

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum, II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

## **Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf die Proliferation und Apoptose von Keimzelltumoren *in vitro***

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katharina Simone E. Hoch  
aus Würzburg

Hamburg 2010

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.05.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Dr. med. F. Honecker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. H. Schwarzenbach**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Hodentumoren.....	1
1.2	Maligne Keimzelltumoren des Hodens .....	1
1.2.1	Epidemiologie, Ätiologie und Klinik .....	1
1.2.2	Keimzellen – Entwicklung und Bedeutung beim Mann .....	2
1.2.3	Einteilung von Keimzelltumoren .....	4
1.2.4	Entstehung von Keimzelltumoren .....	6
1.2.5	Diagnostik von Keimzelltumoren .....	7
1.3	Cisplatin .....	8
1.3.1	Standardtherapie mit Cisplatin .....	8
1.3.2	Wirkweise von Cisplatin .....	10
1.3.3	Mechanismen der Cisplatinresistenz.....	12
1.3.4	Klinisches Vorgehen bei Cisplatinresistenzen .....	14
1.4	Sunitinib .....	15
1.4.1	Allgemeine Informationen zu Sunitinib.....	15
1.4.2	Rezeptor-Tyrosinkinasen: Angriffspunkt von Sunitinib .....	16
1.4.3	Von Sunitinib gehemmte Tyrosinkinasen .....	20
1.4.4	Klinischer Einsatz von Sunitinib .....	22
1.4.5	Pharmakologische Eigenschaften von Sunitinib.....	24
1.5	Ziel der Arbeit .....	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1	Verwendete Materialien .....	27
2.1.1	Zelllinien und Zellkulturmedien .....	27
2.1.2	Zytostatika .....	27
2.1.3	Antikörper .....	28
2.1.4	Chemikalien und Enzyme .....	28
2.1.5	Geräte, Verbrauchsmittel und Software .....	29
2.2	Methoden bei der Behandlung von Zellkulturen .....	29
2.2.1	Zellkultur.....	29
2.2.2	Passagieren von adhärent wachsenden Zellen .....	30
2.2.3	Bestimmung der vorhandenen Zellzahl: Trypanblau-Methode und Neubauer-Zählkammer .....	30

2.2.4	Bestimmung der IC <sub>50</sub> mittels Zellzählung: Neubauer Zählkammer und ViCell-Counter .....	31
2.2.5	Bestimmung der IC <sub>50</sub> mittels MTT .....	32
2.2.6	Bestimmung des Einflusses der Zellkonfluenz auf die IC <sub>50</sub> .....	33
2.2.7	Kombinationsversuche mit Sunitinib und Cisplatin .....	33
2.2.8	Kryokonservierung von Zelllinien .....	34
2.3	Proteinchemische Methode: Western Blot .....	34
2.3.1	Präparation und Lyse der Zellen .....	34
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford .....	35
2.3.3	Gießen der Gele .....	36
2.3.4	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine .....	36
2.3.5	Antikörper-Inkubation und Proteindetektion .....	37
2.4	Molekularbiologische Methode: Durchflusszytometrie .....	38
2.4.1	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid .....	38
2.4.2	Untersuchung von Caspase-3-Aktivierung .....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
3.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> .....	42
3.1.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> mittels MTT .....	42
3.1.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> durch Zellzählung mittels ViCell-Counter .....	45
3.2	Einfluss der Zellkonfluenz auf die IC <sub>50</sub> .....	49
3.2.1	Einfluss der Zellkonfluenz auf die IC <sub>50</sub> : Bestimmung mittels Zellzählung .....	49
3.2.2	Einfluss der Zellkonfluenz auf die IC <sub>50</sub> : Bestimmung mittels MTT .....	53
3.2.3	Einfluss des pro Zelle zur Verfügung stehenden Platzes auf die IC <sub>50</sub> .....	55
3.3	Kombinationsversuche mit Sunitinib und Cisplatin .....	56
3.4	Untersuchung von Proteinen des Ras/Raf-Signalwegs und der Apoptoseinduktion.....	61
3.5	Durchflusszytometrie .....	62
3.5.1	Zellzyklusanalyse mittels FACS .....	62
3.5.2	Untersuchung einer Caspase-3-Aktivierung.....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>65</b>
4.1	Zielgerichtete Therapieansätze bei testikulären Keimzelltumoren .....	65

4.2	Inhibierung von Wachstumsfaktoren durch Sunitinib in der Tumorthherapie .....	66
4.3	Wirkung von Sunitinib auf testikuläre Keimzelltumoren.....	66
4.3.1	IC <sub>50</sub> -Konzentration von Sunitinib .....	66
4.3.2	Einfluss der Zellkonfluenz auf die Wirkung von Sunitinib .....	69
4.3.3	Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin .....	70
4.3.4	Wirkung auf MEK/ERK .....	71
4.3.5	Wirkung auf Zellzyklus und Apoptose .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>89</b>

### 1 Einleitung

#### 1.1 Hodentumoren

Hodentumoren sind bei jungen Männern im Alter zwischen 20 und 40 Jahren die häufigste Krebserkrankung. Sie werden in zwei große Gruppen unterteilt. 90% dieser Tumoren gehören zu den Keimzelltumoren (KZT), 10% machen die nichtgerminativen Tumoren aus (Weiland 2010). Letztere werden auch als Keimstrang-Stromatumoren bezeichnet, die von spezifischem und unspezifischem Stützgewebe des Hodens ausgehen. Dazu zählen unter anderem die Leydig-Zell-Tumoren, Sertoli-Zell-Tumoren und Granulosa-Zell-Tumoren. Außerdem können Metastasen von anderen Primärtumoren, wie zum Beispiel vom Prostata- oder Nierenzellkarzinom, sowie Lymphome im Hoden auftreten.

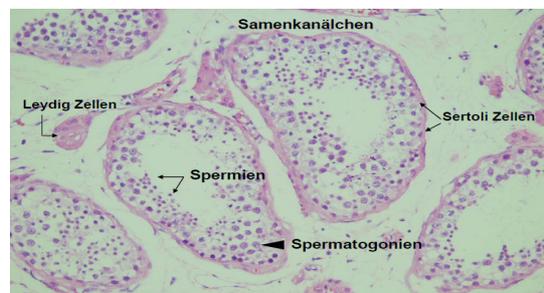


Abb. 1: Querschnitt durch die Tubuli seminiferi (Samenkanälchen) des Hodens: Dargestellt sind Keimzellen (Spermatogonien, Spermien) und umliegende Stützgewebe (Sertoli-, Leydigzellen), die maligne transformieren können und dann die Ursprünge der germinativen und nichtgerminativen Hodentumoren darstellen (Middel 2008).

Da die nichtgerminativen Tumoren relativ selten sind und eine komplett andere Ätiologie im Vergleich zu den germinativen aufweisen, wird in dieser Arbeit lediglich auf die KZT eingegangen.

#### 1.2 Maligne Keimzelltumoren des Hodens

##### 1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik

KZT sind mit einer Inzidenz von 9,78 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr die häufigste maligne Erkrankung junger Männer in Deutschland. Weltweit werden 0,5 bis 9,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr (Schmelz et al. 2006) gemeldet, wobei das größte Vorkommen mit stetig steigender Tendenz in Skandinavien, Deutschland, Neuseeland und den USA liegt. Seltener treten diese Tumoren bei Schwarzafrikanern und Asiaten auf. Der Altersgipfel liegt zwischen 25 und 35 Jahren. 70% der Erkrankten sind zwischen 20 und 40 Jahren, 20% älter als 40 und 10% jünger als 20. Insgesamt machen KZT jedoch nur ein bis zwei Prozent

aller Tumorerkrankungen aus (Gschwend und Schulte 2005) und sind somit eher selten. Das Lebenserkrankungsrisiko liegt bei ca. 0,4%.

Bisher konnten keine gesicherten Ursachen der Erkrankung identifiziert werden, es sind jedoch mehrere Risikofaktoren bekannt. So erhöht ein vorausgegangener Hodentumor das Risiko für kontralaterale Hodentumoren um das 30-fache. Ebenfalls steigert eine positive Familienanamnese das Risiko für Brüder eines betroffenen Patienten 11-fach, für Söhne eines Hodentumorerkrankten besteht ein doppeltes Erkrankungsrisiko (Johnke 2007). Außerdem besteht ein 4- bis 8-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko bei einem Malescensus testis (gestörter Hodenabstieg in den Hodensack) für den ipsilateralen Hoden. Patienten mit einem Kryptorchismus (Lageanomalie des Hodens) erleiden zusätzlich häufiger einen Hodentumor im kontralateralen Hoden. Weitere Risikofaktoren stellen Infertilität, Hodenatrophie und intersexuelle Fehlbildungen wie zum Beispiel das Klinefelter-Syndrom dar.

Leitsymptome sind meist, zu ca. 70%, eine schmerzlose Größenzunahme und tastbare Induration des Hodens. In zwei bis fünf Prozent der Fälle kommt es außerdem zur Gynäkomastie durch  $\beta$ -HCG- oder Östrogenproduktion des Tumors (Schmelz et al. 2006). In wenigen Fällen sind bereits supraklavikuläre Metastasen tastbar. Die Metastasierung des KZT findet in der Regel zunächst lymphogen in die ipsilateralen retroperitonealen Lymphknoten statt, später auch supradiaphragmal oder hämatogen primär pulmonal.

### **1.2.2 Keimzellen – Entwicklung und Bedeutung beim Mann**

Keimzellen (Gameten) sind haploide Zellen, welche die geschlechtliche Fortpflanzung ermöglichen. Verschmelzen zwei haploide Gameten miteinander, entsteht eine Zygote.

Den Ursprung der Keimzellen und damit den Beginn der Keimbahn stellen die Urkeimzellen (primordiale Keimzellen, primordial germ cells) dar. Diese sind, wie die anderen Körperzellen auch, diploid und zeigen sich beim menschlichen Embryo bereits in der dritten Woche im primären Ektoderm, welches auch als Epiblast bezeichnet wird (Sadler und Langman 2003). Aus diesem entwickeln sich später alle drei Keimscheiben. Nachweisen kann man primordiale Keimzellen, indem man die Produktion von spezifischen Proteinen wie OCT-3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4) oder PLAP (plazentare alkalische Phosphatase) beweist (Honecker et al. 2004b). Vom primären Ektoderm wandern die Urkeimzellen nun amöboid in die

Wand des Dottersacks, wo sie in der vierten Woche ankommen. Eine bedeutende Rolle bei dieser Wanderung spielt der Rezeptor des Stammzellfaktors c-Kit, ohne den dieser Prozess nicht abläuft (Blume-Jensen et al. 2000). Die Urkeimzellen sammeln sich in der Nähe des Allantoisabgangs und befinden sich somit nun extraembryonal im Entoderm und Mesoderm der Dottersackwand.

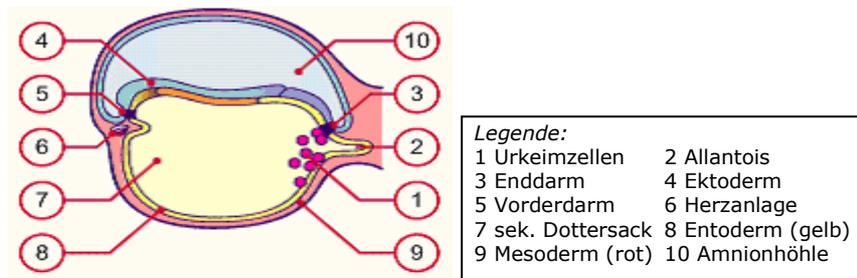


Abb. 2: Lage der Urkeimzellen im Embryo der 4. Woche (Schöni-Affolter et al. 2005)

Zwischen der fünften und sechsten Woche wandern die Urkeimzellen zurück in den Embryo (als Übersichtsarbeit Schöni-Affolter et al. 2005). Dies wird durch die kraniokaudale Krümmung und die laterale Abfaltung des Embryos begünstigt. Sie bewegen sich entlang der Dottersackwand, durchqueren das dorsale Mesenterium und wandern in die neben der Urnierenleiste liegende Genitalleiste ein.

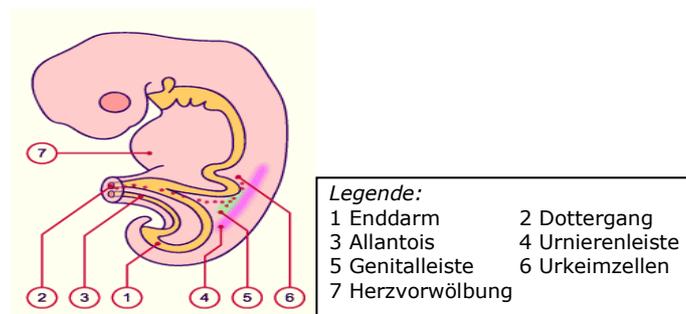


Abb. 3: Einwanderung der Urkeimzellen in die Genitalleiste im Embryo der 5. Woche (Schöni-Affolter et al. 2005)

Dort angekommen, aber auch schon während der Wanderung, vermehren sich die Urkeimzellen durch mitotische Teilung. Die Genitalleiste stellt zu diesem Zeitpunkt die primitive Gonadenanlage dar. Die Gonaden entwickeln sich bei beiden Geschlechtern, sobald die Urkeimzellen eingewandert sind. Zunächst bilden sich primäre Keimstränge, indem die primordialen Keimzellen von den in die Tiefe des Mesenchyms vorgedrungenen Zölomepithelzellen umschlossen werden. Bis zu diesem Punkt spricht man von der indifferenten Gonadenanlage, nun erst beginnt die Sexualdifferenzierung (Sadler und Langman 2003).

Bei einem genetisch männlichen Embryo tragen die Urkeimzellen und die somatischen Zellen einen XY-Chromosomensatz. Der Schlüssel zur männlichen Entwicklung liegt auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms, dem SRY-Gen (Sex determining region of the Y chromosome). Dieses kodiert den Transkriptionsfaktor TDF (testis-determining factor) und induziert somit die Entwicklung der männlichen Gonaden (Larsen 2001). Ist kein Y-Chromosom und somit kein TDF vorhanden, kommt es zur Ausbildung eines weiblichen Phänotyps. Wird jedoch durch die Bindung des TDF an die DNA die Entwicklung eines männlichen Phänotyps eingeleitet, entwickeln sich die primären Keimstränge weiter zu Hoden- oder Marksträngen. Ab dem vierten Monat sind die Hodenstränge soweit entwickelt, dass sie sowohl aus Stütz- (Sertoli) und Zwischenzellen (Leydig) bestehen als auch die Vorläufer der Spermien, die Spermatogonien (Ursamenzellen) beeinhalteten (Sadler und Langman 2003). Diese Ursamenzellen entstehen nach der ersten mitotischen Teilung aus den Urkeimzellen. Sie sind nun auf ihre Entwicklung zu Samenzellen festgelegt, besitzen jedoch noch immer ihren diploiden Chromosomensatz. Außerdem wird im entstehenden Hoden Testosteron produziert, worüber die weitere geschlechtsspezifische Differenzierung der Genitalgänge und der äußeren Genitalien induziert wird. Nun ruhen die Spermatogonien bis zum Erreichen der Pubertät. Dann erst teilen sie sich weiter und entwickeln sich zu Spermatozyten. Sie vollziehen zwei Reifeteilungen und reduzieren ihren diploiden Chromosomensatz auf einen haploiden, bevor sie sich letztendlich zu Spermatisden und darauf folgend zu Spermien entwickeln.

### 1.2.3 Einteilung von Keimzelltumoren

Die Urkeimzellen befinden sich also zu Beginn im Epiblasten, einem Gewebe, welches totipotente Entwicklungsmöglichkeiten besitzt. Sie liegen außerdem extraembryonal im Dottersackgewebe. Des Weiteren liegen und wandern sie auch intraembryonal und selbstverständlich findet man sie auch in den frühen Gonadenanlagen, wo sie die erste Differenzierung in Richtung Spermien durchlaufen. Betrachtet man die unterschiedlichen histologischen Typen der vorkommenden KZT, so lässt sich eine enge Beziehung zwischen Tumorentstehung und Schädigung von Keimzellen in der Embryogenese vermuten. Denn anhand der histologischen Untersuchung der vorkommenden KZT werden diese, wie in Abb. 4 dargestellt, in ähnliche Kategorien eingeteilt. Dementsprechend gibt es eine Gruppe von KZT, die

totipotente Keimzellen ohne jegliche Differenzierung besitzt; diese werden als Embryonal-Karzinome bezeichnet. Eine zweite Gruppe von Tumoren zeigt extraembryonale Differenzierung, zum Beispiel von Dottersackgewebe. Vertreter hiervon sind das Dottersack- bzw. Chorionkarzinom. Eine weitere Gruppe sind KZT mit somatisch intraembryonaler Differenzierung, wie Knochen-, Knorpel- oder glattem Muskelgewebe. Diese sind die Teratome. Die letzte Gruppe stellen Tumoren mit keimzelltypischer Differenzierung dar, die Seminome. Die ersten drei Gruppen der KZT fasst man auch als Nichtseminome zusammen.

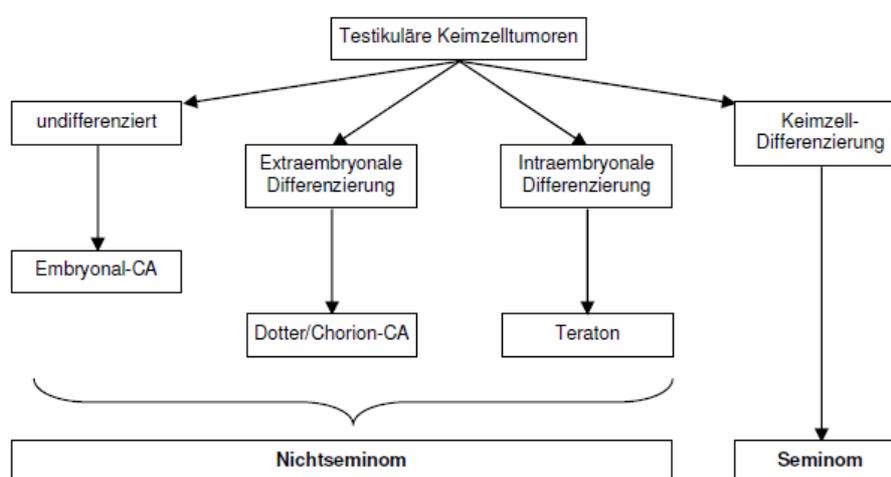


Abb 4.: Klassifikation von KZT: Einteilung nach histologischen Kriterien

Im Wesentlichen unterscheidet man also zwei große Gruppen. Die **Seminome** machen 50% aller KZT aus, während **Nicht-Seminome** zu 40% auftreten. Die restlichen 10% sind gemischte KZT, die sowohl Seminom- als auch eine Nicht-Seminom-Komponenten besitzen (Müller 2005).

Neben dem hauptsächlichen Auftreten von KZT in den Hoden, können diese ebenfalls zu einem geringen Prozentsatz von etwa fünf Prozent auch an anderen Stellen des Körpers vorkommen. Diese werden als extragonadale KZT bezeichnet. Da diese Lokalisation wohl auch auf die Migrationsroute der primordialen Keimzellen in der Embryonalphase zurückzuführen ist, können sie an verschiedenen Stellen entlang der Mittellinie des Körpers auftreten. Häufiger kommen sie im Retroperitoneum und Mediastinum vor, seltener in der Hypothalamusregion (Wylie 1999). Die Einteilung erfolgt genauso wie bei den testikulären KZT in Seminome und Nichtseminome. Abzugrenzen von den primär extragonadalen KZT sind mediastinale Metastasen, die von einem gonadalen Primärtumor abstammen.

### 1.2.4 Entstehung von Keimzelltumoren

Der Entstehungsmechanismus von testikulären KZT konnte bislang noch nicht komplett geklärt werden. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass alle testikulären KZT aus einer gemeinsamen prämaligen Vorstufe entstehen, dem Carcinoma in situ (CIS), das auch als „testikuläre intratubuläre Neoplasie“ (TIN) oder „intratubuläre Keimzellneoplasie unklassifiziert“ (ITGCNU) bezeichnet wird (Honecker et al. 2004a). Diese Zellen befinden sich in den Tubuli seminiferi an der Basalmembran zwischen den Sertoli-Zellen. Es wird angenommen, dass diese CIS-Zellen eine prä maligne Variante der primordialen Keimzellen darstellen, da man die Expression des Stammzellfaktors c-Kit, sowie den embryonalen Transkriptionsfaktor OCT-3/4 nachweisen kann (Müller 2005). Diese Faktoren sind in der normalen Spermatogenese nicht nachweisbar und können so als Marker betrachtet werden. Untersuchungen auf chromosomaler Ebene zeigten, dass der kurze Arm des Chromosoms 12 (12p) eine Rolle in der malignen Transformation spielt. So ist 12p in den Tumorzellen überrepräsentiert und liegt meist in mehreren Isochromosomen vor (Ottensen et al. 2003, Rosenberg et al. 2000). In den CIS-Zellen konnte diese Anomalie jedoch nicht nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass der Zugewinn von 12p eine bedeutende Rolle in der malignen Transformation darstellt (Ottensen et al. 2003). Ein weiterer Aspekt der für diese Annahme spricht ist, dass sich Embryonalkarzinomzellen (EC-Zellen) vornehmlich in der verstärkten Expression von Genen des Chromosoms 12 von normalen embryonalen Stammzellen unterscheiden (Müller 2005).

Weitere Versuche haben gezeigt, dass einige EC-Zellen in trophoblastische, andere in somatische und extraembryonale Zellen differenzieren können. Durch diese Fähigkeit entsprechen diese Zellen denen des primären Ektoderms bzw. denen der inneren Zellmasse der Blastozyste. Die EC-Zellen haben also die Fähigkeit sowohl in alle drei Keimblätter als auch in extraembryonale Derivate zu differenzieren und können sich somit auch in das Teratom bzw. das Chorion- und Dottersackkarzinom wandeln (Müller 2005). Deshalb wird angenommen, dass die Gruppe der extra- und intraembryonalen KZT nicht direkt aus dem CIS entstehen, sondern eine differenziertere Form des Embryonalkarzinoms darstellen. Im Rahmen der Karzinogenese aller KZT entstehen also aus dem CIS zunächst entweder Seminome oder Embryonalkarzinome (EC), welche dann weiter in extra- und intraembryonale Karzinome differenzieren. Die Nichtseminome zeigen in ihrer Entwicklung deutliche

Ähnlichkeiten zu in der Embryogenese ablaufenden Vorgängen. Seminome bestehen morphologisch betrachtet aus Zellen, die den primordialen Keimzellen gleichen, und werden daher als maligne transformierte Äquivalente der PGC betrachtet.

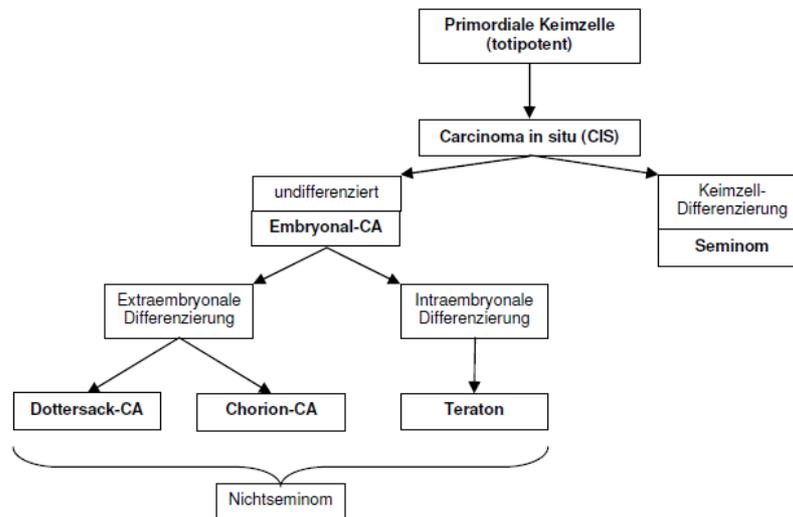


Abb. 5: Klassifikation von KZT: Einteilung nach Entstehungskriterien

### 1.2.5. Diagnostik von Keimzelltumoren

Im adulten Organismus wird normalerweise kein OCT-3/4 produziert. Dieser embryonale Transkriptionsfaktor ist unter anderem an der Regulation der zellulären Pluripotenz beteiligt und für die Fähigkeit der Selbsterneuerung notwendig (Pesce und Scholer 2001, Niwa et al. 2000). Er wird zu Beginn der Embryogenese stark exprimiert, bleibt später nur noch in den PGC erhalten und wird nach Einwanderung der Keimzellen in die Genitalleiste und deren Differenzierung auch da herabreguliert. Wird im adulten Organismus OCT-3/4 exprimiert, kann man davon ausgehen, dass dies von dem einzigen pluripotenten Tumor, einem KZT, hergestellt wird. Allerdings produzieren nicht alle KZT diesen Faktor. CIS- und Seminomzellen, welche die Äquivalente zu embryonalen Keimzellen darstellen, exprimieren OCT-3/4. Ebenso exprimieren EC-Zellen (Äquivalente zu ICM) diesen. Bei differenzierteren KZT jedoch, wie dem Chorion-, Dottersackkarzinom und dem Teratom, kommt OCT-3/4 nicht vor (Looijenga et al. 2003, Rajpert-De Meyts et al. 2004).

