1	1352
P4	88	124	2,1	<b>2700</b>
P5	104	90	2	<b>2944</b>
P6	101	96	1,1	1912
P7	118	89	0,9	1000
P8	101	86	1,8	<b>3072</b>
P9	108	90	1,7	2362
P10	91	94	1,1	1352
P11	109	86	1,6	<b>3240</b>
P12	114	195	1	1352
P13	109	105	1,9	2450
K1	105	134	2,4	<b>2944</b>
K2	106	63	3	<b>3035</b>
K3	97	94	5	<b>10580</b>
K4	111	108	2,3	1960
K5	104	67	1,7	<b>3757</b>
K6	105	107	1	850
K7	95	108	1,4	2176
K8	97	80	3	<b>3200</b>
K9	109	125	1,6	<b>3035</b>
K10	95	155	1,1	1436
K11	93	83	1,8	<b>3035</b>
K12	92	73	1,7	<b>5000</b>
K13	97	153	2	<b>3456</b>

### Tabelle 3 (Fortsetzung)

Tumorparameter rechts nach Abschluß von Versuch 3.

Tier Nr.	Cholesterin im Tumor (ug/mg)	HMG-CoA- Reduktase- mRNA  (Anzahl Moleküle pro µg Gesamt RNA*10 <sup>6</sup> )	Flächenanteil an vit. Gewebe
P1	2,31	<0,042	+++
P2	2,54	0,031	++
P3	3,81	0,063	++
P4	2,77	0,021	+
P5	1,73	0,169	+++
P6	3,23	0,169	++
P7	1,85	<i>n. e.</i>	++
P8	2,08	0,063	++
P9	2,31	0,169	+++
P10	2,77	0,084	++
P11	3	0,084	+
P12	3,23	0,084	++
P13	<i>n. e.</i>	0,084	+++
K1	2,42	0,169	+
K2	3,81	0,253	++
K3	2,88	0,338	++
K4	2,54	0,169	+
K5	2,77	0,169	++
K6	2,42	0,084	+++
K7	<i>n. e.</i>	0,063	++
K8	1,96	0,169	++
K9	2,77	0,084	++
K10	3,58	0,169	++
K11	1,85	<i>n. e.</i>	++
K12	1,85	<i>n. e.</i>	++
K13	1,62	<i>n. e.</i>	+++

+: weniger als ein Drittel vitales Tumorgewebe

++: ein bis zwei Drittel vitales Tumorgewebe

+++ : mehr als zwei Drittel vitales Tumorgewebe

### **Tabelle 3** (Fortsetzung)

Tumorparameter links nach Abschluß von Versuch 3.

Tier Nr.	Tumor li.	Vol (cmm)
	Gew (g)	
P1	1,4	2176
P2	0,5	1368
P3	2,3	<b>4513</b>
P4	0,6	1436
P5	1,5	<b>2816</b>
P6	2,3	<b>2746</b>
P7	2,4	<b>2944</b>
P8	1,4	1470
P9	2,5	<b>2816</b>
P10	2,3	<b>2746</b>
P11	1,3	1267
P12	2,5	<b>2587</b>
P13	2	<b>2746</b>
K1	1,6	1470
K2	0,5	605
K3	1,6	2362
K4	1,6	<b>2746</b>
K5	1,5	1224
K6	2,5	<b>3240</b>
K7	2,1	<b>3324</b>
K8	0,6	567
K9	1,4	1862
K10	2,3	<b>2816</b>
K11	1,1	650
K12	1,4	1690
K13	1,7	1944

**Tabelle 3** (Fortsetzung)

Leberparameter nach Abschluß von Versuch 3.