Neben OCT-3/4 stellt der Stammzellfaktor-Rezeptor c-Kit einen weiteren Marker für primordiale Keimzellen, CIS-Zellen und Seminome dar. Dieser wird von Stammzellen produziert und ist unter anderem für deren Differenzierung nötig. Für das Embryonalkarzinom typische Marker sind die Transkriptionsfaktoren NANOG und SOX2 (SRY-box 2), die unter anderem für die Erhaltung der Pluripotenz bedeutsam sind (de Jong et al. 2005). Für die klinische Diagnostik der einzelnen KZT stehen vier

weitere Tumormarker zur Verfügung: Alpha-Fetoprotein (AFP), Beta-Humanes-Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) und Laktatdehydrogenase (LDH) (Schmelz et al. 2006). Letztere ist dabei ein unspezifischer Marker, deren Konzentration in etwa proportional zur Gesamttumormasse ist. Zu einer Erhöhung der PLAP kommt es bei Seminomen. Allerdings ist diese auch bei Rauchern erhöht und kann so falsch positive Ergebnissen hervorrufen. Außerdem ist  $\beta$ -HCG ( $>5\text{ng/ml}$ ) bei Seminomen erhöht, welches ebenfalls bei Chorionkarzinomen meist überexprimiert wird. AFP lässt sich bei Seminomen so gut wie nie verstärkt nachweisen. Dieses ist bei Embryonalkarzinomen, vor allem beim Dottersack-Karzinom, der Fall ( $>10\text{ng/ml}$ ). Falsch positive Werte können hier durch Leberzellschäden, Pankreas- oder Kolonkarzinome entstehen.

### 1.3 Cisplatin

#### 1.3.1 Standardtherapie mit Cisplatin

Die Zulassung von Cisplatin für die Behandlung von KZT im Jahr 1979 hat die Mortalitätsrate in dieser Tumorerkrankung mit nur noch 0,33 Todesfällen pro 100.000 Einwohnern im Jahr 2001 so stark gesenkt, dass man bei testikulären KZT mittlerweile von einer potentiell heilbaren Krankheit sprechen kann (Ebbing et al. 2008). Die jeweilige Prognose hängt jedoch stark davon ab, in welchem Stadium die Krankheit diagnostiziert wird. Hierzu gibt es die in Tabelle 1 gezeigte klinische Einteilung für Seminome als auch für Nichtseminome nach der Klassifikation von Lugano.

Tab. 1: Klassifikation nach Lugano

Stadium	Klinisch
I	Kein klinischer oder bildgebender Metastasennachweis
IIA	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser kleiner als 2cm
IIB	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser von 2 bis 5 cm
IIC	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser größer als 5 cm
III	Supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen und/oder hämatogene Aussaat

In den Stadien I bis IIC unterscheidet sich die Therapie des Seminoms von der des Nichtseminoms. Das Seminom ist ein sehr strahlensensibler Tumor und die Radiatio stellt die Therapie der Wahl dar. Im Stadium I kann bei entsprechender Risikokonstellation auch zunächst die Surveillance-Strategie angewandt werden.

Alternativ kann eine Carboplatin-Monotherapie durchgeführt werden (Ebbing et al. 2008). Bei einer Behandlung von Seminomen im klinischen Stadium II kann alternativ zur Radiotherapie eine zytostatische Dreierkombination aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) für drei Zyklen verabreicht werden. Die Gesamtüberlebensrate bei Seminompatienten beträgt insgesamt nahezu 100% (Schmelz et al. 2006). Für Nichtseminome stellen Cisplatin-basierte Chemotherapien die Standardbehandlung dar, da diese Tumoren nicht besonders strahlensensibel sind. Im Stadium I werden zwei Zyklen à 21 Tage PEB empfohlen, wenn aufgrund der Risikokonstellation von der Surveillance-Methode abzuraten ist. Da Bleomycin sich negativ auf die Lungenkapazität auswirken kann, kann alternativ etwa bei vorbestehender Lungenerkrankung oder geplanter pulmonaler Resttumorresektion auch Ifosfamid, Cisplatin und Etoposid gegeben werden (PEI-Schema). Die Heilungsrate liegt hier bei nahezu 99%.

Im Stadium II unterscheidet man zwischen markernegativen und -positiven NSGCT. Liegen zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine erhöhten Spiegel von AFP,  $\beta$ -HCG und/oder LDH vor, behandelt man die markernegativen Tumoren je nach Risikokonstellation entweder mittels der Surveillance-Methode oder mit einer nervenschonenden, retroperitonealen Lymphadenektomie (RLA) mit engem Follow-up. Bei höherem Risiko, wie beispielsweise bei Gefäßeinbrüchen des Primärtumors, behandelt man mit zwei Zyklen PEB. Die Heilungsrate liegt hier bei 98% (Schmelz et al. 2006).

Markerpositive NSGCT fallen ebenso wie alle metastasierten und fortgeschrittenen Typ III Seminom- und Nichtseminom-KZT in die Klassifikation der IGCCCG, eine Einteilung der internationalen Germ Cell Cancer Collaborative Group (Vgl. Tab.2). Hier werden drei Prognosegruppen unterschieden:

**Tab. 2: IGCCCG-Prognoseklassifikation**

<b>1. Gute Prognose</b> ( >90% 5-Jahres-Überleben)	<b>2. Intermediäre Prognose</b> ( >75% 5-Jahres-Überleben)	<b>3. Schlechte Prognose</b> ( <50% 5-Jahres-Überleben)
Nichtseminom (inkl. Primär retroperitonealer Tumor) und niedrige Marker und keine nicht pulmonalen viszeralen Metastasen	Nichtseminom wie unter 1., aber intermediäre Marker	Nichtseminom primär mediastinal oder testikulär/retroperitoneal mit hohen Markern oder nicht pulmonalen viszeralen Metastasen
Seminom (jede Primärlokalisation) und jedes Markerniveau und keine nicht pulmonalen viszeralen Metastasen	Seminom wie unter 1. mit nicht pulmonalen viszeralen Metastasen	----
Marker: AFP < 1000 ng/ml und $\beta$ -HCG < 5000 I U/l (< 1000 ng/ml) und LDH < 1,5 x Normalwert	Marker: AFP 1000 - 10000 ng/ml oder $\beta$ -HCG 5000 - 50000 I U/l (1000 - 10000 ng/ml) oder LDH 1,5 - 10 x Normalwert	Marker: AFP > 10000 ng/ml oder $\beta$ -HCG > 50000 I U/l (> 10000 ng/ml) oder LDH > 10 x Normalwert

In Gruppe 1 wird mit drei Zyklen PEB behandelt, womit eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von über 90% erzielt werden kann. In Gruppe 2 werden vier Zyklen PEB verabreicht. Patienten, die der Gruppe mit schlechter Prognose angehören, behandelt man auch mit vier Zyklen PEB oder PEI. Ein Vorteil der Hochdosischemotherapie konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt können durch Cisplatin 80% aller Patienten mit metastasierten KZT geheilt werden, womit dieses Malignom die höchste Heilungsrate aller Tumoren im Erwachsenenalter aufweist (Stockinger 2007). Bei den verbleibenden 20% aller Patienten kommt es jedoch zur Ausbildung oder dem primären Vorliegen einer Cisplatinresistenz. Diese Patienten haben eine sehr schlechte Prognose. Noch ist nicht restlos geklärt, worauf diese Resistenzen beruhen, jedoch erhärten sich einige Hypothesen, auf die später näher eingegangen wird. Um die Prognosen dieser Patienten zu verbessern, ist es nötig, neue Substanzen zu testen, was bereits vielfach begonnen wurde. Eine der Substanzen ist der Multikinase-Inhibitor Sunitinib, um den es in dieser Arbeit geht.

### 1.3.2 Wirkweise von Cisplatin

Cisplatin ist ein neutrales, quadratisch-planares Molekül, das als Prodrug vorliegt und in physiologischer Kochsalzlösung intravenös appliziert wird. Durch diese über 100mM hohe Chloridkonzentration bindet es zwei Chlorliganden, die das Molekül bis zum Durchtritt in den intrazellulären Raum mittels Diffusion bzw. Transport über Membranproteine stabilisieren. Erst durch die intrazellulär niedrige Chloridkonzentration kommt es zur Abspaltung der Chlorliganden und Anhängen von Hydroxylgruppen, so dass ein positiv geladenes Elektrophil entsteht (siehe Abbildung 6). Cisplatin ist nun in der Lage Addukte mit Nucleophilen zu bilden und ist somit aktiviert.

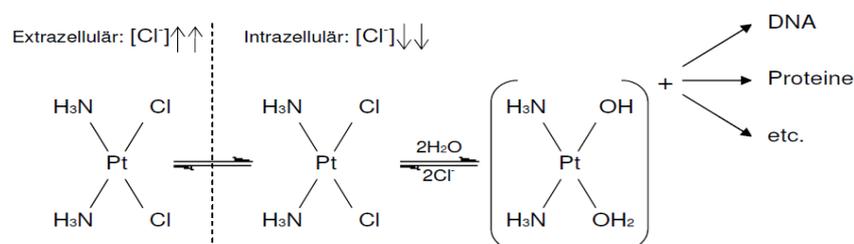


Abb. 6: Aktivierung von Cisplatin: Fähigkeit zur Adduktbildung durch Elektrophilität

Zum Großteil bildet Cisplatin Addukte mit Proteinen, RNA und thiol-bindenden Molekülen wie Gluthation. Den wesentlichen Effekt aber macht die Adduktbildung mit der genomischen DNA aus, die jedoch nur zu einem sehr geringen Prozentsatz

stattfindet. Hierbei kommt es zum einen zur Bildung von Intrastrangvernetzungen, bei denen entweder benachbarte Basen (1,2-Intrastrangvernetzung) oder Basen über ein weiteres Basenpaar hinweg (1,3-Intrastrangvernetzung) eines Stranges über Cisplatin vernetzt werden. Zum anderen kommt es zur Vernetzung beider DNA-Stränge über benachbarte Basenpaare, den 1,2-Interstrangverbindungen. Beide Vernetzungsmöglichkeiten sind in Abb. 5 dargestellt. Dabei codieren die Buchstaben A und G für die Basen Adenin bzw. Guanin, wie z.B. GG in 1,2-GG-Intrastrangvernetzung für die Ausbildung von Platin-Addukten zwischen zwei Guaninen, welches mit ca. 65% das häufigste Addukt darstellt (Müller 2005).

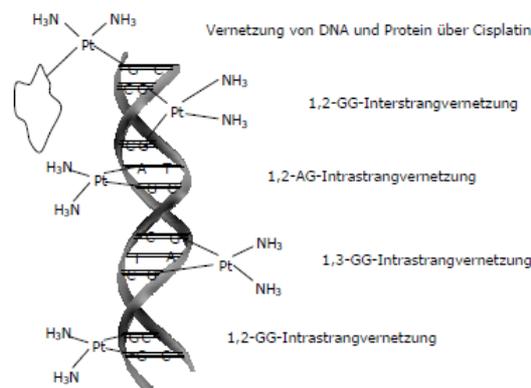


Abb. 5: mögliche Cisplatin-DNA-Addukte (Gosepath 2007)

Diese Addukte hindern die Zelle nun an fundamentalen Prozessen wie unter anderem der Transkription und Translation. Des Weiteren kommt es zur Strukturveränderung der Doppelhelix, woraufhin DNA-Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden. Um der Zelle Zeit zu geben, diese Reparatur durchzuführen, geht sie in den Zellzyklusarrest. Maßgebend vermittelt wird dies durch den Transkriptionsfaktor p53, welcher unter normalen Bedingungen relativ instabil ist und rasch abgebaut wird. Liegt jedoch ein DNA-Schaden vor, kommt es zur Phosphorylierung von p53 und damit zur Stabilisierung und Akkumulation des Transkriptionsfaktors in der Zelle, woraufhin der Arrest eingeleitet wird (Rai et al. 2005).

Für die Reparatur der DNA-Schädigung sind dann mehrere Proteinkomplexe von Bedeutung. Das wichtigste System um Cisplatin-DNA-Addukte zu reparieren ist das „Nucleotide Excision Repair System“ (NER) (Reed 1998). Diesen Komplex kann man in zwei Gruppen teilen. Werden Deformierungen in der Doppelhelix festgestellt, ist ein Teil in der Lage, sowohl den codierenden als auch den nichtcodierenden Strang zu untersuchen und gegebenenfalls Reparaturproteine zu rekrutieren. Der andere

Teil erkennt transkriptionsblockierende Schäden der DNA und wird durch die RNA-Polymerase II aktiviert (Wang et al. 2003). Einen weiteren wichtigen Faktor in der DNA-Reparatur stellt der „Base Excision Repair Komplex“ (BER) dar, welcher kleine Schäden beseitigt, indem er einzelne Basen herausschneidet. Außerdem gibt es das „Mismatch-Reparatursystem“ (MMR), welches ebenfalls fehlerhaft kombinierte Basenpaare bei der Replikation erkennen und reparieren kann. Sind die DNA-Schäden irreparabel, kommt es zu einer stetig steigenden intrazellulären Akkumulation von p53. Daraufhin bindet der Transkriptionsfaktor an die DNA und es kommt zur Herabregulierung der Bcl2-Gene, wodurch über Aktivierung der Caspasen die Apoptose eingeleitet wird (Rai et al. 2005).

Auch bei anderen Tumorerkrankungen, etwa bei Bronchial-, bei Kopf- und Halstumoren sowie beim Cervix-Karzinom, wird Cisplatin zur Behandlung eingesetzt. Jedoch hat sich gezeigt, dass KZT zwei- bis viermal besser auf die PEB-Therapie ansprechen als andere Tumoren (Fry et al. 1991, Oosterhuis et al. 1984). Ein Grund hierfür ist die den Keimzellen innewohnende Eigenschaft, auf DNA-Schäden mit Apoptose zu reagieren. Außerdem weisen KZT eine niedrige intrazelluläre Konzentration an Gluthation auf, welches Cisplatin binden und somit inaktivieren kann.

### **1.3.3 Mechanismen der Cisplatinresistenz**

Wie oben erwähnt, kommt es in etwa 20% der Fälle zu Cisplatinresistenz, wofür die Ursachen bislang noch nicht exakt geklärt werden konnten.

Im Wesentlichen jedoch lassen sich die Mechanismen, die der Cisplatinresistenz zugrunde liegen, in zwei große Gruppen teilen. Zum einen wird verhindert, dass Cisplatin seine Zielstruktur, die DNA, in dem Maße erreicht, dass die Substanz dort ihre volle Wirkung erreichen kann. Zum anderen werden verschiedene Signalwege gestört, so dass es nicht oder nur verzögert zur Induktion der Apoptose kommt. Wo genau und welche Änderungen vorliegen, konnte noch nicht sicher bewiesen werden. Man geht jedoch davon aus, dass zur Unterbindung des Erreichens der Zielstruktur bestimmte Kupfertransporter (CTR) durch Änderungen des Cisplatin In- und Efflux beteiligt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei gesteigerter Expression des CTR1 (vermuteter Influx-Transporter für Cisplatin) ebenso höhere intrazelluläre Cisplatinkonzentrationen vorlagen. So könnte umgekehrt eine verminderte Expression bzw. Inaktivität dieser Rezeptoren zu einer Cisplatinresistenz führen.

Daneben werden auch die beiden Kupfer-Efflux-Transporter ATP7A und ATP7B mit Cisplatin-Transportvorgängen in Verbindung gebracht (Samimi et al. 2004). Weiterhin wäre ein erhöhter Efflux von Cisplatin aus der Zelle über MDR-Proteine (Multi-drug-resistance) möglich oder eine gesteigerte Detoxifikationsfähigkeit durch höhere Expression von Gluthation und Metallothionin. Auch wurde der Einschluss von Cisplatin in kleine Einschlusskörperchen und die damit verbundene Hinderung an die DNA zu binden, als Möglichkeit in Betracht gezogen. Jedoch haben sich für diese Ansätze bisher keine überzeugenden Ergebnisse gefunden. Bewiesen werden konnte, dass die Zelle sich durch Membranveränderungen, z.B. vermehrte Einlagerung von Kollagen, vor der passiven Diffusion von Cisplatin schützen kann (Holzer et al. 2004).

Ist der Resistenzmechanismus nicht auf eine zu geringe Akkumulation der Substanz im Zellkern zurückzuführen, muss von Defekten der Reparatursysteme ausgegangen werden, wobei alle drei Systeme betroffen sein können. Dies könnte zum einen der Fall sein, indem das Reparatursystem die fehlerhafte DNA nicht richtig identifiziert, zum anderen könnte eine verstärkte Initiierung und Durchführung der Reparatur zugrunde liegen. Folglich kommt es zu einer erhöhten Toleranz gegenüber fehlerhafter DNA und die eigentlich einzuleitende Apoptose wird gar nicht oder deutlich seltener induziert. Hierfür wird vor allem das NER-System verantwortlich gemacht (Kartalou und Essigmann 2001). Einer anderen Theorie zufolge könnten DNA-Glykosylasen, die in den BER bzw. NER-Komplex involviert sind, dafür verantwortlich sein (Kartalou et al. 2000). Außerdem wird vermutet, dass Defekte im Ablauf der Signalkaskade der Apoptose zu einer Resistenz führen, beispielsweise durch verstärkte Expression von antiapoptotischen Proteinen wie etwa denen der Bcl-2 Familie oder eine Störung der Caspase-9-Funktion (Mueller et al. 2003). Die bisher überzeugendsten Ergebnisse bei der Entstehung der Resistenz sind jedoch auf ein defektes Mismatch-Reparatursystem zurückzuführen (Honecker et al. 2009). In Zellversuchen konnte bei einem defekten MMR-System eine doppelte bis dreifache Resistenz gegenüber Cisplatin festgestellt werden. Bei einem unvollständigen MMR-System konnte sogar eine Resistenzerhöhung um das 100-fache beobachtet werden (Stojic et al. 2004). Solche Defekte können zu Mikrosatelliten-DNA-Instabilitäten (MSI) führen. Untersuchungen bei refraktären KZT wiesen in ca. 45% der Fälle diese MSI auf, was die Vermutung erhärtet, dass sie eine bedeutende Rolle in der Resistenzentwicklung spielen (Mayer et al. 2002,

Honecker et al. 2009). Des Weiteren hat man festgestellt, dass HMG-Proteine (High Mobility Group) bedeutend für die Cisplatinempfindlichkeit sind (Perez 1998, Arioka et al. 1999). Das lässt darauf schließen, dass auch ein Defekt dieser Proteine die Resistenzentwicklung beeinflussen kann.

### **1.3.4 Klinisches Vorgehen bei Cisplatinresistenz**

Im Falle einer Cisplatinresistenz ist es notwendig, auf andere Medikamente auszuweichen. Substanzen wie Paclitaxel, Gemcitabin und Oxaliplatin sprechen in der Monotherapie bei Cisplatin-refraktären Fällen zwar an, zeigen jedoch kein Langzeitüberleben. Kombiniert man diese drei Zytostatika miteinander und verabreicht vier Zyklen ergibt sich eine Gesamtansprechrate von immerhin 51% und Langzeitremissionen von 10 bis 15% (Bokemeyer et al. 2008). Diese Kombination wird daher in einem metastasierten Stadium bei einem Rezidiv empfohlen. Kommt es daraufhin zu einer erneuten Krankheitsprogression, fehlen derzeit Therapieoptionen. Zuletzt wurde in dieser Situation im Rahmen einer klinischen Studie die Verträglichkeit und Effektivität von Sunitinib untersucht (Oechsle, Honecker et al., Manuskript eingereicht). Dieses Medikament, das auf molekularer Ebene ansetzt und zu den sogenannten „Small Molecule Inhibitors“ gehört, hemmt bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen und stellt somit einen relativ neuen Ansatz dar. Sunitinib wird bei anderen Tumorerkrankungen schon standardmäßig eingesetzt. Einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Sunitinib besitzen Temsirolimus und Everolimus. Diese Substanzen finden Anwendung bei anderen Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom und sind in der Testphase für die Anwendung bei KZT. Temsirolimus und Everolimus sind Derivate von Sirolimus und sind m-TOR Inhibitoren. Somit bewirken diese Medikamente unter anderem die Hemmung des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose.

Einen weiteren Therapieansatz bei KZT stellt auf molekularer Ebene die Antikörpertherapie dar, mit der jedoch lediglich in Einzelfällen eine Remission erreicht werden konnte. Verabreicht wurde der Antikörper Trastuzumab als Monotherapie oder eine Kombination aus Chemo- und Antikörpertherapie, bei der der Antikörper Bevacizumab verwendet wurde (Honecker et al. 2008).

Ein weiterer Versuch, gegen Cisplatin-refraktäre Tumoren anzukommen, wurde mit Thalidomid unternommen. Dieser VEGF-Inhibitor hemmt die Vaskularisierung von

Tumoren, zeigte jedoch in einer klinischen Fallserie nur einen äußerst geringen Erfolg (als Übersichtsarbeit siehe Ebbing et al. 2008)

### 1.4 Sunitinib

#### 1.4.1 Allgemeine Informationen zu Sunitinib

In einem Zufallsversuch entdeckten Sun und seine Mitarbeiter, dass einige Derivate von 2-Oxindolen (Indole, die an Stelle 2 oxidiert wurden) in der Lage sind, die Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF-R) Kinaseaktivität zu hemmen. Außerdem stellte man fest, dass dieser erste Vorläufer von Sunitinib, SU-5416, zusätzlich den Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$  (PDGF-R), den Makrophagen Colony Stimulating Factor-1-Receptor (CSF-1R), den Stammzellefaktor-Rezeptor (c-Kit) und den Fms-like Tyrosine Kinase-3-Rezeptor (Flt-3) inhibiert (Roskoski 2007). Ein Problem stellte jedoch die geringe Hydrophilie von SU-5416 dar. Die Substanz wurde den Versuchsmäusen deshalb subkutan verabreicht. Die verbesserte nachfolgende Substanz, SU-6669, ebenfalls ein 2-Oxindol-Derivat, konnte mit dem mehr oder weniger gleichen Wirkspektrum in einer wasserlöslicheren und auch potenteren Form produziert werden. Diese wurde den Versuchsmäusen oral appliziert. Nach einer noch weiter verbesserten Substanz, dem SU-10944, entstand letztendlich SU-11248, das Sunitinib. Dieses hat die Summenformel  $C_{22}H_{27}FN_4O_2$  und die in Abb. 6 gezeigte Strukturformel.

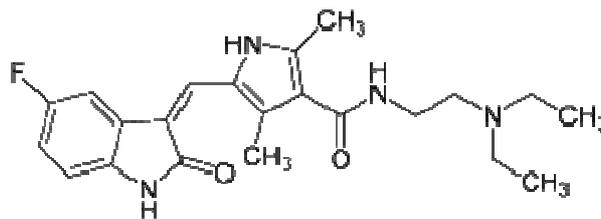


Abb.6: Strukturformel von Sunitinib (SU-11248)

Sunitinib ist also ein Multikinase-Inhibitor, der mindestens acht verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) hemmt, die alle eine Rolle in der Tumorprogression, -metastasierung und -vaskularisierung spielen (Roskoski 2007). Diese sind der PDGF-R  $\alpha$  und  $\beta$ , der VEGF-R 1, 2 und 3, c-Kit, der CSF-1R und außerdem Flt-3 sowie eine Kinase, die über ret-proto-oncogene (RET) kodiert wird (Schmidinger und Loidl 2007). VEGF-R 1 und 2 spielen eine Schlüsselrolle in der Angio- und Vaskulogenese, ebenso sind PDGF-R, die auf Perizyten sitzen und das vaskuläre Endothel stabilisieren, wichtig für die Angiogenese (Chow und Eckhardt 2007). C-Kit,

Flt-3 und RET sind ebenfalls bedeutsam für die Signaltransduktion und das Wachstum von soliden Tumoren.

### **1.4.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen: Angriffspunkt von Sunitinib**

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sind an der Pathogenese vieler maligner Krankheiten beteiligt, da sie eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion spielen. Ihre Aufgabe ist es, extrazelluläre Reize, wie Wachstums- und Überlebensstimuli aufzunehmen und an den Zellkern weiterzuleiten, um die dortige Genexpression zu ändern. Bisher konnten 58 dieser membrangebundenen Tyrosinkinase-Rezeptoren identifiziert werden. Weiterhin sind 32 Tyrosinkinasen bekannt, die keine Rezeptorfunktion haben (Robinson et al. 2000). Das Charakteristische an RTK ist ihr transmembranärer Aufbau. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die den Bindungsort für Liganden darstellt, einem transmembranären Teil und einer intrazellulären Proteindomäne, welche die Tyrosinkinase enthält. Als Tyrosinkinasen werden sie deshalb bezeichnet, da die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Kinase an der Tyrosingruppe stattfindet. Es sind ebenfalls Rezeptor-Kinasen bekannt, bei denen die Phosphatgruppe auf einen Serin- oder Threonin-Aminosäurerest übertragen wird (Ser/Thr-Kinasen).

Die meisten der Tyrosinkinasen „schwimmen“ in der Zellmembran und überspannen diese im inaktiven Zustand als Monomere. Eine der wenigen Ausnahmen ist beispielsweise der Insulin-Rezeptor, welcher auch in inaktivem Zustand als Dimer vorliegt. Bindet nun ein Substratmolekül an der extrazellulären Bindungsstelle, kommt es zur Änderung der Quartärstruktur und zwei Rezeptor-Monomere verbinden sich zu einem Dimer. Durch diese Konformationsänderung lagern sich die intrazellulären Proteindomänen so eng aneinander, dass es zur gegenseitigen Phosphorylierung kommt (Autophosphorylierung). Die intrazelluläre Kinasedomäne liegt bis zu diesem Zeitpunkt im inaktiven Zustand vor. Sowohl die substratbindende als auch die ATP-bindende Stelle ist blockiert, da das aktive Zentrum durch eine Aktivierungsschleife verlegt ist. Durch diese nun stattfindende Übertragung eines Phosphatrestes auf die Tyrosin-Gruppen der Aktivierungsschleife kommt es jedoch zur Konformationsänderung und die beiden Bindungsstellen werden frei gelegt. Somit ist die Tyrosinkinase aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung weiterer Tyrosinreste außerhalb dieser Kinasedomäne. Um diese Signale nun weiterleiten zu können, werden spezifische Proteinregionen, die sogenannten src-Homology-2-Domänen

(SH2-Domänen) oder phosphotyrosinbindenden Regionen (PTB), benötigt. Diese erkennen die phosphorylierten Tyrosinabschnitte, binden daran und können die Aktivierung weiterleiten, indem sie Phosphatgruppen übertragen. Diese SH2-Domänen-Proteine können entweder Adapterproteine (1) darstellen (Grb2-induzierter Weg) oder selbst katalytische Eigenschaften besitzen (2) (PI3-Kinase). Zur Verdeutlichung siehe Abb. 7. Außerdem gibt es assoziierte Tyrosinkinasen, die an die intrazellulären Domänen der Rezeptoren angeheftet sind, sogenannte Januskinasen (JAK/STAT-Weg) (3).

Im Fall (1) kommt es zur Phosphorylierung des Adapterproteins Growth-factor-receptor-bound-protein-2 (Grb-2). Dieses hat eine SH2-Domäne, mit der es an den phosphorylierten Tyrosinrest bindet, und eine SH3-Domäne, mit der es den nächsten Baustein der Signalkaskade, das SOS-Protein (son of sevenless), bindet. Diese beiden Proteine diffundieren nun gekoppelt an die Plasmamembran, wo sie an einen weiteren Proteinkomplex, das Ras/GDP binden. SOS ist ein GTP-Austauschfaktor und kann seinen Phosphatrest auf das mit RAS (Rat sarcoma) gekoppelte GDP (Guanosindiphosphat) übertragen, wodurch GTP (Guanosintriphosphat) entsteht. Somit ist RAS aktiviert. Dieser RAS-GTP-Komplex ist nun in der Lage, B-Raf (Rapidly growing fibrosarkoma), eine Ser/Thr-Kinase, zu aktivieren. Alle weiteren Schritte werden auch als MAPK-Kaskade (mitogen activated protein kinase) zusammengefasst. Auf B-Raf folgt die Aktivierung mehrerer Ser/Thr/Kinasen durch „Weitergeben“ des aktivierenden Phosphatrests. So aktiviert Raf das Protein MEK 1 und 2, dieses wiederum ERK (extracellular signal regulated protein kinase) 1 und 2. ERK aktiviert spezielle Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (activator protein), wovon jun und fos die Bedeutendsten darstellen. Jun und fos bilden Heterodimere und binden an die DNA, wodurch sie die Zellproliferation starten.

Des Weiteren kann der aktivierte RAS/GTP Komplex ebenfalls die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren. Die PI3K besitzt jedoch auch selbst eine SH2-Domäne. Dadurch wird eine zusätzliche Aktivierung direkt über den phosphorylierten Tyrosinrest der RTK ermöglicht (2). Liegt die PI3K im phosphorylierten Zustand vor, kann sie an die Zellmembran diffundieren, wo sich ihr Substrat Phosphatidylinositol (PI) befindet. Dieses wird daraufhin zu PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-bisphosphat) bzw. PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-trisphosphat) katalysiert. PIP<sub>3</sub> kann nun die Protein-Kinase AKT (eine Ser/Thr-Kinase) initiieren. Diese hat mehrere Funktionen. Zum einen kann sie BAX, einen proapoptischen

Faktor binden und somit inaktivieren, wodurch die Einleitung der Apoptose ausbleibt. Außerdem wirkt sie über Aktivierung von Rheb, welches mTOR in Gang setzt. Dieses wiederum bringt SGK in seine aktive Form, woraufhin es an Ribosomen bindet. Diese starten die Translation und wirken sich so positiv auf die Zellproliferation aus. Eine weitere Funktion von AKT ist die Phosphorylierung von FOXO einem Tumorsuppressorgen, welches daraufhin seine Wirkung verliert und in mehreren Schritten von Proteasomen abgebaut wird.

Das oben erwähnte PIP<sub>2</sub> induziert einen weiteren Signalweg, denn es stellt das Substrat der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) dar. Diese besitzt eine SH2-Domäne und kann auch auf Weg (2) direkt von der RTK aktiviert werden. PLC spaltet PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> (Inositoltrisphosphat), welches im Cytosol diffundieren kann, und DAG (Diacylglycerin), welches in der Plasmamembran verbleibt.

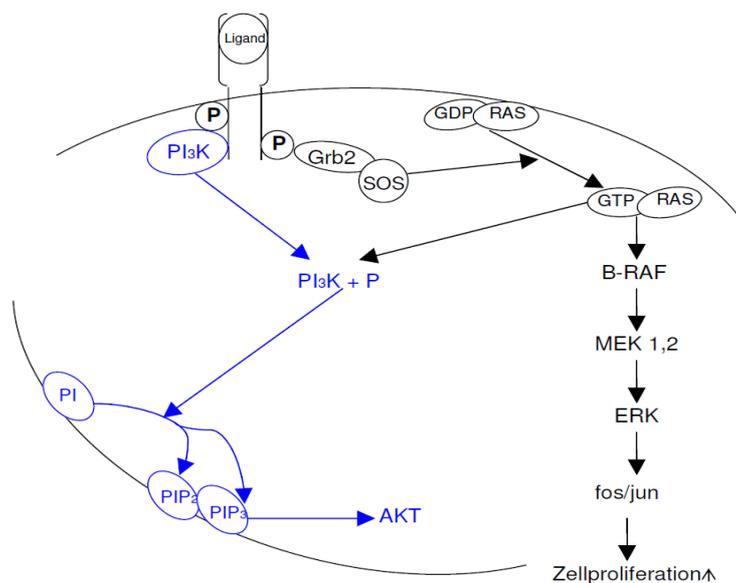


Abb. 7: Signaltransduktionswege nach Aktivierung der RTK (in schwarz ist Weg 1 dargestellt, blau signalisiert Weg 2)

Einen dritten Signalweg (3) stellt die Aktivierung von assoziierten Tyrosinkinassen dar. Hier sind so genannte Janus-Kinasen (JAK) an der intrazellulären Domäne der Rezeptoren assoziiert. Durch die Dimerbildung des Rezeptors kommt es zur gegenseitigen Phosphorylierung der JAK-Kinasen. Sobald diese im aktivierten Zustand vorliegen, können sie weitere Regulationsproteine, die STAT-5 (signal transducers and activators of transcription) binden. STAT-5 wird an einem Tyrosinrest phosphoryliert und bindet daran eine SH2-Domäne eines weiteren STAT-5-Moleküls. Dieses Dimer wandert nun in den Zellkern, heftet sich dort an die DNA

und nimmt Einfluss auf die Genregulation (Stryer et al. 2003, Koolmann und Röhme 2003, Becker 2005).

Eingeteilt werden die membranständigen Tyrosinkinassen in vier Gruppen (Ehrenfels 2000). Gruppe I besitzt zwei cysteinreiche Sequenzen im extrazellulären Teil. Ein Vertreter dieser Gruppe ist zum Beispiel der „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGF-R). Die RTK der Gruppe II liegen immer als Dimer vor. Sie besitzen zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, welche über extrazelluläre Disulfidbrücken aneinander gekoppelt sind. Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist der Insulin-Rezeptor. Gruppe III und IV haben das Charakteristikum, dass sie immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen aufweisen und außerdem ihre Kinase durch ein sogenanntes „Kinase-Insert“ zweigeteilt ist. Gruppe III besitzt fünf dieser immunglobulinähnlichen Domänen. Der „Platelet Derived Growth Factor Receptor“ (PDGF-R) zählt unter anderem zu dieser Gruppe. Gruppe IV zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Vertreter drei dieser Domänen am extrazellulären Teil ihres Rezeptors besitzen. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem der „Fibroblast Growth Factor Receptor“ (FGF-R).

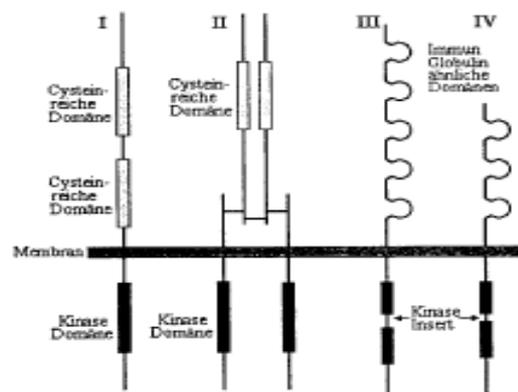


Abb. 8: Einteilung von Rezeptor-Tyrosinkinassen (Ehrenfels 2000)

Durch die Aktivierung der RTK werden also komplexe und exakt aufeinander abgestimmte biochemische Vorgänge in Gang gesetzt. Dass Defekte in dieser Signaltransduktion enorm zur malignen Transformation von Zellen beitragen können, ist demnach zu erwarten. Die Hemmung dieser Kinasen könnte so die Entstehung und den Verlauf von Tumorerkrankungen positiv beeinflussen. Daher sind diese Kinasen bereits seit langem ein Schwerpunkt in der onkologischen Forschung.

### 1.4.3 Von Sunitinib gehemmte Tyrosinkinasen

Sunitinib inhibiert einige RTK, vorwiegend die der Gruppe III. So gehören PDGF-R, c-Kit, CSF-R1 sowie Flt-3 zu Gruppe III mit fünf immunglobulinähnlichen Domänen (vgl. Abb. 9). VEGF-R ist der einzige von Sunitinib gehemmte Rezeptor, der einen etwas anderen Aufbau besitzt. Teilweise wird er auch als Gruppe V-Rezeptor bezeichnet (Fedi et al. 2000). Dieser besitzt sieben immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen.

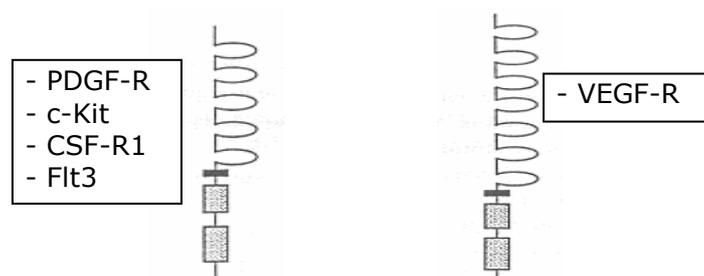


Abb. 9: RTK des Typ III (links) und Typ V (rechts), die Angriffspunkte von Sunitinib darstellen (Fedi et al. 2000).

Liganden des **VEGF-R** sind die Polypeptide VEGF-B bis -E. Diese Wachstumsfaktoren sind entscheidend an der Angiogenese und Vaskulogenese, also den beiden Komponenten der Neovaskularisation, beteiligt (Roskoski 2007). Als Vaskulogenese bezeichnet man die Neubildung von Blutgefäßen aus Hämangioblasten und reifen Endothelzellen (Embryogenese). Angiogenese ist die Bildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßnetzwerken durch Sprießen neuer Kapillare. Insofern stimuliert VEGF ebenfalls die Proliferation der endothelialen Zellen sowie deren Migration und Überleben. Zudem verstärkt es die vaskuläre Permeabilität, weshalb es ursprünglich als Permeabilitätsfaktor beschrieben wurde.

Der **PDGF-R** und sein Substrat, PDGF, spielen in der Angiogenese eine wichtige Rolle: PDGF regt die Proliferation von glatten Muskelzellen unter anderem in den Gefäßen sowie von Fibroblasten und vielen weiteren Zellen mit mesenchyalem Ursprung an. In den glatten Gefäßmuskelzellen werden die PDGF-R exprimiert, PDGF dagegen in den vaskulären Endothelzellen. Bei Versuchen an Melanom- und Gliom-Xenograft-Modellen, VEGF-R und PDGF-R mit Sunitinib zu inhibieren, wurde eine Dosis von 20 bis 40 mg/kg/d benötigt (Chow and Eckhardt 2007). Ebenfalls hat sich gezeigt, dass die gemeinsame Hemmung von VEGF und PDGF einen überadditiven Effekt besitzt.

**C-Kit** wird normalerweise durch den Stamm-Zell-Faktor (SCF), der auch als Kit-Ligand bezeichnet wird, aktiviert. Dieser wird hauptsächlich in Knochenmark-

Stromazellen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet. Seine Wirkung entfaltet er nach extrazellulärer Rezeptorbindung in Keimzellen, Melanozyten und hämatopoetischen Zellen (Konieczny 2003). Die Stimulierung durch SCF bewirkt in der Zelle eine starke Proliferation und Antiapoptose. Hier betrug die zur Hemmung der Kinase benötigte Sunitinib-Dosis 40 bis 80 mg/kg/d. Getestet wurde dies an Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Chow and Eckhardt 2007).

**Flt-3** (fms-relates tyrosine kinase) wird vor allem in den frühen myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen des Knochenmarks exprimiert und reguliert Proliferation und Überleben der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Mit zunehmender Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen geht die Flt-3-Expression verloren. Die zur Inhibierung von Flt-3 benötigte Sunitinib-Konzentration bei einem AML-Zelllinien-Modell (akute myeloische Leukämie) lag bei 20 mg/kg/d (Chow and Eckhardt 2007).

Das Substrat des **CSF-R**, der auch als M-CSF-R (Makrophagen colony stimulation factor receptor) bekannt ist, stellt der Osteoklastenfaktor CSF dar. Dieser wird von Tumorzellen produziert und initiiert die Osteolyse, indem er die Osteoklasten aktiviert. Hier konnte bei einer Sunitinib-Dosis von 40 bis 80 mg/kg/d eine Wachstums-Inhibierung von Knochenmetastasen in einem Metastasenmodell von Mamma-Karzinom-Zellen erzielt werden (Chow and Eckhardt 2007).

**RET proto-oncogene-RTK** (RET = rearranged during transfection) ist der Rezeptor für Mitglieder der „glial cell line-derived neurotrophic factor“-Familie (GDNF) und an verschiedenen Wachstumsprozessen beteiligt. Hier zeigte sich in Laborversuchen bei medullären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien eine  $IC_{50}$  von 100 nmol/l (Chow and Eckhardt 2007).

Die Funktionen aller von Sunitinib gehemmten Rezeptoren sind in Tab. 3 nochmals zusammengefasst.

**Tab. 3: Funktionen der Rezeptoren, die Angriffspunkte von Sunitinib darstellen**

Rezeptor	Polypeptidliganden	Rezeptorfunktionen und -eigenschaften	Aktuelle und potenzielle Therapieziele
VEGF-R1	VEGF, VEGF-B, PlGF	Vaskulogenese, Angiogenese und Monozyten/Makrophagen-Motilität	Vaskuläre endotheliale Zellen/Monozyten
VEGF-R2	VEGF, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E	Vaskulogenese, Angiogenese und endotheliale Zellbeweglichkeit	Vaskuläre endotheliale Zellen
VEGF-R3	VEGF-C, VEGF-D	Vaskuläre und lymphatische Entwicklung und Erhaltung	Vaskuläre und lymphatische endotheliale Zellen
PDGF-R $\alpha$	PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC	Proliferation, Chemotaxis	Bronchial-, Prostata- und Nierenzellkarzinome; chronisch myeloische Leukämie (CML); Glioblastom
PDGF-R $\beta$	PDGF-BB, PDGF-DD	Exprimiert in Perizyten und vaskulären, glatten Muskelzellen; Proliferation, Chemotaxis	Perizyten; Bronchial-, Prostata- und Nierenzellkarzinome; chronisch myeloische Leukämie (CML); Glioblastom
c-Kit	Stammzellfaktor (SCF)	Gametogenese, Hämatopoese, Entwicklung und Funktion von Mastzellen und Melanogenese	Akute myeloische Leukämie (AML), Gastrointestinale Stromatumoren (GIST), Mastozytom, kleinzelliges Bronchiolarkarzinom, Seminom/Dysgerminom, T-Zell-Lymphom
Flt-3	Flt-Ligand (FL)	Proliferation und Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen; exprimiert in myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen	Akute myeloische Leukämie (AML), Myelodysplasie und akute lymphatische Leukämie (ALL)
CSF-1R	Colony-stimulating-factor-1	Differenzierung, Proliferation, Überleben und Funktion von Makrophagen. Stimuliert tumorassoziierte Makrophagen, die die Angiogenese, den extrazellulären Durchbruch und die Metastasierung fördern.	Mamma- und andere Karzinome

#### 1.4.4 Klinischer Einsatz von Sunitinib

Sunitinib, das den Handelsnamen Sutent trägt, wird bereits bei einigen Tumorerkrankungen eingesetzt. So ist es zur Erstbehandlung der fortgeschrittenen und metastasierten Nierenzellkarzinome zugelassen (Fischer et al. 2008). Sunitinib führte zu einem verbesserten progressionsfreien Überleben von elf versus fünf Monaten im Vergleich zur Immuntherapie mit Interferon (als Übersichtsarbeit siehe Manski 2010). Behandelt werden diese Patienten mit Sechs-Wochen-Zyklen (vier Wochen Therapie, zwei Wochen Pause) und einer täglichen Dosis von 50mg. Das relativ gute Ansprechen auf diese Substanz wird darauf zurückgeführt, dass bei der Pathogenese von Nierenzell-Karzinomen der VEGF-R und PDGF-R eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde nachgewiesen, dass bei dieser Tumorerkrankung das Von-Hippel-Lindau-Gen (VHL) in bis zu 80% der Fälle inaktiviert ist (Schmelz et al. 2006). Dies ist ein Tumorsuppressorgen und über andere Proteine an der Expression von VEGF-R und PDGF-R beteiligt. Fällt die Funktion des VHL-Gens aus, kommt es zu einer Überproduktion und somit kontinuierlichen Stimulierung dieser Rezeptoren. Werden diese Rezeptoren jedoch durch Sunitinib gehemmt, kann in dem entstehenden Tumorgewebe keine ausreichende Neovaskularisation stattfinden. Dem Tumor wird also die Gefäßversorgung „abgeschnitten“.

Des Weiteren wird Sunitinib bei Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzt, welche auf die Standardtherapie mit Imatinib (Gleevec, ebenfalls ein Tyrosinkinase-Inhibitor) eine Krankheitsprogression erlitten haben (als Übersichtsarbeit siehe Brandl 2008). Bis zum Einsatz von Sunitinib gab es für imatinibresistente Tumoren, welche unter anderem auf eine Mutation am Exon 14 zurückzuführen sind, keine weitere Behandlungsmöglichkeit. Eine Studie, die den Effekt von Sunitinib bei diesen refraktären Tumoren untersuchte, zeigte, dass die mediane Zeit bis zur Tumorprogression unter Sunitinib mit 6,3 versus 1,5 Monaten rund viermal länger ist (als Übersichtsarbeit siehe Roskosky 2007). Hier scheint der von Sunitinib ausgeübte Effekt eher zytotoxisch als antiangiogenetisch zu sein. So spielt hier nicht die VEGF-R-Inhibierung die entscheidende Rolle, sondern die Hemmung von c-Kit. Da es in 88% der GIST-Tumoren zur Überexpression von c-Kit kommt, scheint hier die Blockierung dieses unter anderem antiapoptotischen Faktors und damit die blockierte nachfolgende Signaltransduktion den wesentlichen Effekt auszumachen. Zusätzlich wurde auch die Inhibierung von PDGF-R  $\alpha$  nachgewiesen. Sunitinib ist standardmäßig für diese beiden Tumorerkrankungen zugelassen und kommt in der Therapie zum Tragen. Auch für andere maligne Erkrankungen wurden bereits Studien mit Sunitinib durchgeführt. So zeigte sich zum Beispiel eine Wirksamkeit gegen Knochenmetastasenbildung beim Mamma-Karzinom. Metastasen entstehen unter anderem, indem der vom Tumor freigesetzte Osteoklastenfaktor M-CSF an seinen Rezeptor CSF-1R bindet und die Osteoklasten dadurch aktiviert. Sunitinib kann diesen Rezeptor durch eine Hemmung der Phosphorylierung bei einer  $IC_{50}$  von 50 bis 100 nM inhibieren. Bei einer *in vivo* Studie konnte bewiesen werden, dass Sunitinib die Knochenmetastasierung dosisabhängig hemmt (40mg/kg/d ermöglicht 64% Reduktion, 80mg/kg/d 89% Reduktion) (als Übersichtsarbeit siehe Schmidinger und Loidl 2007).

Des Weiteren wurde die Wirkung von Sunitinib bei akuter myeloischer Leukämie (AML) untersucht. Dies ist naheliegend, da die Blasten von 60 bis 70% der Patienten mit AML c-Kit exprimieren, sowie bei 60 bis 80% der Patienten Flt-3-R produzieren. Davon wiederum tritt in 35% dieser Fälle ein mutierter Rezeptor mit interner Tandemduplikation (Flt-3-ITD) auf (als Übersichtsarbeit siehe Schmidinger and Loidl 2007). Diese Mutation kann den Rezeptor aktivieren und induziert so eine autonome Zellproliferation. Eine Hemmung des Flt-3-R durch Sunitinib konnte in klinischen Studien bei 100% der Patienten mit Flt-3-ITD sowie bei 50% der Flt-3 ohne Mutation

festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT-5, die in Signalkaskaden bezüglich Zellteilung und -differenzierung involviert sind, durch Sunitinib reduziert wurde. Außerdem konnte eine Inhibierung von Extracellular-signal Regulated Kinasen (ERK) beobachtet werden (als Übersichtsarbeit siehe Schmidinger and Loidl 2007). Diese mitogen aktivierte Kinase ist häufig an der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt.

Außerdem wurde Sunitinib zur Therapie für papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC) in Erwägung gezogen. Dies liegt darin begründet, dass die Bildung einer RET/PTC-Kinase der bedeutendste Schritt in der Tumorgenese ist (Ehlers 2010). *In vitro* Studien zeigten tatsächlich, dass Sunitinib bei einer  $IC_{50}$  von 224nM sowohl die Phosphorylierung der Kinase inhibiert als auch die darauffolgende Aktivierung von STAT-3 unterdrückt. Somit besitzt es einen starken Wachstums-inhibierenden Effekt auf Schilddrüsenkarzinome (als Übersichtsarbeit siehe Schmidinger und Loidl 2007). Zusätzlich wird die Anwendung von Sunitinib beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), bei neuroendokrinen Tumoren, sowie beim Prostata- und Magenkarzinom untersucht.

Wie bereits erwähnt, wurde Sunitinib ebenfalls in einer klinischen Studie bei KZT eingesetzt. Mit der Frage, welche Wirkung diese Substanz bei *in vitro* Versuchen mit KZT-Linien zeigt, beschäftigt sich diese Arbeit.

### 1.4.5 Pharmakologische Eigenschaften von Sunitinib

Da Sunitinib oral in Form von Hartkapseln appliziert wird, ist die Lipophilität bzw. Hydrophilität von enormer Bedeutung. Der Logarithmus vom Verhältnis der Löslichkeit eines Medikaments in Octanol zu Wasser sollte kleiner als 5 sein (Partitionskoeffizient), damit das Medikament durch die Zellmembran unter anderem des Dünndarms absorbiert werden kann. Ist die Substanz zu hydrophil, kann sie nicht durch die lipophilen Membranen diffundieren, ist sie zu lipophil, ist sie in physiologischen Lösungen unlöslich und kann nicht zu ihren Zielzellen transportiert werden. Der Logarithmus des Partitionskoeffizienten von Sunitinib liegt bei 5,2, kommt dem Optimum also sehr nahe (als Übersichtsarbeit siehe Roskoski 2007).

Sunitinibkapseln liegen in der Dosierung 12,5mg, 25mg oder 50mg vor und werden als Sunitinib-Malat verabreicht. Die maximale Konzentration ( $C_{max}$ ) im Gewebe wird sechs bis zwölf Stunden nach Einnahme erreicht, wobei der Wirkstoff zu 90 bis 95% an Plasmaproteine gebunden ist. Die Halbwertszeit (HWZ) von Sunitinib beträgt 40

bis 60 Stunden, die seiner Metabolite 80 bis 110 Stunden. Abgebaut wird Sunitinib über Cyp3A4. Die gleichzeitige Gabe eines Cyp3A4-Induktors führt dazu, dass Sunitinib deutlich schneller abgebaut wird. Zugleich erhöht die zusätzliche Gabe eines Cyp3A4-Inhibitors seine Konzentration signifikant. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Sunitinib selbst keinen Einfluss auf Cyp3A4 hat. Sunitinib wird also weitgehend über die Leber abgebaut und über Faeces ausgeschieden, die renale Clearance beläuft sich lediglich auf etwa 16%. Eine Dosisanpassung an das Körpergewicht scheint nicht erforderlich zu sein. Da in tierexperimentellen Studien eine Reproduktionstoxizität sowie fetale Missbildungen nachgewiesen wurden und außerdem nicht sicher bekannt ist, ob der Wirkstoff in die Muttermilch übergeht, darf das Medikament in der Schwangerschaft und Stillzeit nicht verabreicht werden. Häufige Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, Erschöpfung, Veränderung des Blutbildes und neurotoxische Erscheinungen auf (Pfizer 2007).