Tier Nr.	Leber Gew. (g)	Cholesterin in der Leber (ug/mg)	Blutbildung in der Leber	Amylo- doid
P1	2,6	3,23	*	*
P2	2,4	3,92	*	*
P3	2,3	3,58	***	**
P4	2,2	3,46	*	*
P5	3,2	3,46	***	**
P6	2,7	3,58	*	*
P7	2,3	4,04	*	**
P8	3,7	3,12	***	**
P9	3,3	3,46	**	***
P10	2,3	3,35	*	*
P11	2	3,92	**	*
P12	2,4	3,81	*	*
P13	3	2,77	*	*
K1	3,7	3,69	**	**
K2	3,4	4,38	**	*
K3	3,3	3,69	**	*
K4	2	3,69	**	*
K5	2,7	3,58	*	*
K6	2,3	4,62	*	*
K7	3,5	3,92	*	*
K8	2,6	3,92	*	*
K9	2	4,15	*	*
K10	3,6	4,5	*	**
K11	1,8	3,92	*	*
K12	2	3,69	*	*
K13	3	4,27	**	***

\*:gering ausgeprägt;  
ausgeprägt

\*\*:mittelgradig ausgeprägt;

\*\*\*:stark

## 4 Diskussion

### 4.1 Tumorgewichte und Überlebenszeiten

In den Versuchen 1 und 2 konnten nach einer Versuchsdauer von sechs bzw. vier Wochen signifikant schwerere Tumoren bei den nicht behandelten gegenüber den behandelten Tieren nachgewiesen werden. Dieser Gewichtsunterschied wird zu Versuchsende hin deswegen unerheblich, weil immer mehr der nicht behandelten Tiere wegen ihrer zu großen Tumoren getötet werden mußten und damit eine ungewollte Auslese getroffen wurde. Deswegen wurde in Versuch 3 eine „Überlebenszeit“ als diejenige Zeit definiert, die von Versuchsbeginn bis zum Erreichen eines Tumolvolumens von 2500 cmm auf einer der Seiten verstrich. Die daraus konstruierte Überlebenszeit-Darstellung nach Kaplan-Meyer zeigt eine signifikant längere mittlere Überlebenszeit bei den mit Pravastatin behandelten Tieren, wie sie auch an Ratten beobachtet wurde (Kawata et al., 1992). An Nacktmäusen ließ sich ebenfalls eine Wachstumshemmung von humanen Tumorzellen durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase nachweisen, allerdings hier mit Lovastatin (Sumi et al., 1992; siehe Einleitung).

Die Ursache dieser Wachstumshemmung ist bis heute nicht geklärt. Die meisten Autoren favorisieren die Theorie, daß der Mangel an nicht steroidal Mevalonatderivaten für die Inhibition verantwortlich ist (Maltese et al., 1985). Insbesondere die verminderte posttranslationelle Isoprenylierung von Proteinen der Ras-Familie könnte eine zentrale Bedeutung zukommen (Kawata et al., 1992; Sumi et al., 1992).

Aber auch der Mangel an Cholesterin selbst wird von manchen Autoren als Ursache des verlangsamten Tumorstwachstums angesehen: Bei subkutaner Injektion von humanen Tumorzellen in Ratten wuchsen die Tumoren auf den Ratten mit den höchsten Serumcholesterin-Spiegeln am schnellsten (Schneider et al., 1980). Mit Lovastatin behandelte Hepatom-Zellkulturen verändern sich morphologisch dahingehend, daß sie weniger Zytoplasmaausläufer haben und ihre Fähigkeit zur Adhäsion zu verlieren scheinen. Dies könnte Ausdruck einer gestörten Membranfunktion infolge des Cholesterinmangels sein (Buchwald, 1992).

### 4.2 HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression im Tumorgewebe

Bei allen Versuchen wurde die HMG-CoA-Reduktase-mRNA Expression im Tumorgewebe mit Hilfe der cRT-PCR quantitativ ermittelt. Hier-

bei wurde ausschließlich die mRNA humanen Ursprunges erfaßt, da die mRNA der Maus mit den verwendeten Primern nicht amplifiziert werden kann. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch in den Tumor eingewanderte Entzündungs- oder Bindegewebszellen ist somit ausgeschlossen.

Bei den Versuchen 1 und 2 waren die Ergebnisse nicht nachvollziehbar, so daß auf eine Darstellung oder gar Bewertung derselben verzichtet wurde. Die Ergebnisse aus Versuch 3 zeigen einen höheren mittleren HMG-CoA-mRNA Spiegel in den Tumoren der Kontrolltiere. Diese Tatsache ist bemerkenswert, denn eigentlich war zu erwarten, daß die kompetitive Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase durch Pravastatin zu einer Hochregulation der entsprechenden mRNA führt. Maltese und Mitarbeiter haben in ihrer Übersichtsarbeit über den Mevalonat-Syntheseweg diese Rückkoppelung durch das Cholesterin beschrieben: Niedrige intrazelluläre Cholesterin-Konzentration führt zu erhöhter mRNA-Synthese für den LDL-Rezeptor und die HMG-CoA-Reduktase (Maltese et al., 1991).