### 1.5 Ziel der Arbeit

Der Bedarf an neuen Behandlungsmethoden für Patienten mit Cisplatin-resistenten KZT ist groß. Da bisher noch nicht genau geklärt werden konnte, worauf die Cisplatinresistenz beruht, erscheint es sinnvoll, nach Medikamenten mit einem anderen, neuen Wirkmechanismus zu suchen. Eine relativ neue Wirkstoffgruppe stellen Therapeutika dar, die auf molekularer Ebene wirken, sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren. Die Wirkung von Sunitinib, einem Hauptvertreter dieser Gruppe, soll in dieser Arbeit anhand von *in vitro* Versuchen an KZT-Linien getestet werden. Untersucht werden soll sowohl die Wirkung auf Cisplatin-sensitive Tumorklinien (NT2, 2102EP, NCCIT) als auch auf Cisplatin-resistente Sublinien dieser Zelllinien (NT2-R, 2102EP-R, NCCIT-R).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Zytotoxizität ( $IC_{50}$ ) von Sunitinib bei KZT-Linien zu bestimmen. Hierfür wurden Zytotoxizitätsassays für alle Zelllinien angefertigt, die per Zellzählung und MTT-Analysen ausgewertet wurden.

Des Weiteren wurde die Wirkung von Sunitinib auf die *in vitro* Zellproliferation – unter besonderer Berücksichtigung der Zelldichte – bestimmt. Dies wurde ebenfalls durch Zellzählungen und MTT-Messungen analysiert. Außerdem wurde geprüft, ob Sunitinib Auswirkungen auf den Zellzyklus zeigt. Dies erfolgte anhand von FACS-Messungen.

Die Effekte der Substanz wurden sowohl bei den Cisplatin-sensitiven als auch bei den Cisplatin-resistenten Sublinien untersucht.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Sunitinib auf bekannte, für die Zellproliferation und Apoptose bedeutende Proteine. Hier wurden die im MAP-Kinase-Weg eine wichtige Rolle spielenden Signalproteine MEK und ERK, sowie deren aktivierte Formen pMEK und pERK ausgewählt. Diese Faktoren wurden mittels des Western Blot Verfahrens auf eine veränderte Expression analysiert.

Ebenfalls mittels Western Blot wurde die Wirkung von Sunitinib auf aktivierte Caspase-3 bzw. Spaltprodukte von PARP untersucht und somit verstärkte Apoptoseinduktion analysiert. Caspase-3 Aktivität wurde zusätzlich noch mithilfe von FACS-Messungen überprüft.

Außerdem stellte die Untersuchung einer Kombinationstherapie von Sunitinib mit Cisplatin, dem Standardmedikament der Therapie von KZT, ein weiteres Ziel der Arbeit dar. Anhand von Zytotoxizitätstests wurde die Wirksamkeit einer Monotherapie von Sunitinib mit einer Kombinationstherapie verglichen. Auch hier wurden sowohl die Cisplatin-sensitiven als auch die Cisplatin-resistenten Zelllinien miteinander verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tab. 4: Zelllinien

Zelllinie	Typ	Charakteristika	Quelle
NTERA-2 (NT2)	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	anhärente Epithelzellen mit deutlichen Einlagerungen (Granula), pluripotent	DSMZ
2102EP	Nicht-Seminom (Teratokarzinom + Dottersacktumor)	adhärent, nullipotent	P. Andrews (Sheffield, England)
NCCIT	Nicht-Seminom (Teratokarzinom)	adhärente Epithelzellen, pluripotent, p53 mutiert	ATCC

Tab. 5: Zellkultur- und Einfriermedien

Zellkulturmedium (invitrogen)	Zusätze (Gibco BRL)	für Zelllinie
DNEM + GlutaMAX-I	10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin	NTERA-2
DNEM/F-12 (1:1)	10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 200 mM	2102EP, NCCIT
Einfriermedium	Kat.-Nr.	Hersteller
Cryo-Safe I	KM-11-V	c c pro

#### 2.1.2 Zytostatika

Tab. 6: Zytostatika

Zytostatikum	Arzneistoffgruppe	Molekulargewicht	Konz.	Lösungsmittel
Cisplatin	Platin-Derivat	300,1 g/mol	3,4 mM	NaCl
Sunitinib	Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor	398,5 g/mol	25 mM	DMSO

### 2.1.3 Antikörper

Tab. 7: Primäre Antikörper

Anti-körper	Klonalität	Wirt	Assay	Konz.	Hersteller	Best.-Nr.
Caspase-3	mAb	Kaninchen	FACS	1:1000	BD	550821
Caspase-3	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling	9682
ERK 1/2	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	Promega	V114A
p-ERK 1/2	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	SantaCruz	so23759-R
GAPDH	mAb	Maus	WB	1:5000	abm	G041
MEK 1/2	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling	9122
p-MEK 1/2	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling	9121
PARP	pAb	Kaninchen	WB	1:1000	Cell Signaling	9542

Tab. 8: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Assay	Konz.	Hersteller	Best.-Nr.
anti-Maus IgG-HRP	WB	1:10000	GE Healthcare	NXA931
anti-Kaninchen IgG-HRP	WB	1:5000	Cell Signaling	7074

### 2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analys (p.a.)“ und wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- *Applichem*
- *Becton Dickenson*
- *Biochrom*
- *BIO-RAD*
- *Calbiochem*
- *Fermentas*
- *Fluka*
- *GE Healthcare*
- *Invitrogen*
- *JT Blaker*
- *Merck*
- *PAA*
- *Pharmacia*
- *Roche*
- *Roth*
- *Sigma-Aldrich*
- *Stratagene*
- *Thermo*

**2.1.5 Geräte, Verbrauchsmittel und Software****Tab. 9: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotkammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD
Brutschrank		Heraeus
Mikroskope	Axiovert 40C, Axiophot 2	Zeiss
Photometer	Wallac 1420 Victor Multi Label Reader	Perkin-Elmer
Röntgenfilmentwickler	HyperProcessor	Amersham
Sicherheitswerkbank	Henasafe	Heraeus
Spannungsquelle	PowerSupplie, EV 261 Power Pac	Consort / BIO-RAD
Wasserdeionisierungsanlage	MilliQ Plus	Millipore
Western-Blot-Elektrophoresegerät	Mini-PROTEAN 3	BIO-RAD
Zellzählgerät	Vi-Cell XR	Beckman-Coulter
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved bright line	Marienfeld Germany

**Tab. 10: Verbrauchsmittel**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting Papier (extra dick)	BIO-RAD
Einwegspritzen	Becton Dickinson
Filterpapier	Schleicher & Schüll
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Petrischalen (80x15 mm)	Sarstedt
Sterilsoritzfilter (0,22µM)	Roth
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Sarstedt

**Tab. 11: Software**

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
PDQuest	8.0.1	BIO-RAD
CellQuest	5.2.1	Becton-Dickinson
CalcuSyn	2.0	BIOSOFT

**2.2 Methoden bei der Behandlung von Zellkulturen****2.2.1 Zellkultur**

Eine kleine Zellflasche wurde mit 4ml des jeweiligen, 37°C warmen Zellmediums vorbereitet. Die Zellaliquots, welche bei -80°C eingefroren waren, wurden zwei Minuten im warmen Wasserbad aufgetaut, bevor sie mit 4ml warmen Zellmedium resuspendiert wurden. Daraufhin wurde fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1ml Medium resuspendiert und in die Zellflasche überführt.

### **2.2.2 Passagieren von adhärent wachsenden Zellen**

Trypsin ist eine Endopeptidase, die selektiv Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein spaltet. Gibt man Trypsin zu adhären Zellen, kommt es bei kurzer Einwirkdauer ohne Zellschädigung zur Spaltung von extrazellulären Proteinen, so dass die Zellen voneinander und von der Zellkulturschale gelöst werden.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Betraf die Konfluenz der Zellen etwa 80-90%, was nach ca. 48 Stunden der Fall war, wurden die Zellen entweder auf eine größere Flasche oder mehrere Flaschen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5ml, 7ml oder 10ml PBS (je nachdem, ob die kleine, mittlere oder große Zellflasche verwendet wurde) gewaschen und die entsprechende Menge an Trypsin zugegeben. Für die kleine Flasche waren dies 500µl, für die mittlere 1ml und für die große Flasche 2ml. Nach dreiminütiger Inkubation und zusätzlichem Schwenken, sowie leichtem „Schlagen“ der Zellflaschen löste Trypsin die Zellen ab. Die Wirkung des Enzyms wurde dann durch die Zugabe von 10ml Medium gestoppt. Diese Zellsuspension wurde bei 1500rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das so entstehende Zellpellet wurde entweder im Verhältnis 1:4 verdünnt und erneut ausgesät oder die vorhandene Zellzahl wurde mittels der Trypanblau-Methode gezählt, um sie für weitere Versuche zu nutzen.

### **2.2.3 Bestimmung der vorhandenen Zellzahl: Trypanblau-Methode und Neubauer-Zählkammer**

Die Trypanblau-Färbung ist ein Vitalitätstest. Der Farbstoff wird lediglich von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt diese dunkelblau, während vitale Zellen farblos bleiben. Da die Substanz bei längerer Einwirkdauer selbst zytotoxisch wirkt, ist es wichtig, die Zellen sofort nach Behandlung zu zählen.

Die gewaschenen Zellen wurden in einer nach der Größe der Zellpellets bemessenen Menge an PBS resuspendiert. 10µl dieser Suspension wurden mit 40µl Trypanblau gemischt, also im Verhältnis 1:5. Davon wiederum wurden 10µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Dies ist eine etwa 30x80mm große und etwa 5mm

dicke Glasplatte mit einer vertieften Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Unter dem Mikroskop wurden 4x4 dieser Quadrate ausgezählt, davon das arithmetische Mittel berechnet und unter Einrechnung der vorherigen Verdünnungen die Anzahl der in PBS gelösten Zellen bestimmt.

### **2.2.4 Bestimmung der IC<sub>50</sub> mittels Zellzählung: Neubauer-Zählkammer und ViCell-Counter**

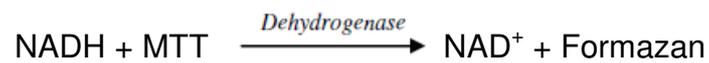
Der ViCell XR Cell Viability Analyzer ist im Prinzip eine automatisierte Neubauer-Zählkammer. Das System nimmt die Probe auf, versetzt sie mit Trypanblau und bestimmt mittels einer Kamera und eines Computers den Anteil vitaler und abgestorbener Zellen.

Um die IC<sub>50</sub> zu bestimmen, wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5cm in 4ml Medium ausgesät. Durchgeführt wurde ein Dreifachansatz à vier Konzentrationen plus Kontrollansatz für drei Tage. Somit wurden 45 Petrischalen im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Sunitinib in aufsteigenden Konzentrationen: Kontrolle (0µM) / 1,25µM / 2,5µM / 5µM / 10µM. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Proben der ersten 15 Petrischalen geerntet. Dazu wurde das Medium der jeweiligen Petrischale abgenommen und mit 6ml PBS gespült. Die Zellen wurden mit 500µl Trypsin gelöst, diese Enzymreaktion wiederum wurde mit 6ml Medium gestoppt. Danach wurde drei Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert.

Um nun die Zellen zu zählen, standen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Eine Zellzählung mittels der in 2.3 erwähnten Neubauer-Zählkammer oder eine Zellzählung mittels des ViCell-Counters. Um die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer zu zählen, wurden von dem in PBS gelösten Zellpellet 10µl mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt. Der ViCell-Counter automatisiert dieses Verfahren. Ein ml der ungefärbten Probe wurde hinein gegeben, dort automatisch gefärbt und maschinell ausgezählt. Nach 48 und nach 72 Stunden erfolgten jeweils Zellzählungen von weiteren 15 Petrischalen mit aufsteigender Sunitinib-Konzentration.

### 2.2.5 Bestimmung der IC<sub>50</sub> mittels MTT

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitätstest und ermöglicht somit die Bestimmung des Anteils vitaler, metabolisch aktiver Zellen einer Probe. Dies geschieht, indem mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen das hydrophile gelbe Substrat MTT ((3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) zu hydrophobem, violetterem Formazan reduzieren:



Da diese Enzyme ausschließlich in lebenden Zellen aktiv sind, steht die Menge des Formazans in Korrelation zur Vitalität der Zellen. Sinkt die Zahl der vitalen Zellen, wird dementsprechend weniger MTT umgewandelt, was an einer veränderten Absorption gemessen werden kann.

Für den Zytotoxizitätstest wurden 96-Well Mikrotiterplatten verwendet. Pro Well wurden mithilfe einer Mehrkanalpipette  $6 \times 10^3$  Zellen in 150  $\mu\text{l}$  Medium pipettiert. Ausgesät wurde für eine 7-stufige Konzentrationsreihe plus Kontrolle. Pro Konzentrationsstufe wurden 6 Ansätze eingeplant. Nachdem die Zellen pipettiert worden waren, wurden sie 24 Stunden bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% gelagert. Anschließend wurde eine Konzentrationsreihe von Sunitinib über 0,4  $\mu\text{M}$  / 0,8  $\mu\text{M}$  / 1,6  $\mu\text{M}$  / 3,2  $\mu\text{M}$  / 6,4  $\mu\text{M}$  / 12,8  $\mu\text{M}$  / 25,6  $\mu\text{M}$  angefertigt. 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Lösung wurden in die einzelnen Wells gegeben, so dass ein Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  in den Wells vorhanden war. Als Kontrolle wurden 50  $\mu\text{M}$  Medium plus die Lösungsmittelkonzentration (DMSO) der höchsten Konzentrationsstufe gemessen. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die MTT-Lösung angesetzt, indem 500mg MTT in 10ml PBS gelöst wurden. Daraufhin wurde filtriert und die Lösung 10-fach verdünnt, um eine Konzentration von 0,5 mg/ml zu erhalten. Das Medium wurde nun vorsichtig von den Wells abgesaugt und jeweils 200  $\mu\text{l}$  der MTT-Lösung zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für etwa drei Stunden bei 37°C inkubiert. Zwischendurch wurde mehrmals unter dem Mikroskop geprüft, wie weit die Formazankristallbildung fortgeschritten war. Sobald eine deutliche Kristallbildung des Formazans zu erkennen war, wurde die MTT-Lösung abgesaugt und die Kristalle in 100  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst. Anschließend wurde die Absorption des Formazans photometrisch bei 570nm gemessen. Die Auswertung folgte mit der CalcuSyn-Software (Biosoft).

### 2.2.6 Bestimmung des Einflusses der Zellkonfluenz auf die IC<sub>50</sub>

Um den Einfluss der Zellkonfluenz auf die IC<sub>50</sub> zu untersuchen, wurden jeweils unterschiedliche Zellzahlen der Zelllinie NT2 in Petrischalen kultiviert. In einem Dreifachansatz über drei Tage wurden diese mit verschiedenen Sunitinib Konzentrationen von 2,5µM / 5 µM / 10µM / 20µM behandelt und zusätzlich eine Kontrolle angefertigt. Im ersten Ansatz wurde jeweils eine Zellzahl von 1x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät, im zweiten 0,5x10<sup>6</sup> Zellen und im dritten 1x10<sup>6</sup> Zellen. Verwendet wurden 5,5x5,5cm große Petrischalen. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils geerntet und in der Neubauer Zählkammer bzw. dem ViCell-Counter gezählt.

Um den Einfluss der Zellkonfluenz zu überprüfen, wurden zudem weitere MTT-Versuche durchgeführt. So wurden in einem Ansatz 2000 Zellen ausgesät und in einem weiteren die doppelte Zellzahl mit 4000 Zellen. Hier wurde eine achtstufige Konzentrationsreihe mit den Konzentrationen 0,06µM / 0,12µM / 0,24µM / 0,48µM / 0,96µM / 1,92µM / 3,84µM / 7,68µM plus Kontrolle verwendet. Jede Konzentration wurde sechsfach angesetzt, anschließend wurde wie in 2.2.5 vorgegangen.

Der Platz, der den Zellen zur Verfügung stand, wurde mittels der Formel zur Berechnung einer Kreisfläche ( $A=r^2 \times \pi$ ) berechnet. Der Durchmesser der Wells, in denen die Zellen ausgesät wurden, betrug 0,7cm, die Fläche 0,385cm<sup>2</sup>. Diese Fläche wurde nun durch die Anzahl der jeweiligen Zellen dividiert, die in den Versuchen ausgesät worden waren, also 2000, 4000 und 6000. Da die Zellen in verschieden großen Wells bzw. Petrischalen in unterschiedlicher Anzahl ausgesät wurden, stand je nach Versuchsreihe unterschiedlich viel Platz zur Verfügung.

### 2.2.7 Kombinationsversuche mit Sunitinib und Cisplatin

Um den Effekt einer Kombination des bei KZT eingesetzten Standardmedikaments Cisplatin mit Sunitinib zu untersuchen, wurden Kombinationsversuche durchgeführt. Verwendet wurden die IC<sub>10</sub>-, IC<sub>25</sub>- und IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von Sunitinib für die jeweiligen Zelllinien. Zusätzlich zu einer Monotherapie mit Sunitinib wurden die Zellen einer Kombinationsbehandlung mit den IC<sub>10</sub>-, IC<sub>25</sub>- und IC<sub>50</sub>- Werten von Cisplatin (welche von der Arbeitsgruppe zu einem früheren Zeitpunkt bestimmt worden waren) unterzogen. Es wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen pro Petrischale ausgesät, 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und danach mit den Medikamenten behandelt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, wie oben beschrieben präpariert und im ViCell-Counter gezählt. Die Ergebnisse der Behandlung der

Monotherapie wurden mit denen der Kombinationstherapie verglichen und mit dem Student T-Test auf Signifikanz geprüft.

### **2.2.8 Kryokonservierung von Zelllinien**

Nachdem die Zelllinien bis zu zehn Mal passagiert worden waren, wurden sie wieder eingefroren. Dazu wurde das Einfriermedium Cryo-Safe 1 sowie der Einfrierbehälter „Cryo 1 C Freezing Container“ genutzt. Eine Anzahl von bis zu  $3 \times 10^6$  Zellen wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden eingefroren. Danach erfolgte die Konservierung auf flüssigem Stickstoff.

### **2.3 Proteinchemische Methode: Western Blot**

Beim Western Blot Verfahren werden Proteine in einem elektrischen Feld elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen (geblottet). Anschließend können mit verschiedenen Methoden Proteine identifiziert bzw. qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Dies ist möglich, da die Proteine beim Transfer sowohl ihre Immunreaktivität als auch ihre funktionale Aktivität behalten und so für Antikörper, Enzymsubstrate und andere Liganden zugänglich sind. Als Immunblotting bezeichnet man ein Verfahren, bei dem die transferierten Proteine in weiteren Schritten mit entsprechenden Antikörpern reagieren. Wenn diese primären Antikörper direkt mit Substanzen gekoppelt sind, die Nachweisbarkeit erzeugen – etwa Enzymen, die Substrat umsetzen können oder lumineszierenden Faktoren – wird dies als direkter Nachweis bezeichnet. Wird der primäre von einem sekundären Antikörper gebunden, der mit einem Marker gekoppelt ist, ist dies ein indirekter Nachweis.

#### **2.3.1 Präparation und Lyse der Zellen**

Die Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben geerntet, trypsinisiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet zwei Mal mit  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

Daraufhin wurden die Zellen mit einem RIPA-Puffer lysiert, um die Proteine aus den Zellen isolieren zu können. Der RIPA-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

### RIPA-Puffer:

- 150mM NaCl
- 50mM Tris-HCl pH 7,6
- 1% Nonidet P-40 (v/v)
- 0,25% Na-Desoxycholat (10%) (w/v)
- 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
- 1mM Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)
- 10 ml Complete-Proteaseinhibitoren (Aprotinin/Leupeptin)

Anschließend wurde das Proteinlysate für 15 Minuten bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Anteile wie größere Membranteile oder nukleäre Bestandteile abzutrennen. Das klare Lysat, das nur noch zytosolische und membranäre Zellproteine enthielt, wurde in ein frisches Eppendorfer-Gefäß überführt. Die Zellysate wurden ständig auf Eis gehalten, um Proteine vor Proteinolyse sowie Proteinkomplexe vor Dissoziation zu schützen. Lysat, das nicht gleich verwendet wurde, wurde bei -80°C tiefgefroren. Um phosphorylierte Proteine detektieren zu können, wurden die Proteinlysate mit einem speziellen Lysepuffer nach Herstellerprotokoll (Cell Lysis Buffer 10x, #9803, Cell Signaling, Danvers, USA) angefertigt.

### 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Er beruht auf der im sauren Milieu stattfindenden Proteinfärbung durch den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant Blau G-250. Dieser Farbstoff liegt im ungebundenen Zustand in roter Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 470nm vor. Da Coomassie Blau mehrere aromatische Ringe mit elektronenliefernden Substituenten trägt, lagert es sich in saurer Lösung bei einem pH von etwa 0 bis 1 an die kationischen, basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Durch diese Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen, anionischen Form stabilisiert und färbt somit auch die Proteine blau. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595nm. Die bei 595nm zunehmende Absorption ist also ein Maß für die Konzentration der Proteinlösung. Das Maß der Farbreaktion ist vom Protein abhängig, weshalb eine Kalibrierung notwendig ist, um die Konzentrationsbestimmung eines bestimmten Proteins zu ermöglichen. Diese wird mit einem Standard-Protein wie BSA durchgeführt.

Zunächst wurde die Lösung zur Herstellung einer Eichgeraden pipettiert. Hierfür wurde Lösung A, die aus 100µl BSA-Stammlösung und 900µl Lysepuffer bestand,

mit Lösung B, die sich aus 100µl H<sub>2</sub>O und 900µl Lysepuffer zusammensetzte, miteinander in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Das Endvolumen stellten jeweils 100µl dar. Zunächst wurden lediglich 100µl von Lösung A verwendet. In weiteren Schritten nahm die Menge von Lösung A jeweils um 20µl ab und wurde durch eine entsprechende Menge an Lösung B ersetzt. Im nächsten Schritt wurden 30µl von jeder dieser Mischungen mit 30µl 0,1M HCl und 240µl H<sub>2</sub>O gemischt. Davon wiederum wurden jeweils 25µl entnommen und 975µl Bradford-Lösung zugegeben. Danach inkubierten die Substanzen fünf Minuten bei Raumtemperatur und wurden anschließend im Photometer gemessen, wodurch die Eichgerade dargestellt wurde. Ähnlich wurde mit den zu messenden Proben verfahren. Diese wurden ebenfalls mit 30µl 0,1M HCl und 240µl H<sub>2</sub>O gemischt. Anschließend wurden 25µl der jeweiligen Mischung mit 875µl Bradford-Lösung vermengt und nach fünfminütiger Inkubation bei 595nm im Photometer gemessen.

### 2.3.3 Gießen der Gele

Zunächst wurden die Glasplatten zum Gießen der Gele mit eingelegten Abstandshaltern aneinandergelagert und mittels der dafür vorgesehenen Halterungen fixiert. Nun wurde 15-prozentiges Trenngel (Zusammensetzung siehe unten) hergestellt und zwischen die Glasplatten gegossen. Danach wurde dieses mit 1ml Isoprop überschichtet, um entstandene Luftblasen zu entfernen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde Isoprop entfernt, mit destilliertem H<sub>2</sub>O abgespült und die Platten abgetrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel (Zusammensetzung siehe unten) über das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm, der die Taschen für das zuzugebende Protein produziert, eingesteckt.

#### Trenngel 15% (für ein Gel):

- 2,35ml H<sub>2</sub>O
- 5ml Acrylamid (30%)
- 2,5ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8)
- 50 µl SDS (20%)
- 50 µl APS (10%)
- 10 µl Temed

#### Sammelgel 4% (für ein Gel):

- 6,1ml H<sub>2</sub>O
- 1,33ml Acrylamid (30%)
- 2,5ml Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)
- 50 µl SDS (20%)
- 50 µl APS (10%)
- 10 µl Temed

### 2.3.4 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Die errechnete Menge der Proben wurde mit der entsprechend errechneten Menge an Puffer kombiniert. Anschließend wurden die Proben denaturiert, indem sie für fünf Minuten bei 99°C aufgekocht wurden. Danach wurden sie erneut kurz zentrifugiert.

Nun wurden die Proben in das Gel pipettiert, wobei an erster Stelle 7µl des Rainbow-Markers aufgetragen wurden. Anschließend wurde die Blotkammer mit SDS aufgefüllt und Spannung angelegt. Zunächst wurde für 20 Minuten eine Spannung von 65V, Stromstärke von 900mA und elektrische Leistung von 20W angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 95V erhöht und unter Beobachtung ca. 1,5 bis 2 Stunden abgewartet, bis die Markerbande etwa das untere Drittel des Gels erreicht hatte.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Membran geblottet. Dazu wurde zunächst eine Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten (5,5x8,2cm) und 15 Sekunden in Methanol getaucht, um diese zu aktivieren. Anschließend wurde die Membran zwei Minuten in destilliertem H<sub>2</sub>O und fünf Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Ebenso wurde das Whatman-Papier in der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Das Trenngel wurde entfernt und ebenfalls in den Transferpuffer überführt. Danach wurde alles in die Transferkassette übertragen. Auf die untere Schicht Whatman-Papier folgten die Membranen, dann das Gel und darüber eine weitere Schicht Whatman-Papier. Die Kassette wurde nun in die mit Puffer gefüllte Transferkammer gelegt. An diese wurde für 25 Minuten eine Spannung von 20V bei einer Stärke von 900mA und einer elektrischen Leistung von 65W angelegt. Anschließend wurden die Gele in Coomassie-Blau auf den Schüttler gelegt, die Membranen erneut 15 Sekunden in Methanol getaucht, trocknen gelassen und zum Blocken für mindestens 1,5 Stunden in 5% BSA gelegt. Dadurch sollten die Stellen der Membran, an die keine Zellproteine gebunden hatten, mit inertem Protein gefüllt werden. Die BSA-Lösung wurde daraufhin dreimal mit TBST-Puffer abgespült.