Bei in vitro Versuchen mit Tumorzellkulturen führt die Zugabe von Pravastatin ebenfalls zu einer Hochregulation der HMG-CoA-Reduktase-mRNA (Gebhardt und Niendorf, 1994). Die Tatsache, daß in dieser Arbeit eine verminderte Transkription unter Pravastatin stattfindet, könnte zwei Ursachen haben:

Erstens könnte durch die plötzliche Einwirkung dieser extrem hohen Dosen Pravastatin eine Selektion unter den Tumorzellen dahingehend stattfinden, daß diejenigen Zellen mit einem ohnehin langsamen Wachstum und somit auch geringerer mRNA-Expression (s.u.) überleben.

Zweitens könnten diejenigen Tumorzellen selektiert werden, die flexibler auf den durch Pravastatin induzierten „Streß“ reagieren können und in der Lage sind, mit supprimiertem Enzym-Spiegel zu existieren.

Beide Theorien würden auch das Phänomen erklären, daß der proliferationshemmende Effekt des HMG-CoA Reduktasehemmers in Langzeitversuchen verlorengeht (Gebhardt und Niendorf, 1995).

Bei den unbehandelten Tieren korreliert die Expression an mRNA pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA positiv mit dem Gewicht der transplantierten Tumoren. In der Gruppe der mit Pravastatin behandelten Tiere besteht diese

Korrelation deshalb nicht, weil sowie die Tumorgewichte als auch die mRNA-Mengen im Tumor bei Versuchsende durchweg im niedrigen Bereich lagen und somit keine bewertbare Kurve entstand (siehe Abb. 3.17).

Diese höhere Expression der mRNA in den stärker wachsenden Tumoren könnte Ausdruck eines vermehrten Bedarfs an steroidal oder vor allem nichtsteroidal Mevalonatprodukten sein. An einer humanen Lungenkarzinom-Zelllinie konnte gezeigt werden, daß 40% der Aktivität des Enzyms zugunsten nichtsteroidaler Metaboliten arbeitete, während es bei nicht entarteten Fibroblasten nur 15-20% waren (Bennis et al., 1993). Bei einem intrazellulären Mangel an Mevalonat -zum Beispiel durch Behandlung mit HMG-CoA Reduktasehemmern- wird dieses vermehrt in Nicht-Steroidale Isoprenoide eingebaut, während bei hohen Mevalonatkonzentrationen die Cholesterinsynthese überwiegt (Rilling et al., 1993). Diese Priorität der Isoprenoide gegenüber dem Cholesterin bei Substratmangel könnte Ausdruck der essentiellen Bedeutung ersterer für die Zellteilung sein.

Die Messung der mRNA für den LDL-Rezeptor wäre aufschlußreich gewesen, um eine eventuelle Veränderung des Bedarfs der Tumorzellen an Cholesterin selbst zu erkennen, da das aus dem Blutstrom aufgenommene Steroid nicht quantitativ zu Isoprenoiden metabolisiert wird. Es wäre somit unter Umständen eine genauere Aussage darüber möglich gewesen, ob vermehrt steroidale oder nichtsteroidale Mevalonatderivate in Tumorzellen benötigt werden. Leider ergaben die Messungen der LDL-Rezeptor-mRNA in diesen Versuchen widersprüchliche Ergebnisse, wahrscheinlich aufgrund eines unbekannt Störfaktors.

### 4.3 Cholesterin

Pravastatin hat auf das Serumcholesterin in allen drei Versuchen einen senkenden Effekt. Tsujita et al. stellten demgegenüber keine Wirkung von Pravastatin auf den Serum-Cholesterinspiegel bei Mäusen fest (Tsujita et al., 1986). In dieser Arbeit wurden jedoch wesentlich höhere Konzentrationen von Pravastatin eingesetzt als in vergleichbaren Versuchen (Kawata et al., 1992; Sumi et al., 1992) oder gar zur Therapie der Hypercholesterinämie beim Menschen (Jones et al., 1991). Sinenki et al. konnten an Zelllinien zeigen, daß das Ausmaß der HMG-CoA Reduktase-Inhibition welches nötig ist um die Isoprenylierung von p21ras und Lamin Avollständig zu verhindern circa 100fach größer

war als diejenige die nötig ist, die Cholesterinsynthese um 50% zu senken (Sinenski et al. 1990).

Im Gegensatz zur Wachstumsgeschwindigkeit wurde der Cholesteringehalt des Tumorgewebes durch das Pravastatin nicht beeinflusst. Kawata et al. stellten bei ihrem Versuch hingegen fest, daß diejenigen Tiere, welche 8mg Pravastatin pro kg Körpergewicht erhalten hatten, signifikant erniedrigte Gewebecholesterin-Gehalte im Tumor gegenüber der Kontrollgruppe hatten (Kawata et al., 1992). Der Cholesteringehalt des Lebergewebes ist in der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Dies ist Ausdruck der hohen Leberspezifität des Pravastatins (Koga et al., 1990; Yamazaki et al., 1993; Ziegler und Hummelsiep, 1993).

Das Cholesterindefizit im Lebergewebe führt über eine vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren zu einer gesteigerten Aufnahme von Cholesterin aus dem Blutstrom wie es bei in-vivo-Studien am Menschen beobachtet wurde (Reihner et al., 1990) und erklärt so die Hypocholesterinämie der behandelten Tiere zumindest zum Teil.

#### 4.4 Histologie

Bei den Blutentnahmen fiel schon makroskopisch eine massive Leukozytose der Tiere auf, ohne das Hinweise auf eine Infektion (wie z. B. Fieber) vorlagen. Als Ursache fanden sich in den Lebern aller Tiere mehr oder minder starke Blutbildungsherde, welche sich in den Dosisfindungsversuchen nicht zeigten (Daten nicht gezeigt). Sie sind somit wahrscheinlich Folge der implantierten Tumoren und nicht der Pravastatinbehandlung. Ein vom Tumor synthetisierter Mediator könnte für diese paraneoplastische Blutbildung verantwortlich sein, zum Beispiel die verschiedenen „Colony-stimulating-growth-factors“ welche durchaus von malignen Lungentumoren synthetisiert werden können (Matsuguchi et al., 1991). Diese Faktoren führen jedoch klinisch eher zu einer Stimulation der Blutbildung in Situ, was sich im Falle von Granulozyten-CSF klinisch nur als Leukozytose und nicht als extramedulläre Blutbildung manifestiert (Katoh et al., 1993).

Als Folgeschäden an den Lebern von Mäusen, denen G-CSF-synthetisierende Tumoren transplantiert wurden, sind fokale Nekrosen der zentrolobulären Hepatozyten mit neutrophiler Infiltration sowie fibröse Umbauprozesse in den Portalfeldern beschrieben (Suzuki et al. 1993).

Eine Induktion der Blutbildung in der Leber ist noch nicht beobachtet worden.

Auch ist eine reaktive Ursache wie verdrängendes Metastasenwachstum im Knochenmark der Tiere als Ursache der hepatischen Blutbildung nicht auszuschließen.

GM-CSF hat einen stark cholesterin-senkenden Effekt. Der Mechanismus dieses Phänomens ist ungeklärt. Hepatozyten als Hauptsyntheseort des Cholesterins scheinen keine Rezeptoren für GM-CSF zu exprimieren, so daß eine direkte Wirkung auf diese Zellen als Ursache unwahrscheinlich ist. Plausibler ist eine mediator-vermittelte Stimulation der Leberzellen über Kupffer-Zellen oder andere Makrophagen die durch GM-CSF beeinflusst wurden (Nimer et al., 1988). Die GM-CSF-vermittelte Serumcholesterin-Senkung ist keine ausreichende Erklärung für die tumorassoziierte Hypocholesterinämie, da man nicht davon ausgehen kann, daß alle Tumoren bei welchen dieses Phänomen auftritt, paraneoplastisch Mediatoren sezernieren. Bezüglich unserer Experimente kann man nicht abschätzen, inwieweit die Hypocholesterinämie des Patienten von dem die Tumorzellen stammen sowie die der transplantierten Versuchstiere auf die paraneoplastische Produktion dieser Faktoren zurückzuführen sein könnte.