### **2.3.5 Antikörper-Inkubation und Proteindetektion**

Nun wurden die Membranen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5cm gelegt und 10ml der primären Antikörper-Lösung zugegeben. Bei 4°C wurden die Membranen über Nacht auf dem Schüttler inkubiert, bevor die Antikörper-Lösung wieder entfernt wurde. Dann wurden sie wiederum drei Mal à zehn Minuten mit PBST gewaschen. Nun wurde der jeweils spezifische sekundäre Antikörper, z.B. Anti-Kaninchen Ig G im Verhältnis von 1:5000 mit TBST verdünnt und jeweils 10ml in jede Petrischale zugegeben. Dieser inkubierte eine Stunde bei Raumtemperatur und wurde danach drei Mal à 10 Minuten mit PBST abgewaschen. Daraufhin folgte die Zugabe der Detection-Lösung. Diese besteht aus einem Gemisch zweier

vorgefertigter Lösungen, das eine Minute auf die Membran gegeben wurde. Die Membran wurde nun in einer lichtdichten Röntgen-Kassette in einen Dunkelraum gebracht, ein Röntgenfilm wurde aufgelegt und dieser je nach Signalstärke zwei bis 30 Sekunden belichtet.

Die Detektion der Proteine beruht auf Chemolumineszenz. Dabei wird durch die an die sekundären Antikörper gebundene Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) die Oxidation eines Diacylhydrazids katalysiert. Bei dieser Reaktion entstehen Stickstoff und Licht, das wiederum Schwärzungen auf dem aufgelegten Film auslöst. Die dort sichtbaren schwarzen Banden entsprechen also den Antikörperbindestellen.

Die Markerposition der Membran wurde mit Stift auf den Film übertragen. Daraufhin wurden die Membranen zehn Minuten mit PBS gewaschen, ehe die Ladungskontrolle mit dem Antikörper gegen GAPDH, einem Housekeeping-Protein, durchgeführt wurde. Dieser wurde im Verhältnis 1:5000 mit PBST verdünnt. Jeweils 10ml dieser Antikörperlösung wurden auf die jeweilige Membran gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut drei Mal à zehn Minuten mit PBST gewaschen, ehe der sekundäre Anti-GAPDH-AK (Anti-Maus AK) in einer Verdünnung 1:10000 (jeweils 10ml) zugegeben wurde. Dieser wurde nach einstündiger Inkubation wiederum mehrmals abgewaschen. Danach wurden 12ml der Detection-Lösung zugegeben und unter kurzer Belichtung ein weiterer Röntgenfilm entwickelt.

### **2.4 Molekularbiologische Methode: Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, ist ein Messverfahren, mit dem die Eigenschaften einzelner Zellen gemessen werden. Die Zellen werden in eine Kapillare eingesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Das Licht wird dabei unterschiedlich gestreut und von Detektoren nachgewiesen. So erhält man einerseits anhand des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter) Information über das Volumen der Zelle. Das seitwärts gestreute Licht (Sideward Scatter) gibt andererseits Aufschluss über die Granularität der Zelle.

#### **2.4.1 Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid**

Der Zellzyklus lässt sich in fünf verschiedene Phasen unterteilen (vgl. Abb. 10). Die **G1**-(Gap-)Phase stellt die postmitotische diploide Ruhephase dar, in der es zur kontinuierlichen Erhöhung zellspezifischer Protein- und RNA-Synthese kommt. Daraufhin folgt die **S**-(Synthese-)Phase, in der die DNA verdoppelt wird. Ist diese

beendet, schließt sich die **G2**-Phase an, in welcher eventuell bei der DNA-Duplikation aufgetretene Fehler korrigiert werden und weitere Proteine synthetisiert werden. Nun folgt die **M**-(Mitose-)Phase in der sich die Zelle mit dem vorhandenen tetraploiden Chromosomensatz teilt und zwei diploide Tochterzellen entstehen. Ist die Teilung abgeschlossen, treten Zellen proliferierender Gewebe in eine weitere G1-Phase ein um sich erneut zu teilen. Differenzieren Zellen, treten sie in die **G0**-Phase ein, in der sie proliferativ inaktiv sind. Ein Wiedereintreten in den Zellzyklus ist dann nur durch einen spezifischen Reiz möglich.

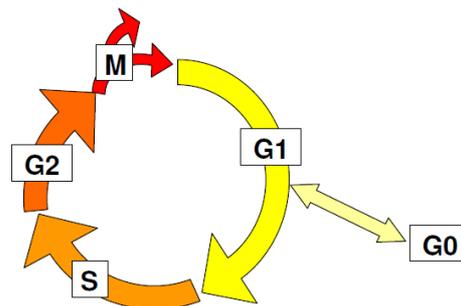


Abb. 10: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich auch Fluoreszenzfarben nachweisen. So besteht etwa die Möglichkeit, den DNA-Gehalt einer Zelle anhand des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid (PI) zu messen. Diese Substanz interkaliert mit der DNA, sie lagert sich also zwischen die Basen. Passieren die Zellen nun den Laserstrahl, wird PI zur Lichtemission angeregt und emittiert Lichtimpulse bei 650nm, welche von Photozellen detektiert werden können. Zwischen der Intensität der Fluoreszenz und dem DNA-Gehalt besteht ein linearer Zusammenhang. Anhand der detektierten Signale ist es nun möglich, die Zellen den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen:

- G0/1:  $1n$  = diploider Chromosomensatz
- S:  $1 \text{ bis } 2n$  = zwischen di- und tetraploidem Chromosomensatz.
- G2:  $2n$  = tetraploider Chromosomensatz

Außerdem kann man in der Zellzyklusanalyse einen Sub-G0/1-Peak nachweisen (vgl. Abb. 11). Dieser entspricht den Zellen, die sich in der Apoptose befinden und es bereits zur DNA-Fragmentierung gekommen ist. Ihr DNA-Gehalt ist somit bereits geringer als der der diploiden Zellen (G0/G1-Phase). Um Messfehler auszuschließen,

muss die zu messende Zellprobe zu Beginn mit RNase behandelt werden, da PI ebenfalls an doppelsträngige RNA bindet.

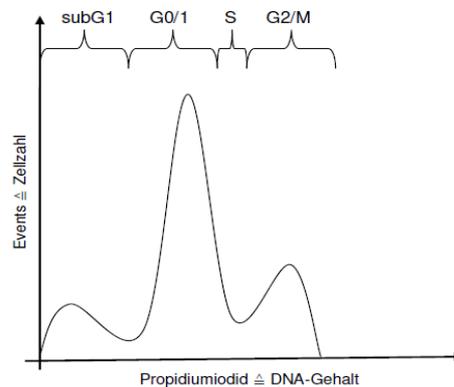


Abb. 11: Schematische Darstellung der Zellzyklus-Messung behandelter Zellen anhand FACS und PI

Gemessen wurden sowohl die unbehandelten Kontrollzellen als auch die mit Sunitinib behandelten Zellen aller Zelllinien. Zu den Zellproben wurden in aufsteigender Konzentration 1,25 $\mu$ M / 2,5 $\mu$ M / 5 $\mu$ M / 10 $\mu$ M und 20 $\mu$ M Sunitinib zugegeben und 48 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden alle Zelllinien mit ihrer jeweiligen IC<sub>50</sub> über 48 Stunden behandelt und diese Zellen geerntet. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellproben in eiskaltem, 100-prozentigem Ethanol fixiert und bei -20°C tiefgefroren. Die jeweils zu messenden Proben wurden resuspendiert und fünf Minuten bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 500 $\mu$ l PBS zugegeben, erneut resuspendiert und wiederum fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und 200 $\mu$ l der PI-Lösung zugegeben. Diese setzte sich wie folgt zusammen:

**PI-Lösung:**

- 40 $\mu$ l der Stocklösung PI (5mg/ml)
- 100 $\mu$ l der RNase (10mg/ml)
- gelöst in 10ml PBS

Die angesetzte PI-Lösung sowie die mit PI versehenen Proben standen durchgehend auf Eis und im Dunkeln, indem sie mit Alufolie abgedeckt waren. Die Zellen inkubierten daraufhin ca. 30 Minuten auf Eis, ehe pro Probe 200 $\mu$ l PBS zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellproben von den Eppendorfer Gefäßen in die speziellen FACS-Röhrchen gefüllt und diese im Gerät FACSCalibur gemessen.

### 2.4.2 Untersuchung einer Caspase-3-Aktivierung

Caspasen sind Proteasen, die Peptidbindungen C-terminal vom Aspartat spalten (cysteinyl-aspartate-specific-protease) und zudem die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Man unterscheidet Initiatorcaspasen wie Caspase 8 und 9, die den Zelltod initiieren, von Effektorcaspasen. Letztere sind an den weiteren Schritten der Apoptose beteiligt und werden durch die Initiatorcaspasen aktiviert. Eine bedeutende Effektorcaspase ist Caspase-3, die im inaktiven Zustand als Proenzym (32kDa) vorliegt. Aktiviert wird sie, indem sie in ein aktives Heterodimer gespalten wird (12 und 17kDa).

Aktivierte Caspase-3 zeigt, dass in einer Zelle die Apoptose eingeleitet wurde. Dieser Nachweis kann mittels Durchflusszytometrie geführt werden. Dazu wurde ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase-3 eingesetzt. Auf diese Weise wurden alle Zelllinien untersucht: Sowohl die unbehandelten Kontrollzellen als auch die mit einer Konzentrationsreihe von 1,25µM / 2,5µM / 5µM / 10µM und 20µM an Sunitinib behandelten Zellen.

Zunächst wurden die trypsinisierten und gewaschenen Zellen in 300µl zweiprozentigem Paraformaldehyd bei einem pH von 7,4 und 37°C für zehn Minuten fixiert. Dann wurden die Proben eine Minute auf Eis gestellt, um sie abzukühlen. Anschließend wurde bei 1500rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand abgesaugt. Um die Zellmembran für die spätere Antikörperzugabe permeabel zu machen, wurden die Zellen in 90-prozentigem Methanol in PBS resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut für fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert und die Permeabilisierungslösung abgesaugt. Die Zellpellets wurden in 300µl 0,5-prozentigem BSA in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und die Waschlösung abgesaugt. In 50µl der so hergestellten Lösung erfolgte nun eine zehnminütige Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur. Danach wurde 1µl des Caspase-3-Antikörpers (IgG-AK) für eine Stunde zugegeben. Während dieser Zeit standen die mit dem Antikörper inkubierten Proben im Dunklen. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen. Zu jeder Probe wurden 300µl PBS zugegeben und die Proben für die Durchflusszytometrie in die FACS-Röhrchen überführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Bestimmung der IC<sub>50</sub>

##### 3.1.1 Bestimmung der IC<sub>50</sub> mittels MTT

Die Bestimmung der IC<sub>50</sub> wurde mittels Zellzählung und MTT durchgeführt. Zunächst erfolgte die Messung anhand der MTT-Methode. Hierzu wurden 96-Well-Platten verwendet und pro Well 6000 Zellen ausgesät. Diese wurden nach 24 Stunden Inkubation mit einer aufsteigenden Sunitinib-Konzentrationsreihe von 0,2 bis 25,6µM behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Nach Behandlung der Zellproben wie in 2.2.5 beschrieben, erfolgte die photometrische Messung. Sowohl die „dose-effect curve“, der „median-effect plot“, als auch die endgültigen IC<sub>50</sub>-Ergebnisse wurden mit der CalcuSyn 2.0 Software von Biosoft errechnet. Der Messung der Cisplatin-sensitiven Variante einer Zelllinie folgte die Messung der Cisplatin-resistenten Tochterlinie.

Auf den nachfolgenden Abbildungen ist rechts die Dosis-Effekt-Kurve zu sehen, welche auf verschiedenen Absorptionswerten beruht - je nachdem, wie viel des Substrats MTT umgewandelt wurde. Diese wurde anhand einer Gleichung A ( $F_a/F_u = (D/D_m)^m$  oder  $\log(F_a/F_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$ , Topaly 2001) linearisiert. Der Median-Effect-Plot basiert auf einer Logarithmierung dieser Gleichung und sollte eine gerade Linie zeigen. Ist dies der Fall, wird bestätigt, dass die Beziehung zwischen Dosis und Effekt den Gesetzen der Massenwirkung folgt. Dieser lineare Korrelationskoeffizient wurde für alle Kurven generiert, um die Verwendbarkeit der Daten zu überprüfen. Somit ist er als Kontrolle für die Verlässlichkeit der Messungen anzusehen.

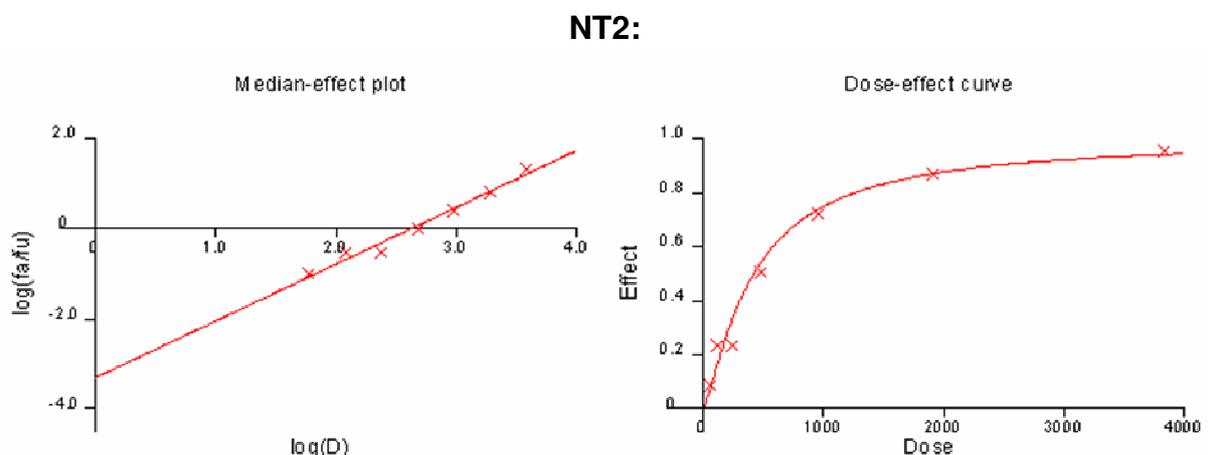


Abb. 12: MTT-Messung zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung der Zelllinie NT2; Ergebnis siehe Tab. 12

**NT2-R:**

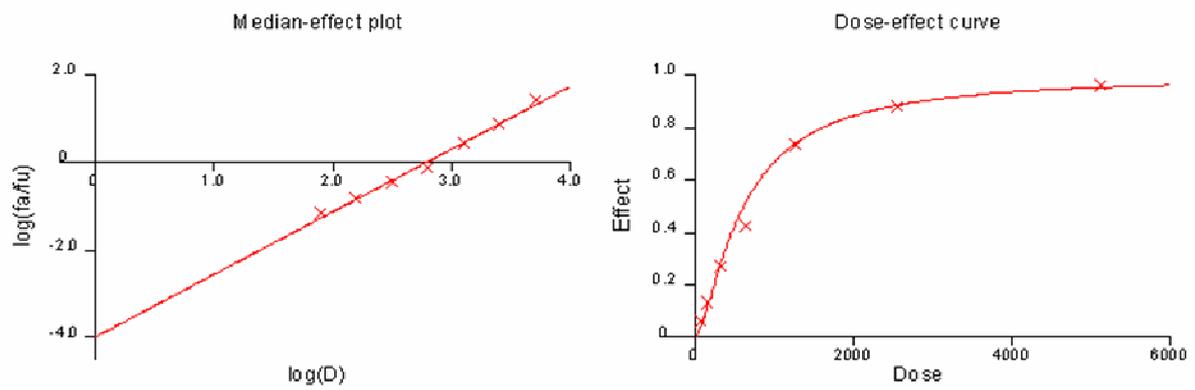


Abb. 13: MTT-Messung zur  $IC_{50}$ -Bestimmung der Zelllinie NT2-R; Ergebnis siehe Tab. 12

**2102EP:**

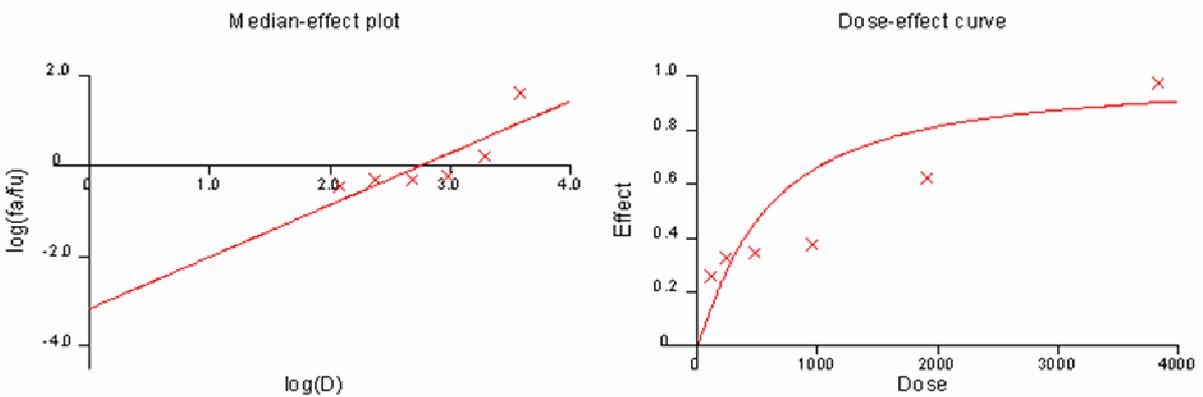


Abb. 14: MTT-Messung zur  $IC_{50}$ -Bestimmung der Zelllinie 2102EP; Ergebnis siehe Tab. 12

**2102EP-R:**

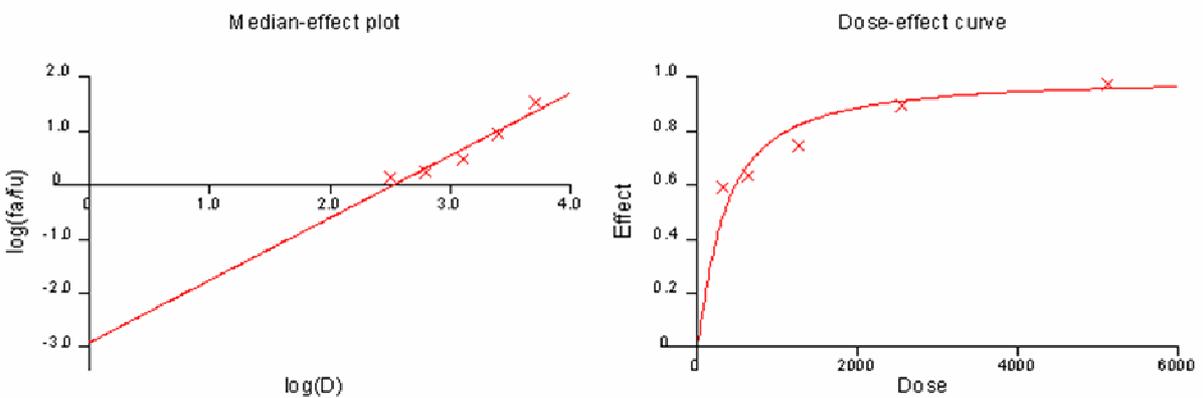


Abb. 15: MTT-Messung zur  $IC_{50}$ -Bestimmung der Zelllinie 2102EP-R; Ergebnis siehe Tab. 12

**NCCIT:**

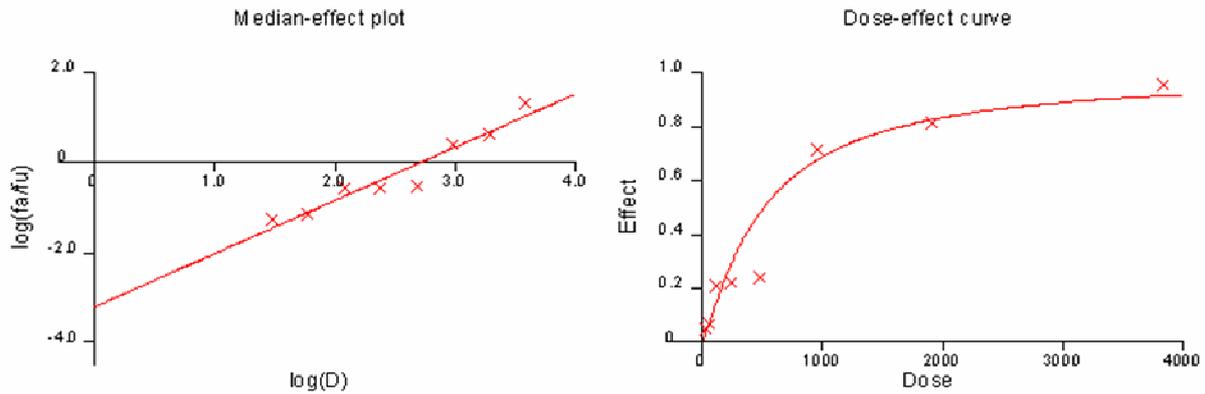


Abb. 16: MTT-Messung zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung der Zelllinie NCCIT; Ergebnis siehe Tab. 12

**NCCIT-R:**

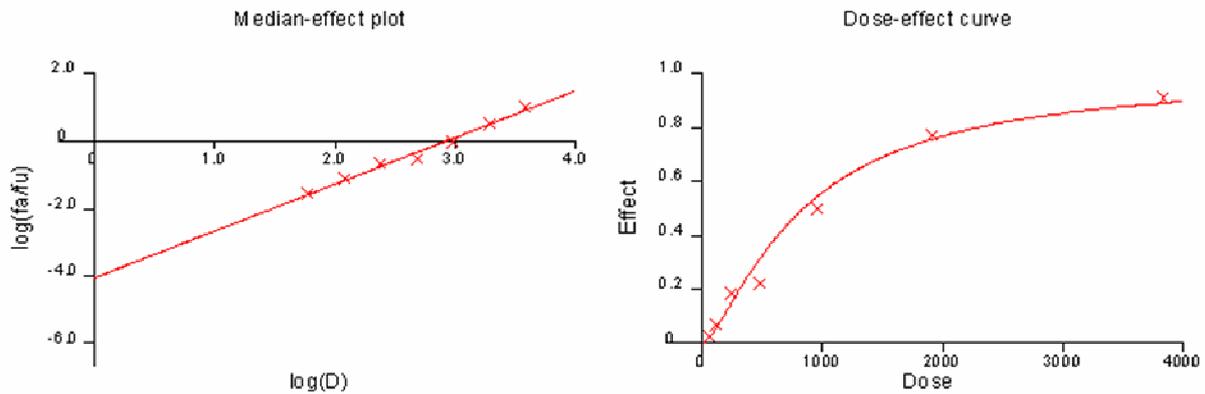


Abb. 17: MTT-Messung zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung der Zelllinie NCCIT-R; Ergebnis siehe Tab.12

Zusammenfassend lauteten die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen aller Zelllinien wie folgt:

**Tab.12: IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen KZT-Linien (ermittelt anhand von MTT)**

Zelllinie	IC <sub>50</sub> -Konz.
NT2	3,8µM (SD: +/- 0,1)
NT2-R	3,5µM (SD: +/- 0,1)
2102EP	3,0µM (SD: +/- 0,1)
2101EP-R	3,3µM (SD: +/- 0,4)
NCCIT	3,7µM (SD: +/- 0,2)
NCCIT-R	3,4µM (SD: +/- 0,6)

Die Ergebnisse aller Zelllinien lagen also in einem ähnlichen Dosisbereich, zwischen 3,0 und 3,8µM. Es war nicht zu erkennen, dass die Cisplatin-resistenten Zelllinien eine höhere IC<sub>50</sub>-Dosis als die Cisplatin-sensitiven Linien aufwiesen oder nicht auf die Behandlung mit Sunitinib ansprachen. Eine Kreuzresistenz der Cisplatin-

resistenten Zellen auf Sunitib konnte somit ausgeschlossen werden. Auch zwischen den verschiedenen drei KZT-Linien konnte kein deutlich verändertes Ansprechen auf Sunitinib nachgewiesen werden, alle sprachen ähnlich auf das Medikament an.

### 3.1.2 Bestimmung der $IC_{50}$ durch Zellzählung mittels ViCell-Counter

Des Weiteren wurde die  $IC_{50}$  durch direkte Zellzählung mithilfe der Trypanblau-Methode und des ViCell-Counters bestimmt. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5cm ausgesät, 24 Stunden inkubiert und mit einer Sunitinib-Konzentrationsreihe von 0 (Kontrolle) bis  $10 \mu\text{M}$  behandelt (siehe Punkt 2.2.4). Nach einer Inkubation des Medikaments wurden die Zellproben nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, wie in Punkt 2.2.4 beschrieben, geerntet und im ViCell-Counter gezählt. Der Zählung der Cisplatin-sensitiven Variante der jeweiligen Zelllinien folgte die Analyse der Cisplatin-resistenten Tochterlinien der gleichen Linie. Die Ergebnisse sind in den folgenden Grafiken (Abb. 18 – 23) dargestellt.