In Versuch 3 fanden sich in den Sinusoiden der Lebern homogen-eosinophile Ablagerungen, welche in ihrer Ausdehnung mit der hepatischen Blutbildung korrelieren. Die exemplarische Darstellung von Amyloid in den Gefäßwänden einer Mausleber legt die Vermutung nahe, daß es sich dabei um Vorstufen von Amyloid handeln könnte. Welcher Genese das Protein in diesem Fall ist, bleibt ungeklärt. Die Korrelation zwischen dem Flächenanteil von vitalem Tumor an der Gesamtfläche des Tumors und den hepatischen Ablagerungen von Amyloid besteht nur in der Gruppe der behandelten Tiere. Wenn dieses „amyloide“ Protein vom Tumor synthetisiert würde, müßte man diese Korrelation auch bei der Kontrollgruppe erwarten. Die relativ kleinen Gruppengrößen der Versuchstiere sowie die recht grobe Quantifizierung der morphologischen Phänomene schwächen diese Beobachtungen in ihrer Bedeutung jedoch ab.

Die extramedulläre Blutbildung und das Amyloid waren nicht Gegenstand der Fragestellung dieser Arbeit. Im Rahmen ihrer Relevanz für die Thematik wurden sie hier diskutiert. Eine weitere Bearbeitung dieser Phänomene hätte den Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt.

## 5 Zusammenfassung

Die Inhibition der Cholesterinsynthese behindert das Zellwachstum. Auch bei exogener Cholesterinzufuhr bleibt dieser Effekt bestehen. Dies zeigt, daß nichtsteroidale Cholesterinvorstufen, Abkömmlinge des Mevalonates, hierbei von Bedeutung sind. Das Farnesyl-Pyrophosphat zum Beispiel ist für die Funktionsfähigkeit von proliferations-enthemmenden Ras-Proteinen notwendig.

In mehreren in vivo Versuchen wurde das Wachstum einer humanen Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie auf der Nacktmaus unter Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Pravastatin sowie ohne Behandlung beobachtet. Hier sollte untersucht werden, wie sich die Hemmung der Mevalonatsynthese auf die Überlebenszeit und die Expression der codierenden mRNA des Schrittmacherenzymes HMG-CoA-Reduktase auswirkt.

Die behandelten Tiere zeigten gegenüber den unbehandelten ein verzögertes Tumorstadium. Dies ist als Folge der Hemmung der Mevalonatsynthese in den Tumorzellen zu deuten.

Die Expression der HMG-CoA-Reduktase-mRNA war in den Tumoren dieser behandelten Tiere jedoch verringert und nicht kompensatorisch hochreguliert, da die Zellen die für ihre Proliferation auf eine Mehrsynthese von Mevalonat angewiesen sind, unter Pravastatin selektiv absterben. Es blieben langsamer wachsende, offensichtlich Mevalonat-unabhängigere Zellklone nach. Dies erklärt auch, warum der proliferationshemmende Effekt von Pravastatin in Langzeitversuchen verlorengelht.

Ein weiteres Indiz für die besondere Empfindlichkeit schnell wachsender Zellklone auf Mevalonat-Deprivation ist, daß bei den unbehandelten Tieren die am schnellsten wachsenden Tumore die höchste HMG-CoA-Reduktase-mRNA-Expression hatten.

Darüber hinaus zeigte sich, daß der Tumor möglicherweise durch paraneoplastisch sezernierte Mediatoren in den Lebern der Tiere extramedulläre Blutbildung induzierte. Diese Mediatoren könnten zum Teil auch für die Hypcholesterinämie verantwortlich sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Alexopoulos, C.G., Blatsios, B., Avgerinos, A. (1987): Serum lipids and lipoprotein disorders in cancer patients; *Cancer* 60: 3065-3070

Barclay, M., Cogin, G.E., Escher, G.C., Kaufmann, R.J., Kidder, E.D. und Petermann, M.L. (1955): Human plasma lipoproteins. In normal women and in women with advanced carcinoma of the breast. *Cancer* 8: 253-260.

Bennis, F., Favre, G., LeGaillard, F. und Soula, G. (1993): Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int. J. Cancer* 55: 640-645.

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1980): Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21: 505-517.

Brown, S., Goldstein, J.L. (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.

Brown, S., Goldstein, J.L. (1994) in Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S und Kasper, D.L.: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Edition. McGraw Hill New York.

Buchwald, H. (1992): Cholesterol inhibition, cancer, and chemotherapy. *Lancet* 339: 1154-1156.

Budd, D., Ginsberg, H. (1986): Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. *Cancer* 58:1361-1365.

Cohen, L.H. und Griffioen (1988): Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA in human hepatoma cell line Hep G2 by distinct classes of mevalonate-derived metabolites. *Biochem. J.* 255: 61-67.

DeClue, J.E., Vass, W.C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R., and Willumsen, B.M. (1991): Inhibition of cell growth by lovastatin is independent of ras-function. *Cancer Res.* 51: 712-717.

Farnsworth, C. C., Wolda, S.L., Gelb, M.H., and Glomset, J. A. (1989): . *J. Biol. Chem.* 264: 20422-20429.

Gebhardt, A. und Niendorf A. (1995): Effects of Pravastatin, a hmg-coA reductase inhibitor, on two human tumour cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121 (6): 343-349.

Gebhardt, A., Peters, A., Gerding, D. und Niendorf, A. (1994): Rapid quantification of mRNA species in ethidium bromide-stained gels of competitive RT-PCR products. *J.Lipid Res.* 35: 976-981.

Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990) : Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343.

Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., and Marshall, C.J. (1989): All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57: 1167-1177.

Haubruck, H. und McCormick, F. (1991): Ras p21: Effects and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1072: 215-229.

International Collaborative Group (1982): Circulating cholesterol level and risk of death from cancer in men aged 40 to 69 years. *JAMA* Vol. 248: No. 21.

Jones, P.H., Farmer, J.A., Cressman, M.D., McKenney, J.M., Wright, J.T., Proctor, J.D., Berkson, D.M., Farnham, D.J., Wolfson, P.M., Colfer, H.T., Rackley, C.E., Sigmund, W.R., Schlant, C., Arensberg, D. und McGovern, M.E. (1991): Once-daily pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a dose-response study. *Clin. Cardiol.* 14: 146-151.

Kandutsch, A.A. und Hancock, R.L. (1971) : Regulation of the rate of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in mouse liver and hepatomas. *Cancer Res.* 31: 1396-1401.

Kaneko, I., Hazamada-Shimada, Y., and Endo, A. (1978): Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236-B, a potent inhibitor of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme-A Reductase. *Eur. J. Biochem.* 87: 313-321.

Karlson, P. (1988): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 13. Auflage. Georg Thieme Verlag.

Kawata, S., Kakimoto, H., Ishiguro, H., Yamasaki, E., Yoshiaki, I., and Matsuzawa, Y. (1992): Effect of pravastatin, a potent 3-Hydroxy-3-

methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitor, on survival of AH130 hepatoma-bearing rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 1120-1123.

Katoh, Y., Nakamura, M., Ohnishi, Y., Shimamura, K., Ueyama, Y. und Tamaoki, N. (1993): Autonomous production of granulocyte-colony stimulating factor in tumour xenografts associated with leukocytosis. *Br. J. Cancer* 68: 715-719.

Khosravi-Far, R., Cox, A.D., Kato, K. und Der, C.J. (1992): Protein prenylation: Key to ras function and cancer intervention? *Cell Growth Differ.* 3: 461-469.

Koga, T., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Hasegawa, K. und Yamazaki, M. (1990): Tissue-Selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin-sodium, a 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta* 1045: 115-120.

Kritchevsky, S.B. et al (1991): Changes in plasma lipid and lipoprotein cholesterol and weight prior to the diagnosis of cancer. *Cancer res.* 51:3198-3203.