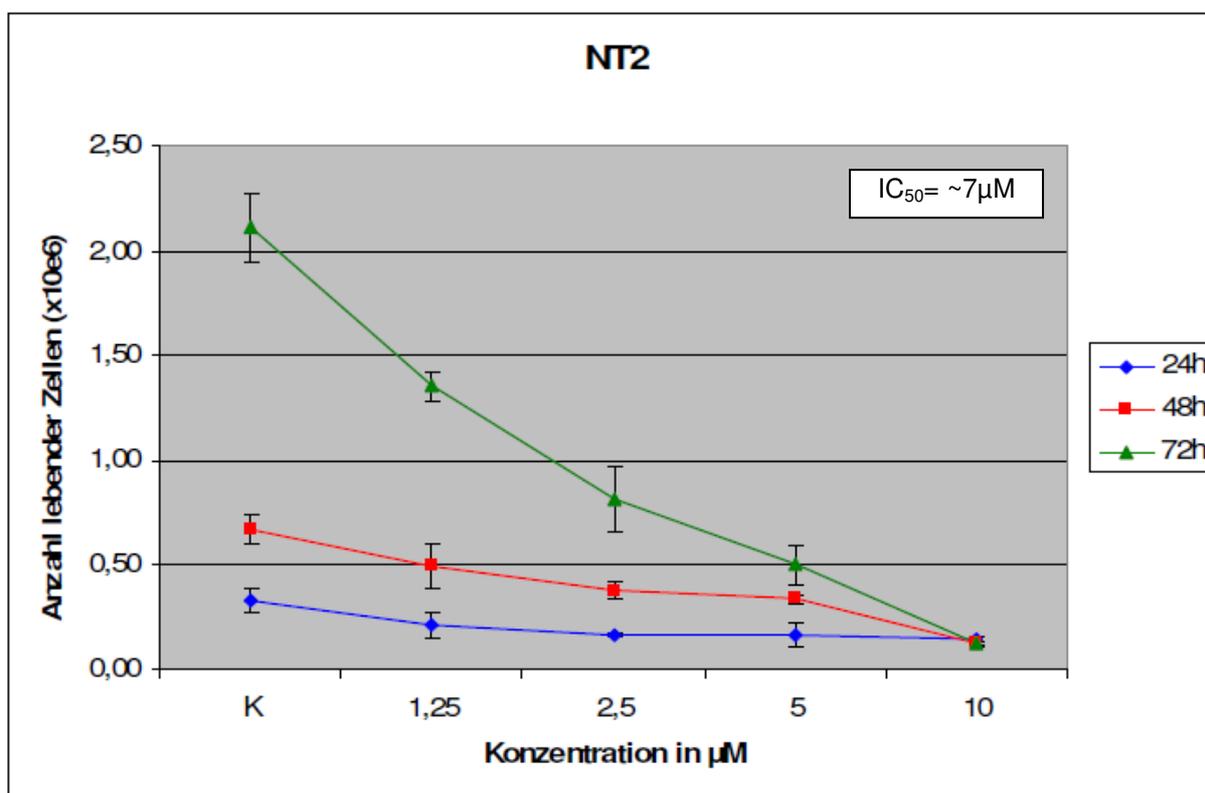


Abb. 18: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie NT2 zur Ermittlung der  $IC_{50}$

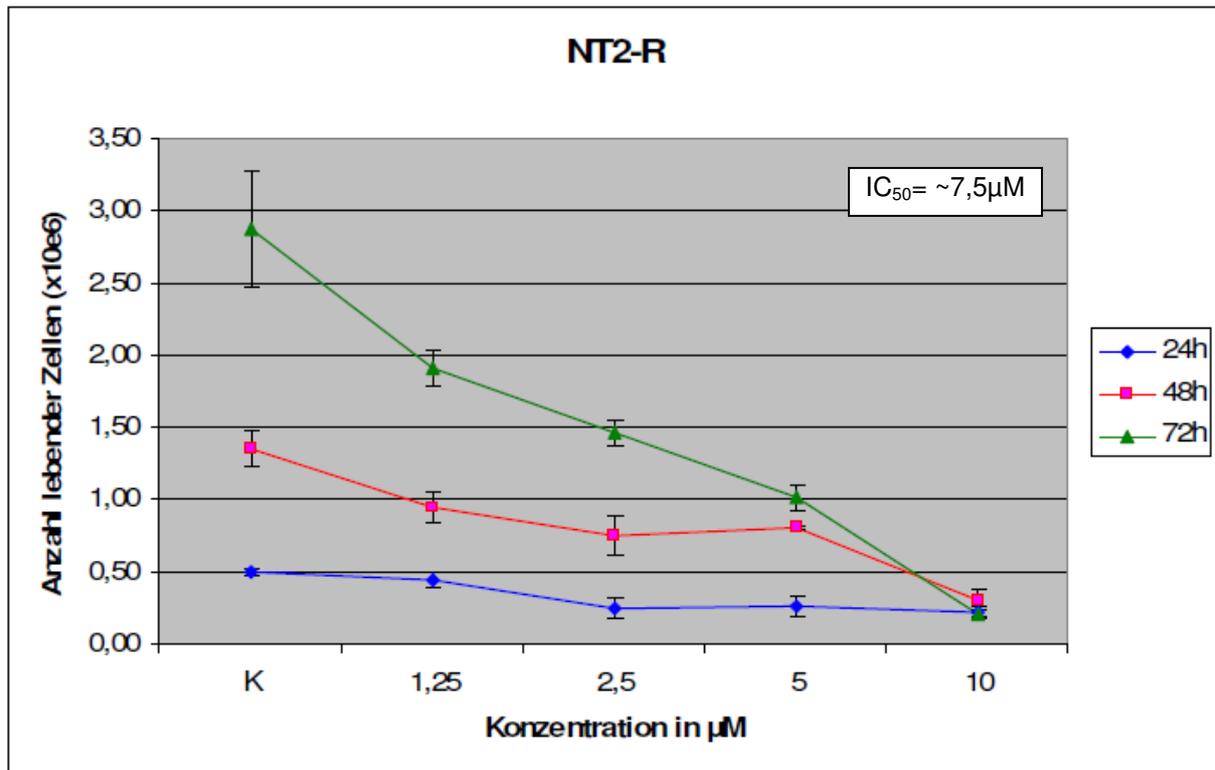


Abb. 19: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie NT2-R zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>

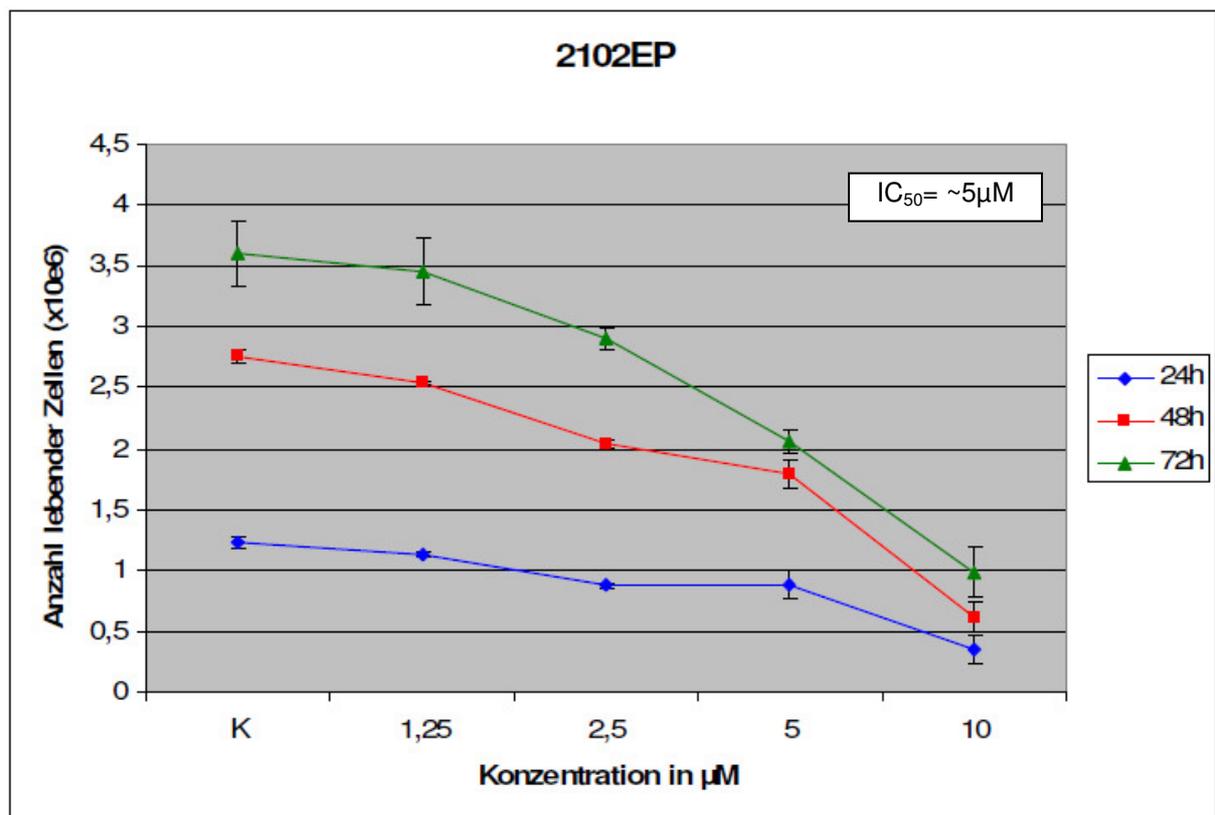


Abb. 20: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie 2102EP zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>

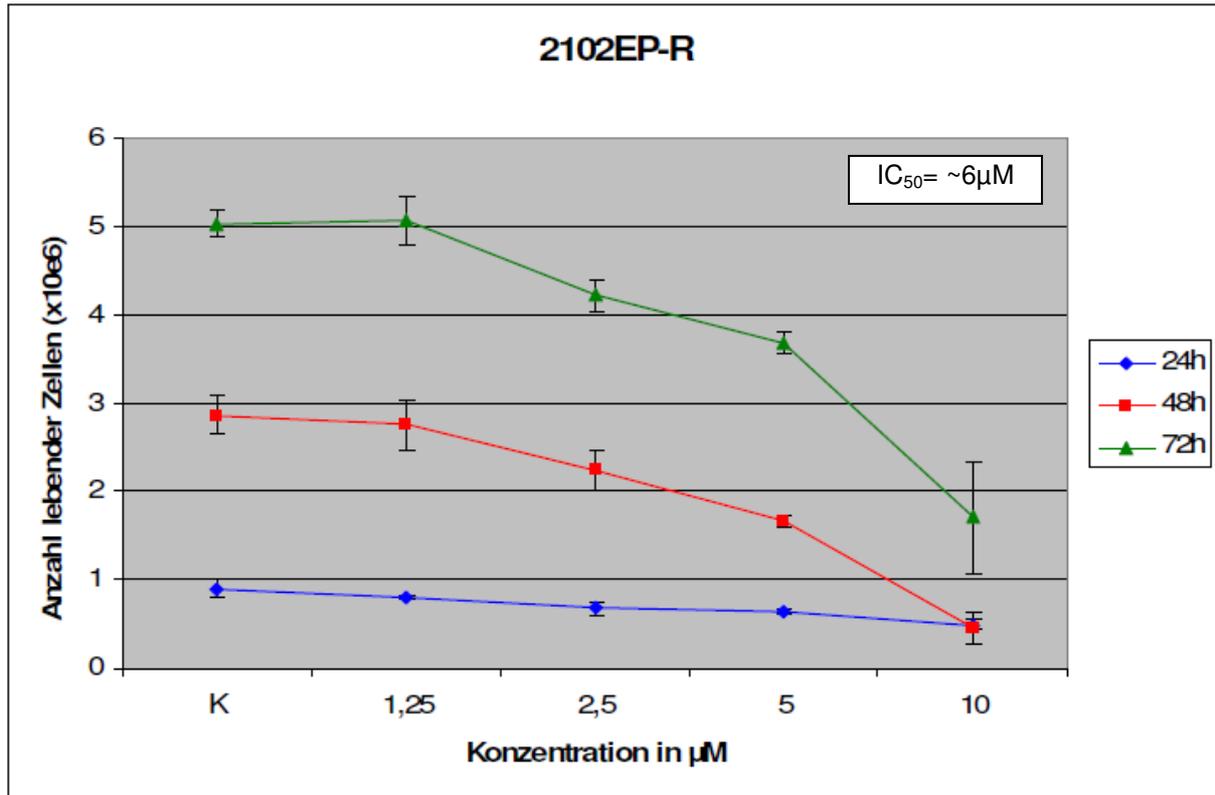


Abb. 21: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie 2102EP-R zur Ermittlung der  $IC_{50}$

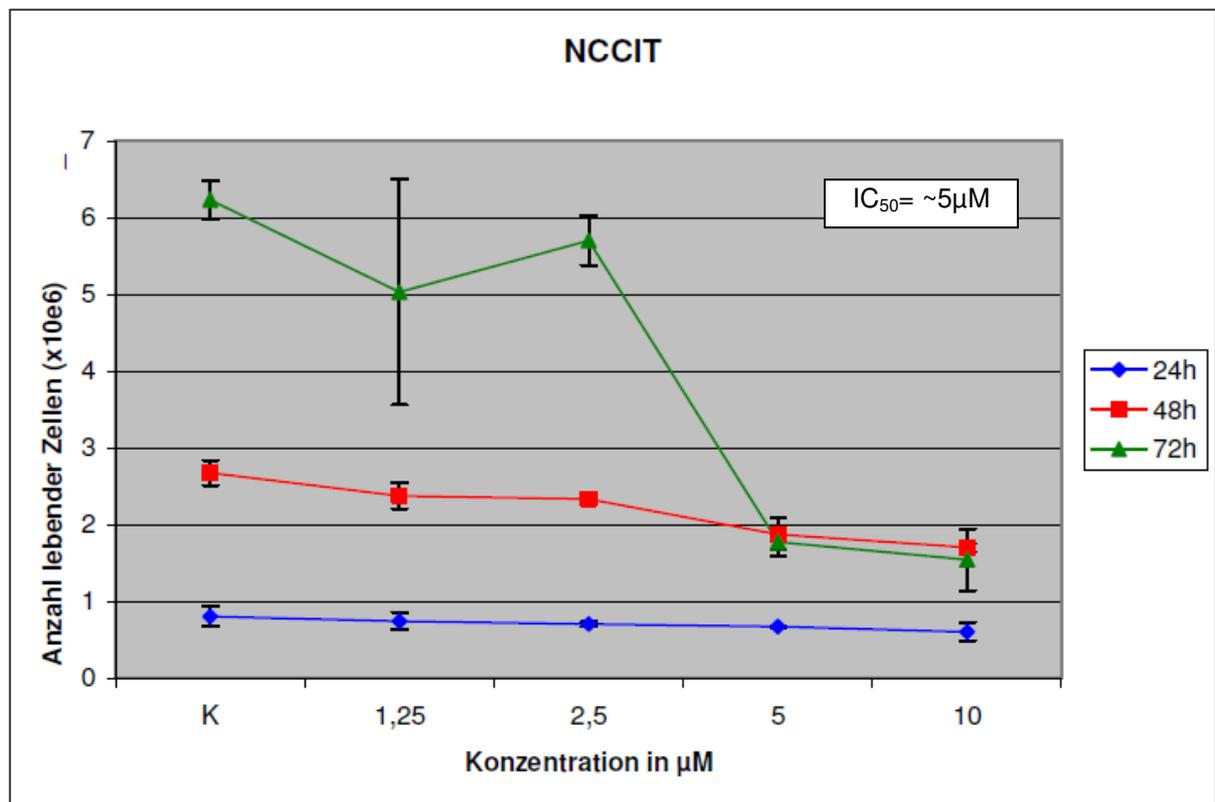


Abb. 22: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie NCCIT zur Ermittlung der  $IC_{50}$

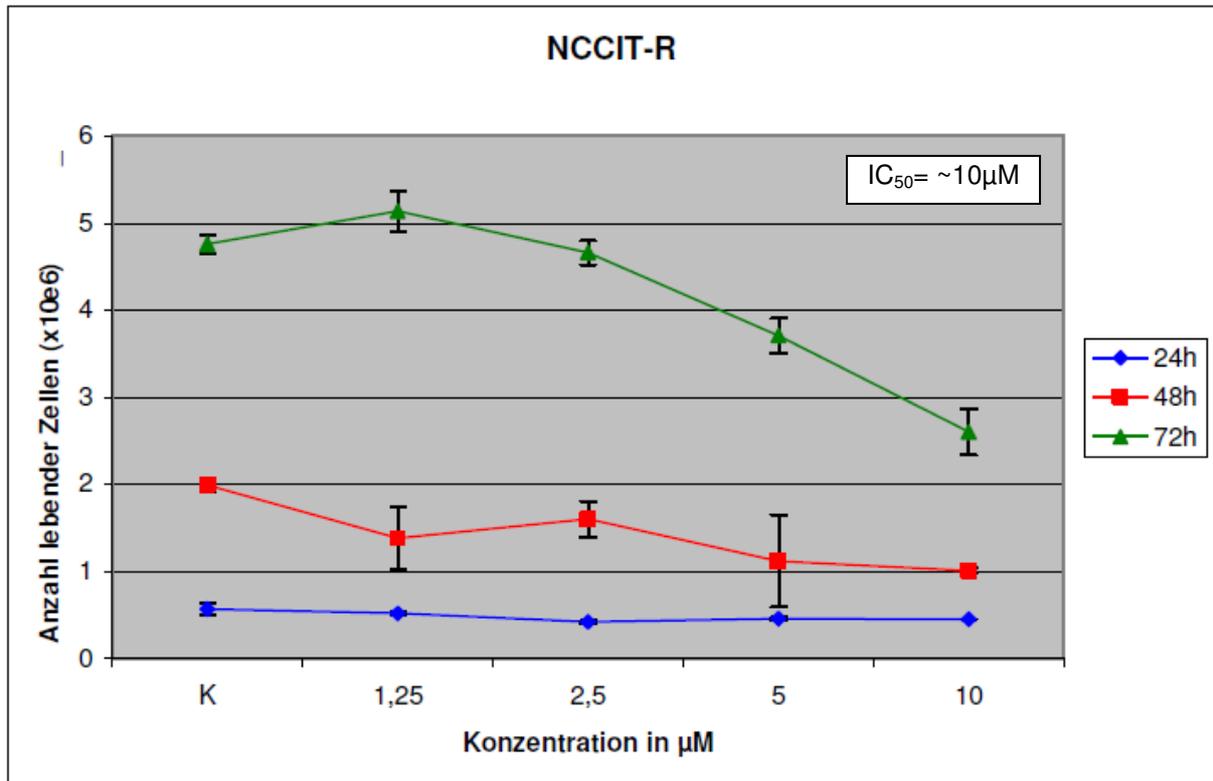


Abb. 23: Darstellung der Proliferation von Sunitinib-behandelten Zellen der Linie NCCIT-R zur Ermittlung der  $IC_{50}$

Zusammenfassend lauteten die  $IC_{50}$ -Konzentrationen für 48 Stunden Behandlungsdauer aller gemessenen Zelllinien wie folgt:

Tab.13:  $IC_{50}$ -Werte für 48h Behandlungsdauer der versch. KZT-Linien (mittels Zellzählung ermittelt)

Zelllinie	$IC_{50}$ -Konz.
NT2	7µM (SD: +/- 3,5)
NT2-R	7,5µM (SD: +/- 3,4)
2102EP	5µM (SD: +/- 0,6)
2101EP-R	6µM (SD: +/- 1,5)
NCCIT	5µM (SD: +/- 1,2)
NCCIT-R	10µM (SD: +/- 0,3)

Die Werte der  $IC_{50}$  lagen hier zwischen 5 und 10µM und wiesen somit einen höheren Dosisbereich auf als in der MTT-Messung. In allen drei Zelllinien zeigten die Cisplatin-resistenten Zellen einen etwas höheren Dosisbereich als die Cisplatin-sensitiven Zellen. In den Zelllinien NT2 und 2102EP war dieser Unterschied jedoch sehr gering. Bei diesen beiden Zelllinien zeigte sich demnach keine Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und Sunitinib. Anders war es bei der Zelllinie NCCIT. Hier wurde in den Cisplatin-resistenten Zellen eine doppelt so hohe Sunitinib-Konzentration zum Erreichen der  $IC_{50}$  benötigt wie in den Cisplatin-sensitiven Zellen.

### 3.2 Einfluss der Zellkonfluenz auf die $IC_{50}$

Bei den zur  $IC_{50}$ -Bestimmung durchgeführten Zellzähl-Versuchen fiel auf, dass bei einer unterschiedlich ausgesäten Zellzahl die  $IC_{50}$  deutlich variierte. Um näher zu untersuchen, ob und welchen Zusammenhang es zwischen den beiden Größen gibt, wurden verschiedene Zellzahlen der Zelllinie NT2 in gleich großen Petrischalen bzw. Wells ausgesät und diese jeweils mit der gleichen Konzentrationsreihe von Sunitinib behandelt. Der Anteil der lebenden Zellen wurde dann bei jedem Zellzahl-Ansatz ermittelt. Dies geschah zum einen mittels Zellzählung, zum anderen durch MTT-Messungen.

#### 3.2.1 Einfluss der Zellkonfluenz auf die $IC_{50}$ : Bestimmung mittels Zellzählung

Zunächst wurden drei Ansätze mit jeweils verschiedener Zellzahl durchgeführt. In einem Ansatz wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät, in einem zweiten  $5 \times 10^5$  Zellen und in einem dritten  $10 \times 10^5$  Zellen (also  $1 \times 10^6$  Zellen). Verwendet wurden jeweils Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5cm. Die Zellen wurden jeweils mit den gleichen Sunitinibkonzentrationen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von  $0 \mu\text{M}$  (Kontrolle) bis  $35 \mu\text{M}$  behandelt. Durchgeführt wurden diese Versuche wie in 2.2.6 beschrieben. Es wurde also nach 24, 48 und 72 Stunden der Anteil der lebenden Zellen in jeder Probe durch eine Zellzählung mittels der Trypanblau-Methode und Neubauer-Zählkammer/ViCell-Counter untersucht. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Grafiken (Abb. 24 – 26) dargestellt.

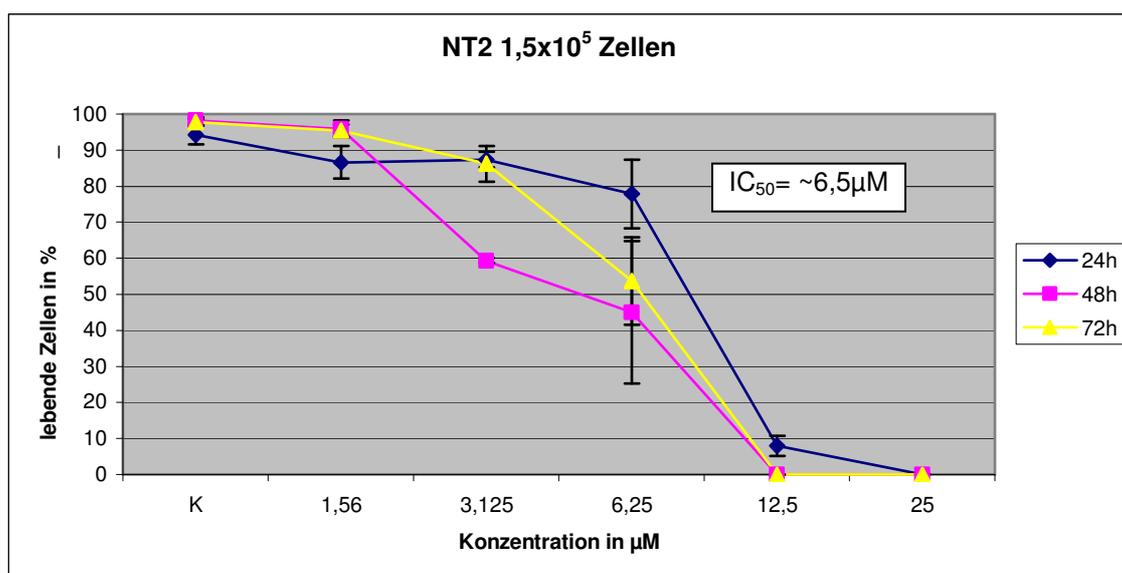


Abb. 24: Prozentsatz der lebenden Zellen nach Sunitinib Behandlung bei einer ausgesäten Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen

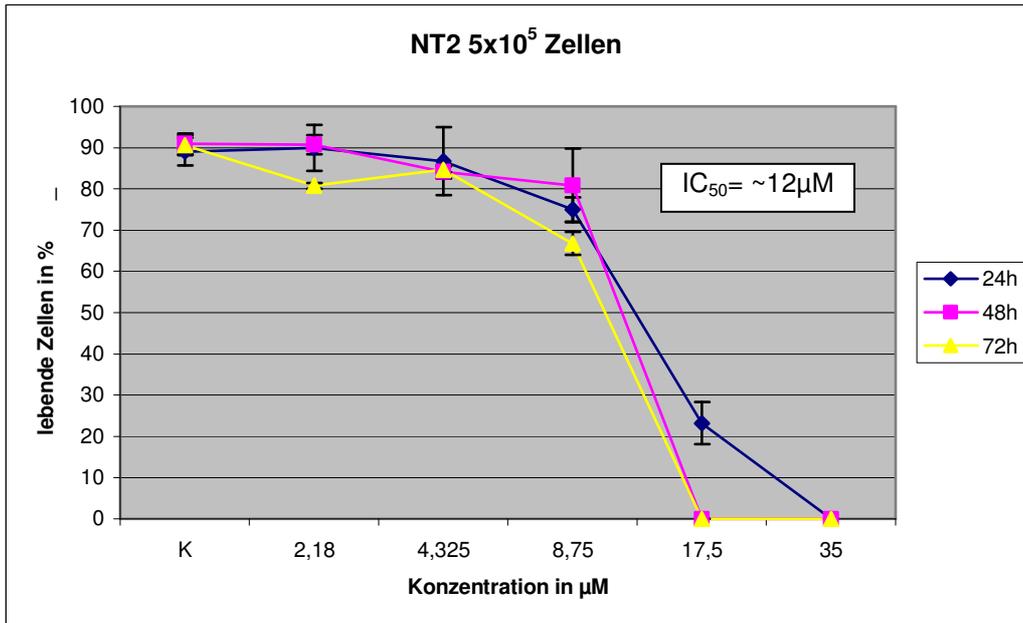


Abb. 25: Prozensatz der lebenden Zellen nach Sunitinib Behandlung bei einer ausgesäten Zellzahl von 5x10<sup>5</sup> Zellen

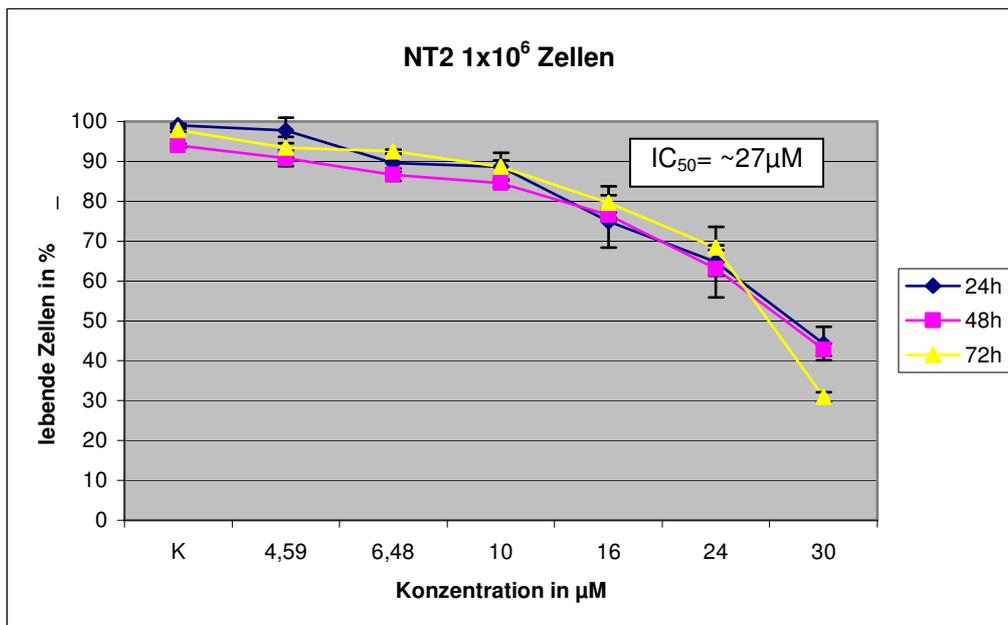


Abb. 26: Prozensatz der lebenden Zellen nach Sunitinib Behandlung bei einer ausgesäten Zellzahl von 1x10<sup>6</sup> Zellen

Zusammenfassend lauteten die IC<sub>50</sub>-Werte bei den drei verschiedenen Zellzahlen der gleichen Zelllinie wie folgt:

Tab. 14: Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte bei unterschiedlich ausgesäter Zellzahl

Zellzahl	IC <sub>50</sub> -Konz.
1,5x10 <sup>5</sup>	6,5µM (SD: +/- 1,5)
5x10 <sup>5</sup>	12µM (SD: +/- 1,0)
1x10 <sup>6</sup>	27µM (SD: +/-0,5)

Es stellte sich dar, dass die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen bei unterschiedlicher Zellzahl sehr stark differierten. So variierten diese von 6,5µM bis 27µM bei Veränderung der Zellzahl um eine Zehnerpotenz. Dies ist mehr als das Vierfache. Es konnte folgender Zusammenhang zwischen Zellzahl und IC<sub>50</sub> nachgewiesen werden: Je niedriger die Zellzahl, desto niedriger ist auch die IC<sub>50</sub>-Konzentration.

Um diese These zu bekräftigen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem in einem Ansatz 1x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät wurden, in einem weiteren Ansatz 1x10<sup>6</sup> Zellen. Beide wurden mit einer Sunitinib-Konzentration von 5µM behandelt und nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Anteil der lebenden Zellen anhand des ViCell-Counters bei beiden Zellzahlen bestimmt. Zur verlässlicheren Messung wurden von allen Proben Dreifachansätze gemessen. Das genaue Vorgehen ist in Punkt 2.2.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Abb. 27 zu entnehmen.

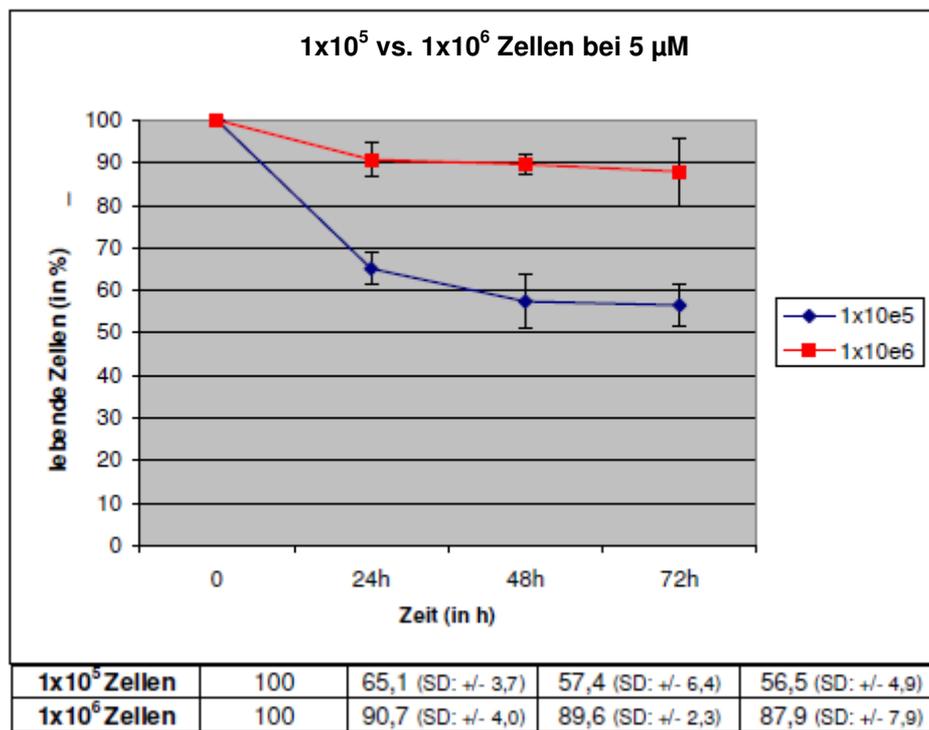


Abb. 27: Prozentsatz der lebenden Zellen bei einer Sunitinib Behandlung von 5 µM, sowohl bei einer Zellzahl von 1x10<sup>5</sup> Zellen (blau) als auch bei einer Zellzahl von 1x10<sup>6</sup> Zellen (rot), Messzeitpunkte liegen bei 24, 48 und 72h.

Bei diesem Versuch zeigte sich ebenfalls, dass die Zellen des Ansatzes mit 1x10<sup>5</sup> Zellen deutlich sensibler auf Sunitinib reagierten als die des Ansatzes mit 1x10<sup>6</sup> Zellen. Während bei dem Ansatz mit 1x10<sup>5</sup> Zellen nach einer 48-stündigen Behandlungsdauer mit Sunitinib nur noch knapp 60% der Zellen lebendig waren, lagen bei dem Ansatz von 1x10<sup>6</sup> noch knapp 90% lebendig vor.

Um nun zu untersuchen, welcher Zusammenhang zwischen  $IC_{50}$  und der Zellzahl besteht, wurden die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte logarithmiert und gegen die zugehörige Zellzahl angetragen (vgl. Abb. 28).

**Tab. 15: Logarithmische Antragung der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte**

$\log 6,5 = 0,813$
$\log 12 = 1,078$
$\log 27 = 1,431$

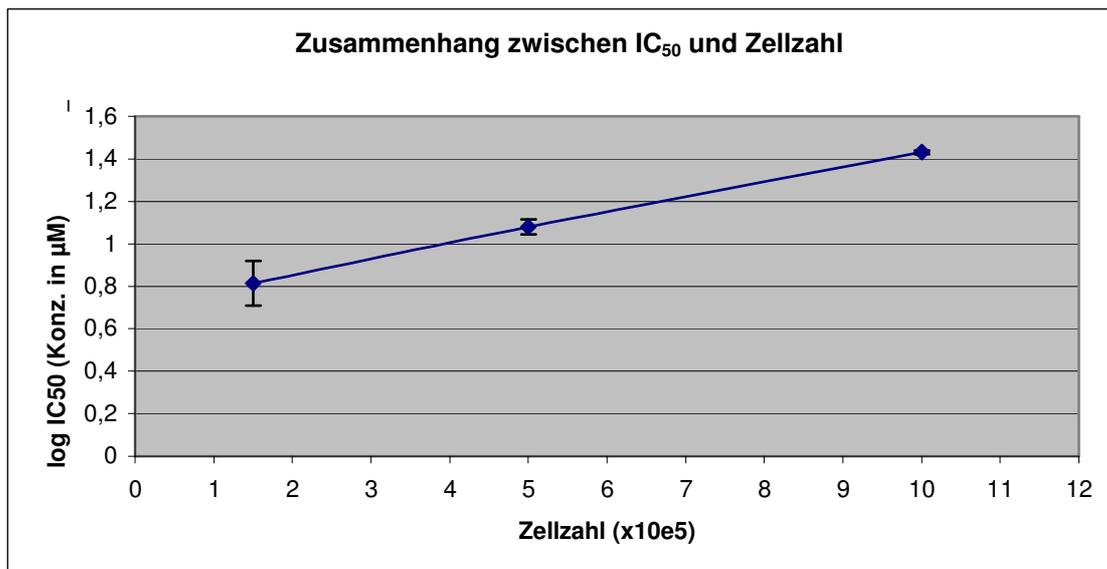


Abb. 28: Darstellung des Zusammenhangs zwischen  $IC_{50}$  (Werte liegen hier logarithmiert vor) und der Zellzahl

Hier zeigte sich, dass ein nahezu proportionaler Zusammenhang zwischen Zellzahl und Konzentration der  $IC_{50}$  besteht.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde außerdem der durch Zellzählung in Punkt 3.1.2 bestimmte  $IC_{50}$ -Wert mit der zugehörigen Zellzahl in die Abb. 28 übertragen. Dies wird in Abb. 29 veranschaulicht.

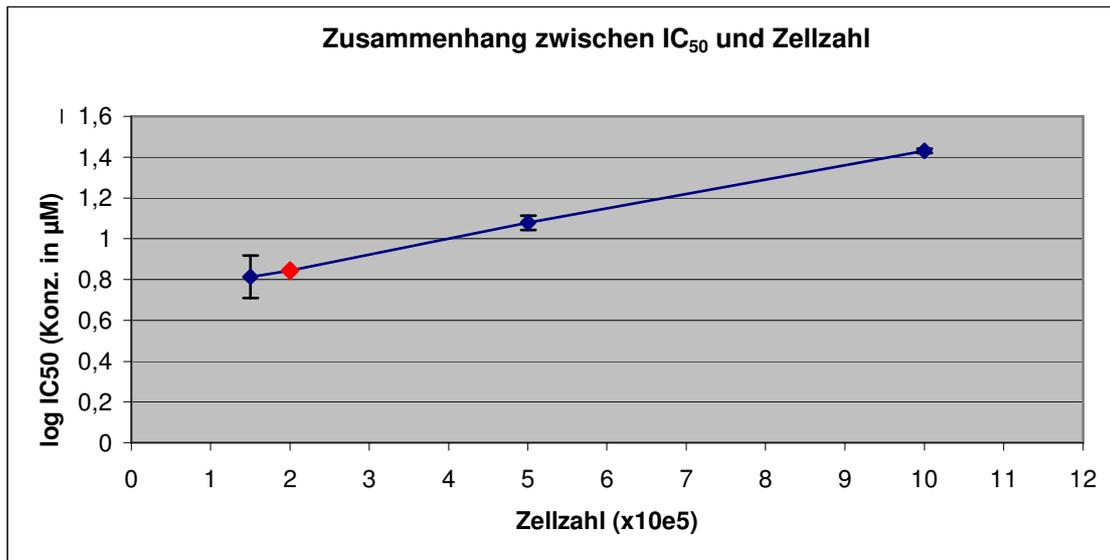


Abb. 29: Einfügen der in Punkt 3.1.2 bemessenen IC<sub>50</sub>-Konzentration mit zugehöriger Zellzahl zu den anderen IC-Konzentrationen + Zellzahlen der Zelllinie NT2

Hier zeigt sich, dass der Punkt entsprechend zu den anderen auf der ermittelten Linie liegt.

### 3.2.2 Einfluss der Zellkonfluenz auf die IC<sub>50</sub>: Bestimmung mittels MTT

Um diesen Effekt weiter zu verifizieren, wurden weitere Untersuchungen mittels eines zweiten Verfahrens, der MTT-Methode, durchgeführt. In 96-Well-Platten wurden in einem Ansatz 2000 Zellen ausgesät sowie in einem weiteren 4000 Zellen. Diese wurden mit einer Sunitinib-Konzentrationsreihe von 0,2 bis 25,6µM behandelt und nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurde wie in 2.2.5 beschrieben mit der MTT-Methode die IC<sub>50</sub>-Konzentration bestimmt (Grafen nicht abgebildet). Zu diesen Werten wurde der IC<sub>50</sub>-Wert, welcher bei einer Zellzahl von 6000 ausgesäten Zellen in Punkt 3.1.1 gemessen wurde, hinzugenommen.

Zusammenfassend lauteten die gemessenen IC<sub>50</sub>-Konzentrationen mit ihren zugehörigen Zellzahlen wie folgt:

Tab.16: Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte bei unterschiedlich ausgesäter Zellzahl (gemessen mittels MTT)

MTT	
Zellzahl	IC <sub>50</sub> -Konz.
2000 Zellen	1,3µM (SD: +/- 0,2)
4000 Zellen	2,4µM (SD: +/- 0,01)
6000 Zellen	3,8µM (SD: +/- 0,1)

Auch hier wurde deutlich, dass die IC<sub>50</sub>-Werte bei unterschiedlicher Zellzahl deutlich variierten. Es konnte erneut gezeigt werden, dass bei ansteigender Zellzahl ebenfalls höhere Medikamenten-Konzentrationen benötigt wurden, um die IC<sub>50</sub> zu erreichen.

Um diesen Effekt deutlicher darzustellen, wurden die jeweiligen  $IC_{50}$ -Konzentrationen gegen die entsprechende Zellzahl angetragen (Abb. 30).

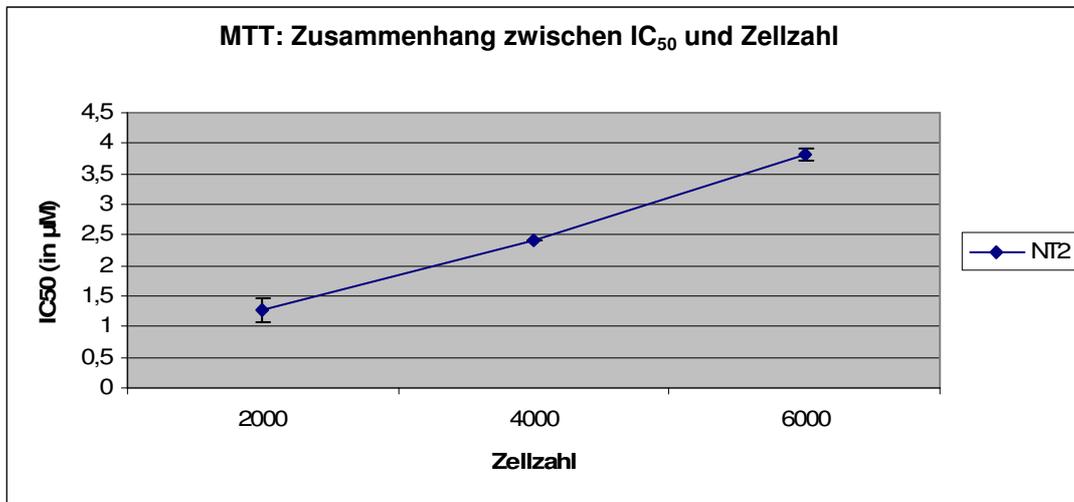


Abb. 30: Darstellung des Zusammenhangs zwischen  $IC_{50}$  und der Zellzahl, gemessen anhand der MTT-Methode

Hier konnte wiederum ein proportionaler Zusammenhang zwischen den beiden Größen aufgezeigt werden.

Da die im MTT und der Zellzählung ermittelten Werte voneinander abweichen, jedoch in beiden Messverfahren dargestellt werden konnte, dass ein nahezu proportionaler Zusammenhang zwischen  $IC_{50}$  und der ausgesäten Zellzahl besteht, wurde geprüft, wie beide Ergebnisse miteinander übereinstimmen.

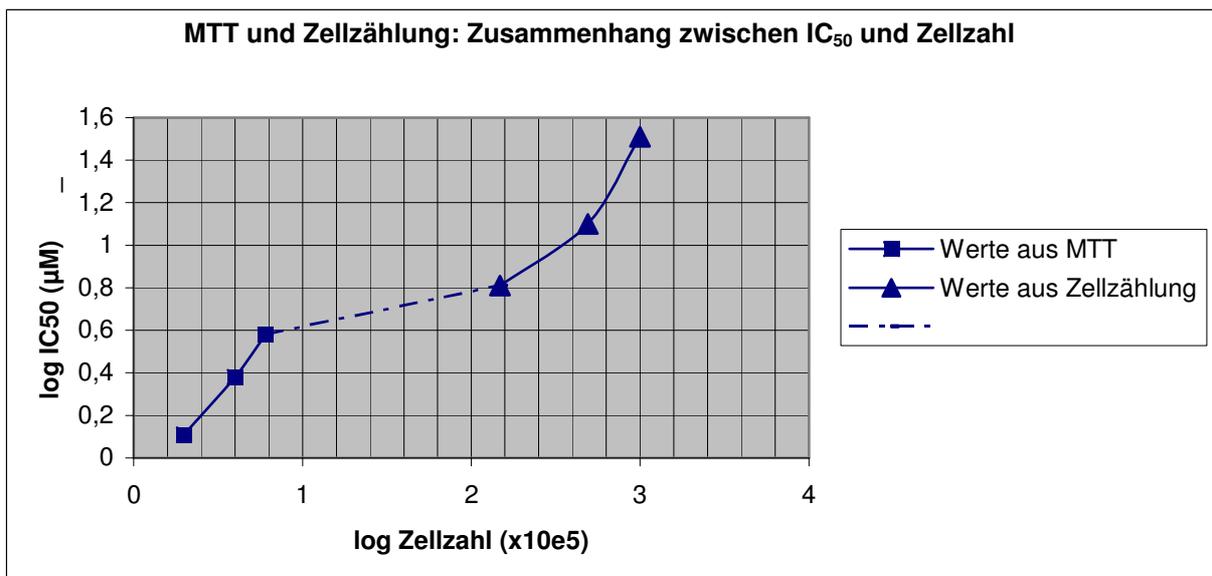


Abb. 31: Darstellung des Zusammenhangs zwischen  $IC_{50}$  und der Zellzahl: Werte aus MTT und Zellzählung

Es zeigte sich, dass die *Steigung* der Geraden aus der MTT-Gruppe nahezu mit der Gruppe der Zellzahl-Ergebnisse übereinstimmte. Auf der gleichen Geraden lagen die Ergebnisse beider Gruppen jedoch nicht.

### 3.2.3 Einfluss des pro Zelle zur Verfügung stehenden Platzes auf die IC<sub>50</sub>

Um näher auf diesen Effekt einzugehen, wurde nun untersucht, wie sich der Platz, der durchschnittlich jeder einzelnen Zelle zum Wachsen zur Verfügung steht, auf die IC<sub>50</sub>-Konzentration auswirkt. Der Durchmesser eines Wells der 96-Well-Platte betrug jeweils 0,7cm. Nach Berechnung der Kreisfläche anhand der Formel  $A = r^2 \cdot \pi$  ergab sich eine Fläche von 0,385cm<sup>2</sup>. Dividiert man diese Zahl nun durch 2000, 4000 bzw. 6000 Zellen, erhält man den Platz der durchschnittlich jeder einzelnen Zelle zur Verfügung stand.

Tab. 17: Durchschnittlich jeder Zelle zur Verfügung stehender Platz

Zellzahl	2000	4000	6000
IC <sub>50</sub> (µM)	1,3 (SD: +/- 0,2)	2,4 (SD: +/- 0,01)	3,8 (SD: +/- 0,1)
Platz (x10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> )	1,92	0,963	0,647

Der Zusammenhang zwischen den beiden Größen wird durch die folgende Abb. 32 ersichtlich.

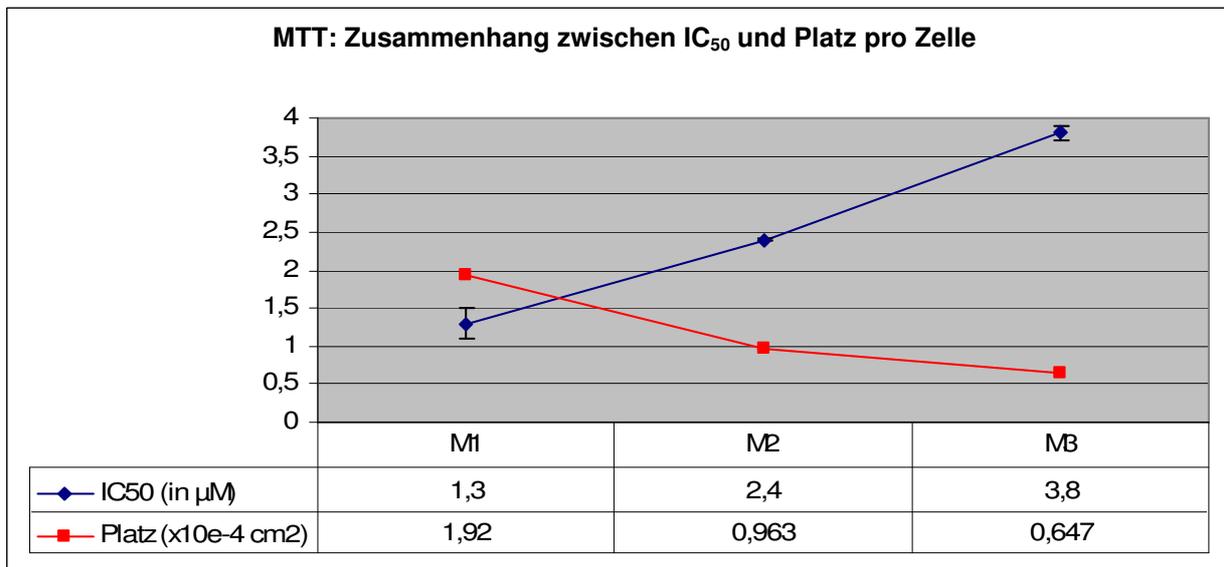


Abb. 32: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Platz pro Zelle und dem zugehörigen IC<sub>50</sub>-Wert (IC<sub>50</sub>-Wert anhand von MTT-Methode ermittelt)

Es wurde bewiesen, dass Zellkonfluenz und IC<sub>50</sub> einander beeinflussen. Je geringer der Platz ist, den jede Zelle zur Verfügung hat, also je enger die Zellen aneinander liegen, desto höher ist die benötigte IC<sub>50</sub>-Konzentration. Wie in der Abbildung zu

erkennen ist, zeigte sich ein deutlicher indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen dem pro Zelle zur Verfügung stehenden Platz und den IC<sub>50</sub>-Werten.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde diese Auswertungsmethode ebenfalls mit den in 3.2.1 ermittelten IC<sub>50</sub>-Werten der Zellzahlen von 1,5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> und 1x10<sup>6</sup> ausgesäten Zellen angewandt. Der in den 5,5x5,5cm großen Petrischalen zur Verfügung stehende Platz war eine Kreisfläche von 23,75cm<sup>2</sup>. Diese durch die Anzahl der Zellen dividiert, ergab folgende Flächen:

**Tab. 18: Durchschnittlich jeder Zelle zur Verfügung stehender Platz**

Zellzahl	1,5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>
IC <sub>50</sub> (µM)	6,5 (SD: +/- 1,5)	12 (SD: +/- 1,0)	27 (SD: +/- 0,5)
Platz (x10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> )	1,58	0,47	0,24

Dieser Zusammenhang wird in der folgenden Abb. 33 grafisch dargestellt.