Lai, R.K., Perez-Sala, D. Cañada, F.J. und Rando, R.R. (1990): The gamma subunit of transducin is farnesylated. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 7673-7677.

Luskey, L. und Stevens, B. (1985): Human 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *J. Biol. Chem.* 260: 10271-10277.

Maltese, W.A. (1990): Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J.* 4.

Maltese, W. A., Defendini, R., Green, R.A., Sheridan, K.N. und Donley, D.K. (1985): Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevilonin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Clin Invest* 76: 1748-1754.

Matsuguchi, T., Okamura, S., Kawasaki, C., Shimoda, K., Omori, F., Hayashi, S., Kimura, N. und Niho, Y. (1991): Constitutive production of granulocyte-colony stimulating factor and interleukin-6 by a human lung cancer cell line, KSNY: Gene amplification and increased mRNA stability. *Eur. J. Haematol.* 47: 128-133.

Ness, G. C., Eales, S., Lopez, D. und Zhao, Z. (1994): Regulation of

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene expression by sterols and non-sterols in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (2): 420-425.

Niendorf, A., Gebhardt, A. (1994) : Quantitative Analyse der mRNA-Expression von LDL-Rezeptor und HMG-CoA Reduktase im bovinen Gewebe mittels kompetitiver RT-PCR. *Pathologe* 15: 201-206.

Niendorf, A., Stang, A., Beisiegel, U., Peters, A., Nägele, H., Gebhardt, A. und Kuse, R. (1992): Elevated lipoprotein(a) levels in patients with acute myeloblastic leukaemia decrease after succesful chemotherapeutic treatment. *Clin. Investig.* 70: 683-685.

Nimer, S. D., Champlin, R. E., Golde, D. W. (1988): Serum cholesterol-lowering activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *JAMA* 260: 3297-3300.

Nydegger, U.E., Butler, R.E., (1972): Serum lipoprotein levels in patients with cancer. *Cancer res.* 32: 1756-1760.

Powell, E.E., Kroon, P. A. (1994) : Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J. Clin. Invest.* 93: 2168-2174.

Quesney-Huneus, V., Galick, H.A., and Siperstein, M.D. (1983): The dual role of mevalonate in cell cycle. *J. Biol. Chem.* 258: 378-385.

Reihner, E., Rudling, M., Ståhlberg, D., Berglund, L., Ewerth, S., Björkhem, I., Einarsson, K. und Angelin, B. (1990): Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA-reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 323: 224-228.

Rilling, H.C., Bruenger, E., Leining, L.M., Buss, J.E. und Epstein, W.W. (1993): Differential prenylation of proteins as a function of mevalonate concentration in CHO-cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 210-215.

Rose, G., Shipley, M.J. (1980): Plasma lipids and mortality: a source of error. *Lancet* March,8.

Schmidt, R.A., Schneider, C.J. und Glomset, J.A (1984): Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 10175-10180.

Schneider, P.D., Chan, E.K., Guzman, I.J., Rucker, R.D., Varco, R.L. und Buchwald, H. (1980): Retarding Novikoff tumor growth by altering host rat cholesterol metabolism. *Surgery* 87: 409-416.

Sepp-Lorenzino, RAO, S. und Coleman, P. S. (1991): Cell-cycle dependent, differential prenylation of proteins. *J. Biochem.* 200: 579-590.

Sinensky, M., Beck, L.A., Leonard, S. und Evans, R. (1990): Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 265: 19937-19941.

Siperstein, M.D., Gyde, A.M. und Morris, H.P. (1971): Loss of feedback control of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase in hepatomas. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 315-317.

Siperstein, M.D. und Fagan, V.M. (1964): Deletion of the cholesterol-negative feedback system in liver tumors. *Cancer Res.* 24: 1108-1115.

Smith, G.D., Shipley, M.J. et al. (1992): Plasma cholesterol concentration and mortality. *JAMA* 267, Nr. 1.

Streyer, L. (1990): *Biochemie*, 1. deutschsprachige Auflage. Spektrumder-Wissenschaft-Verlag, Heidelberg.

Sumi, S., Beauchamp, R.D., Townsend, Jr., C.M., Tatsuo, U., Murakami, M., Srinivasan, R., Ishizuka, J. und Thompson, J.C. (1992): Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology* 103: 982-989.

Suzuki, A., Takahashi, T., Okuno, Y., Seko, S., Fukuda, Y., Nakamura, K., Fukumoto, M., Konaka, Y. und Imura, H. (1993): Liver damage in patients with colony-stimulating factor-producing tumors. *Am. J. Med.* 94: 125-132.

Taylor, F.R., Saucier, S.E., Shown, E.P., Parish, E.J. und Kandutsch, A.A. (1984): Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 259, Nr. 20: 12382-12387.

Trzaskos, J.M., Jonas, M., und Chen, H.W. (1989): Sterol-mediated suppression of HMG-CoA-Reductase mRNA levels in cultured cells requires protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:267-271.

Tsujita, Y., Kuroda, M., Shimada, Y., Tanzawa, K., Arai, M., Kaneko, I., Tanaka, M., Masuda, H., Tarumi, C., Watanabe, Y. und Fujii, S. (1986): CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-selective inhibition of sterol-synthesis and hypolipodemic effect on various animal species. *Biochem. Biophys. Acta* 877: 50-60.

Wolda, S.L. and Glomset, J.A. (1988): Evidence for modification of Lamin B by a product of mevalonic acid. *J. Biol. Chem.*, 263: 5997-6000.

Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L. und Russell, D.W. (1984): The human LDL-Receptor: A cysteine-rich protein with multiple alu-sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38.

Yamazaki, M., Suzuki, H., Hanano, M., Tokui, T., Komai, T., und Sugiyama, Y. (1993): Na<sup>+</sup>-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. *Am. J. Physiol.* 264: G36-G44.

Ziegler, K. und Hummelsiep, S. (1993): Hepatoselective carrier-mediated sodium-independent uptake of pravastatin and pravastatin-lactone. *Biochem. Biophys. Acta* 1153: 23-33.

## **7 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Udo Helmchen für die Möglichkeit, an dem von ihm geleiteten Institut für Pathologie der Universität Hamburg meine Promotionsarbeit zu erstellen.

Herrn Professor Dr. Axel Niendorf für die Zuteilung dieser Promotion, der großzügigen Bereitstellung der dafür erforderlichen Mittel sowie für seinen freundschaftlichen Beistand.

† Frau Dr. Angelika Gebhardt für die geduldige Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Frau Konstanze von Bonin von Ostau, Frau Daisy Gerding und Frau Nina Ludwig für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herrn Jochen Koppelmeyer für die Reproduktion der Fotografien.

Herrn Dr. Jan Hinrich Bräsen für die Hilfe bei der Erstellung der histologischen Fotografien.

Herrn Michael Harsch, Herrn Philip Heigener und Herrn Wieland Reich für die technische Hilfe beim Erstellen des Manuskriptes.

Frau Katja Rettinger für die Dursicht des Manuskriptes.

Meinen Eltern Dorothee und Dierk Heigener für ihre bedingungslose Unterstützung.

## 8 Lebenslauf

David Felix Heigener, geboren am 09.12.1968 in Hamburg als zweiter Sohn des Kaufmanns Dierk Heigener und der Innenarchitektin Dorothee Heigener, geb. Kähler.

1975-1979	Besuch der Grundschule in Hamburg-Niendorf
1979-1988	Besuch des Gymnasiums Ohmoor in Hamburg
Juli 1988 bis Februar 1990	Ableistung des Zivildienstes im Altersheim „Kursana-Residenz“ in Hamburg
April 1990	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
März 1992	Absolvierung der ärztlichen Vorprüfung
Oktober 1992	Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Pathologie der Universität Hamburg
April 1993	Absolvierung des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
September 1995	Absolvierung des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
Okt. 1995 bis Sept. 1996	Praktisches Jahr: Neurologie in der Universitätsklinik Eppendorf, Innere Medizin im Buffalo General Hospital, New York, U.S.A. und im Marienkrankenhaus, Hamburg, Chirurgie im Marienkrankenhaus, Hamburg
November 1996	Absolvierung des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
Seit Januar 1997	Arzt in der internistisch-onkologischen Abteilung des Krankenhauses Großhansdorf.

## **9 Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 22. Februar 1997