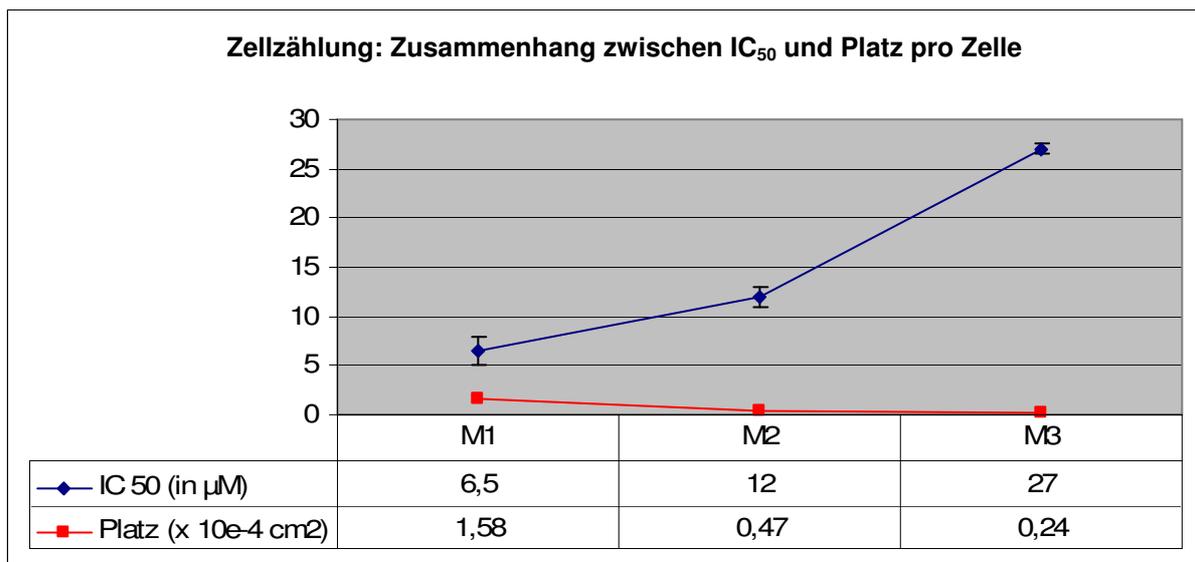


Abb. 33: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Platz pro Zelle und dem zugehörigen IC<sub>50</sub>-Wert (IC<sub>50</sub>-Wert anhand von Zellzählung ermittelt)

Hier wurde ebenfalls bewiesen, dass der geringer werdende, den Zellen zur Verfügung stehende Platz eine höhere IC<sub>50</sub>-Konzentration erfordert. Der Zusammenhang zwischen Platz pro Zelle und der zugehörigen IC<sub>50</sub> zeigte auch hier eine deutliche indirekte Proportionalität.

### 3.3 Kombinationsversuche mit Sunitinib und Cisplatin

Die Untersuchung, ob Sunitinib zusammen mit Cisplatin (CDDP = Cis-Diaminodichloroplatin) synergistische Effekte aufweist, wurde anhand einer

Kombinationsbehandlung analysiert. Dazu wurden die Zellen jeweils mit den Konzentrationen der IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> und IC<sub>50</sub> von Sunitinib, die an den Cisplatin-sensitiven Zellen ermittelt worden waren, behandelt. Zusätzlich zu dieser Sunitinib Monotherapiebehandlung – welche die Vergleichsbasis darstellen sollte – wurden die Konzentrationen IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> und IC<sub>50</sub> von Sunitinib mit den jeweiligen Konzentrationen IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub> und IC<sub>50</sub> von Cisplatin kombiniert, welche zu einem früheren Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe bestimmt worden waren. Untersucht wurden sowohl die Cisplatin-sensitiven als auch die Cisplatin-resistenten Zellen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zur Behandlung beider Gruppen für Cisplatin die IC<sub>50</sub>-Werte der Cisplatin-sensitiven Zellen benutzt. Ausgesät wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen, die Behandlung erfolgte über 48 Stunden. Danach wurden die Zellen geerntet, im ViCell-Counter die Viabilität bestimmt und anhand des Student T-Test die Signifikanz berechnet. Die Medikamentenkonzentrationen, mit denen behandelt wurde, lauteten wie folgt:

**Tab. 19: IC<sub>10</sub>-, IC<sub>25</sub>- und IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von Sunitinib der Cisplatin-sensitiven Zelllinien**

Sunitinib			
	NT2	2102EP	NCCIT
IC <sub>10</sub> (µM)	1,4	1	1
IC <sub>25</sub> (µM)	3,5	2,5	2,5
IC <sub>50</sub> (µM)	7	5	5

**Tab. 20: IC<sub>10</sub>-, IC<sub>25</sub>- und IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von Cisplatin der Cisplatin-sensitiven Zelllinien**

Cisplatin			
	NT2	2102EP	NCCIT
IC <sub>10</sub> (µM)	0,08	0,16	0,34
IC <sub>25</sub> (µM)	0,2	0,4	0,85
IC <sub>50</sub> (µM)	0,4	0,8	1,7

Die Effektivität einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Sunitinib-Monotherapie stellen die nachfolgenden Grafiken dar (Abb. 34 – 39).

- **Dunkelblau schraffiert:** Unterschiede sind statistisch signifikant in den behandelten Zellen, verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen ( $p < 0,05$ ).
- **Hellblau schraffiert:** Kombinationsbehandlung resultierte in einer signifikant höheren Zytotoxizität, verglichen mit der Monotherapie mit Sunitinib in der jeweiligen Konzentrationsstärke ( $p \leq 0,05$ ).

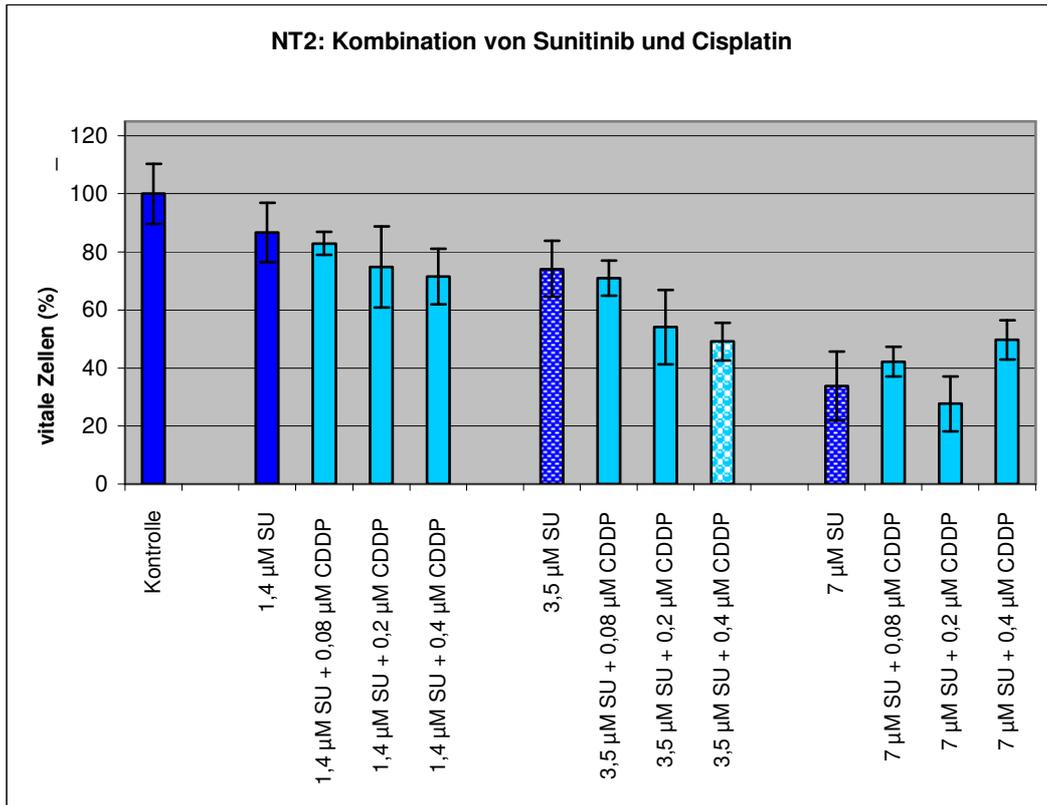


Abb. 34: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie NT2

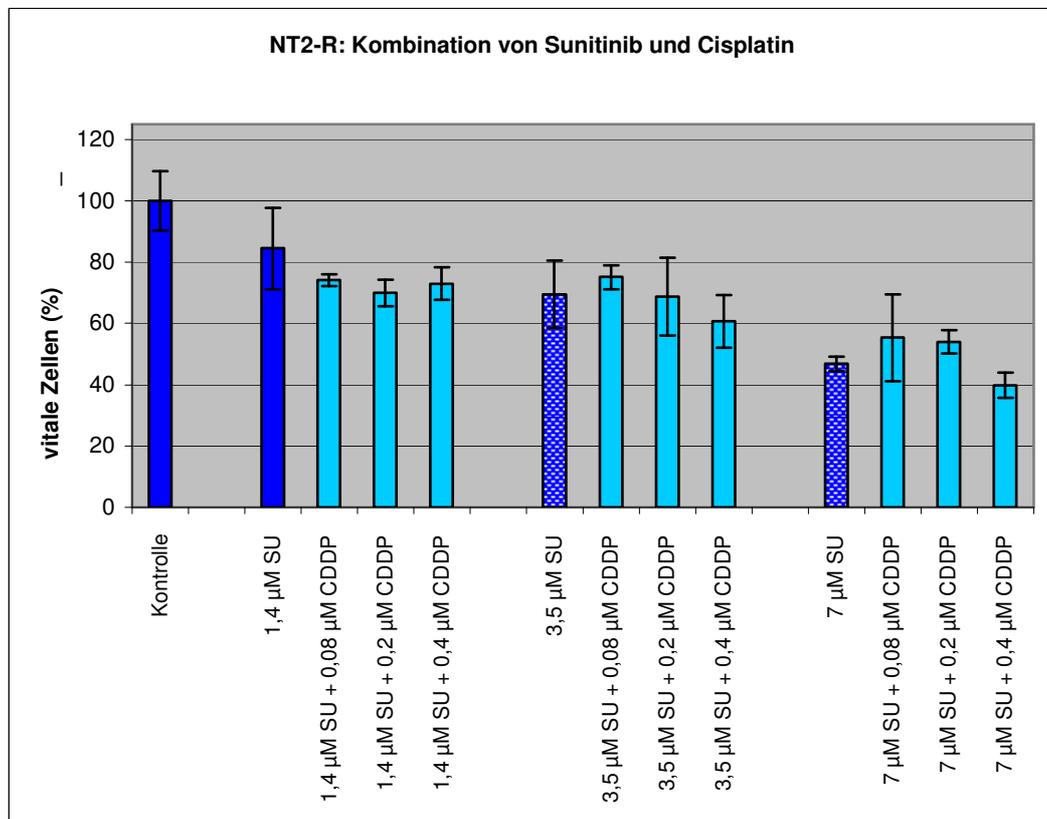


Abb. 35: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie NT2-R

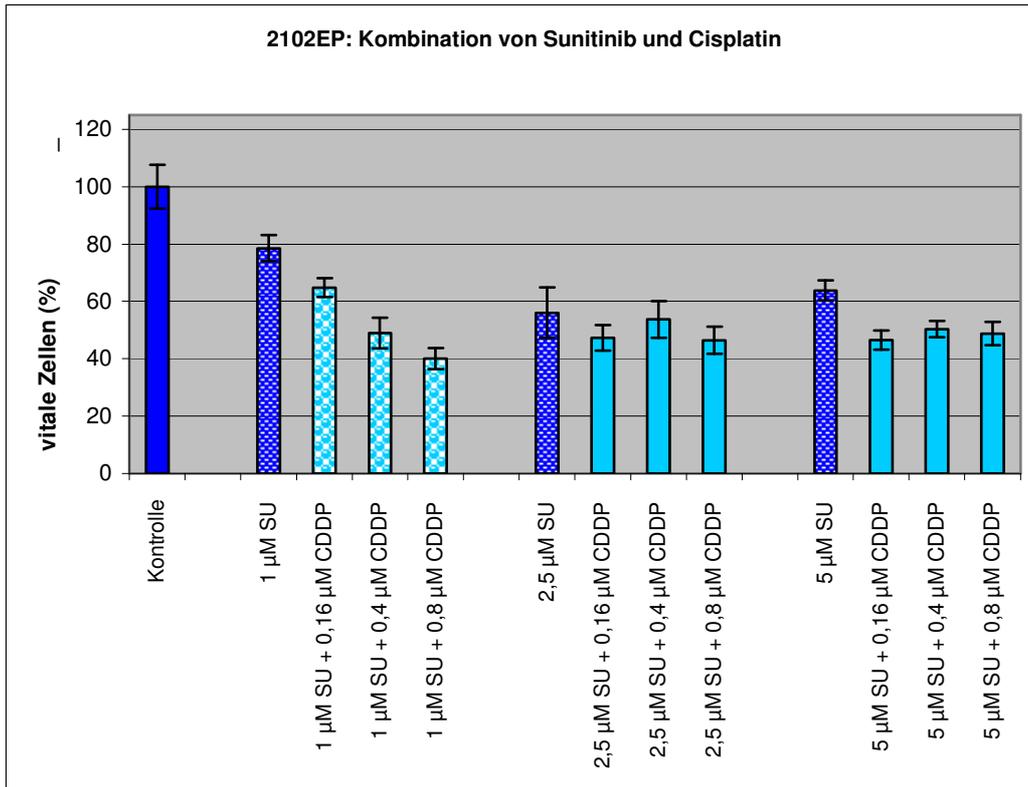


Abb. 36: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie 2102EP

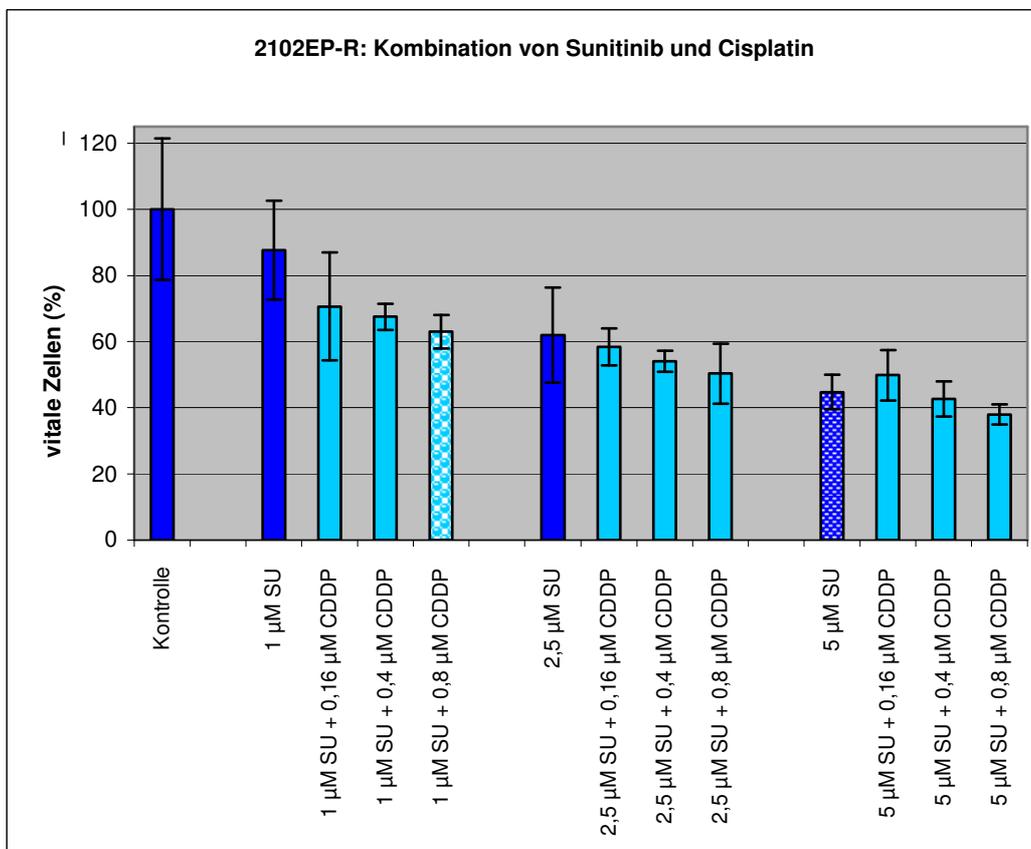


Abb. 37: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie 2102EP-R

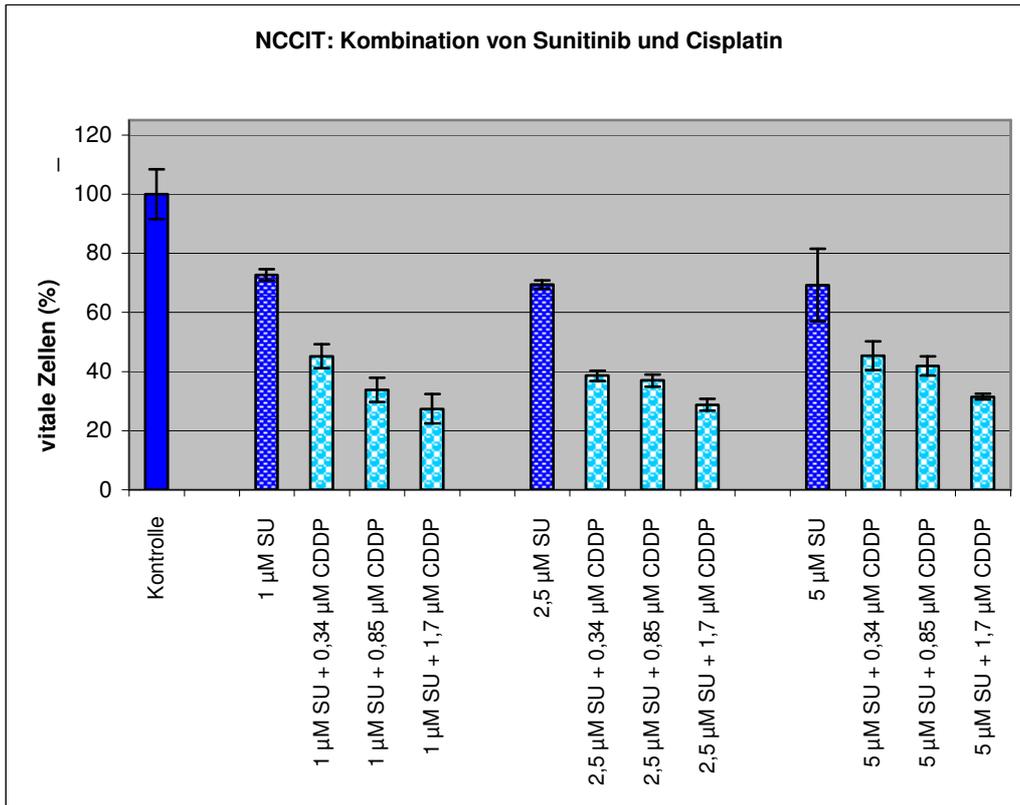


Abb. 38: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie NCCIT

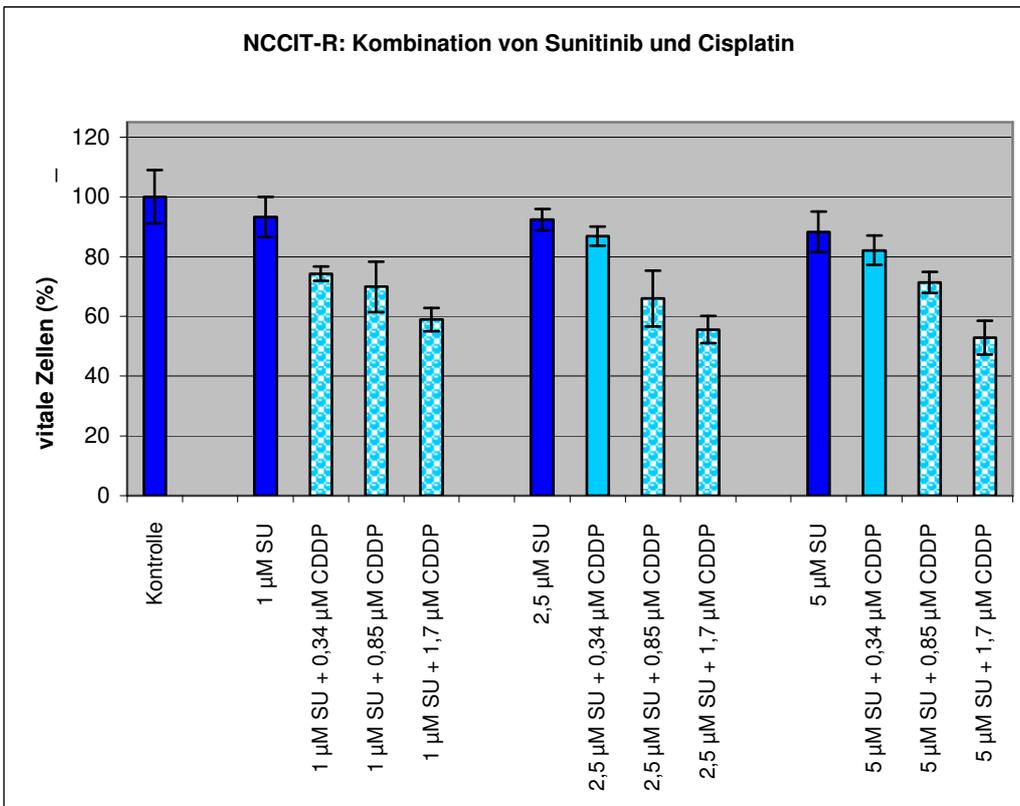


Abb. 39: Effekte der Monotherapie mit Sunitinib (dunkelblaue Balken) im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin (hellblaue Balken) bei der Zelllinie NCCIT-R

Es zeigte sich, dass der Effekt in der Monotherapie von Sunitinib sich nicht wesentlich zwischen den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zellen unterschied. Lediglich bei der Zelllinie NCCIT war eine etwas unterschiedliche Reaktion zu beobachten. Es wurde jedoch deutlich, dass die Kombinationstherapie mit Cisplatin und Sunitinib durchaus bessere Wirksamkeit besitzt und vor allem bei den beiden Zelllinien 2102EP und NCCIT das Zellwachstum stärker inhibiert. Allerdings war nur bei einer der Cisplatin-resistenten Sublinien, nämlich NCCIT-R, ein eindeutiger Effekt der Kombinationsbehandlung zu verzeichnen.

### 3.4 Untersuchung von Proteinen des Ras/Raf-Signalwegs und der Apoptoseinduktion

Anhand des Western Blot Verfahrens wurde untersucht, ob es zu einer veränderten Expression potentiell beteiligter Proteine des Ras/Raf-Signalwegs kommt. Es wurde die Expression von MEK und ERK, zwei wesentlichen Faktoren des MAP-Kinase-Weges, analysiert. Außerdem wurden deren aktivierte, also phosphorylierte Formen phospho-MEK (pMEK) und phospho-ERK (pERK) untersucht. Gemessen wurden von allen Zelllinien unbehandelte Kontrollzellen sowie über 48 Stunden mit der jeweiligen  $IC_{50}$ -Dosis von Sunitinib behandelte Zellproben. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Abb. 40 zu entnehmen.

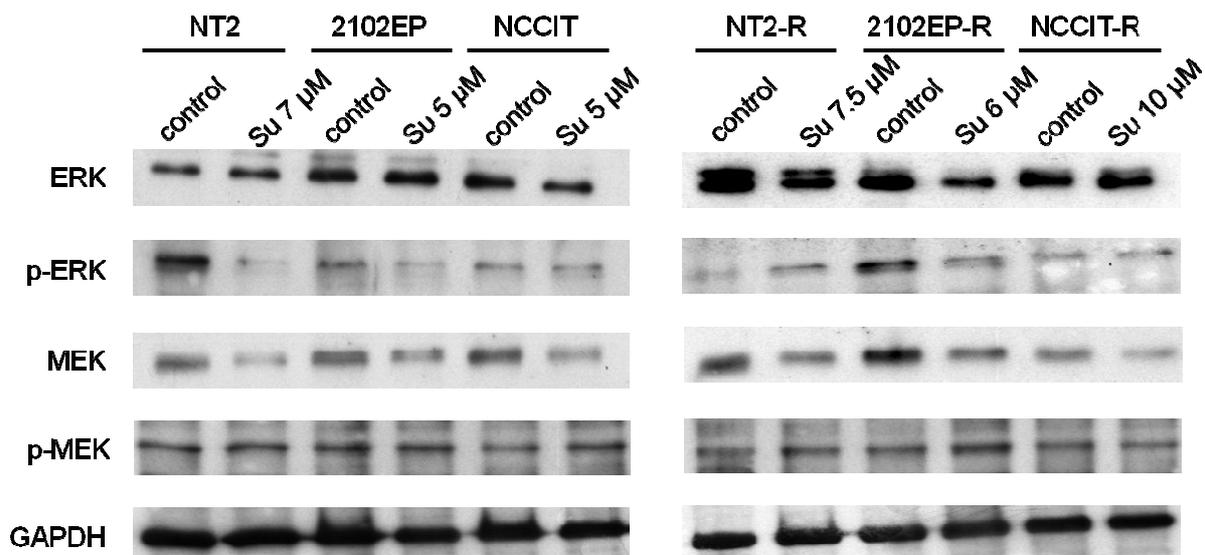


Abb. 40: Western Blot Analyse von den Proteinen ERK und MEK, sowie deren phosphorylierten Formen pERK und pMEK. Dargestellt sind sowohl die Untersuchungen der Kontrollzellen als auch die, mit der entsprechenden  $IC_{50}$ -Konzentration von Sunitinib behandelten Zellen. GAPDH stellt die Ladungskontrolle dar.

Bei den Zelllinien NT2, 2102EP und 2102EP-R zeigte sich unter der Sunitinib-Behandlung eine Herabregulierung von phospho-ERK. Bei den Zelllinien NCCIT, NT2-R sowie in NCCIT-R konnte diese Herabregulierung jedoch nicht festgestellt werden. Eine Veränderung der unphosphorylierten Form von ERK, also der inaktiven Form, war bei den Zelllinien NCCIT und 2102EP-R zu sehen.

Hinsichtlich phospho-MEK konnte keinerlei veränderte Expression unter Sunitinib festgestellt werden. Die unphosphorylierte Form MEK hingegen wurde in allen behandelten Zellproben herabreguliert.

Per Western Blot wurde zudem untersucht, ob eine Behandlung mit Sunitinib Apoptose auslöst. Hierfür wurde die veränderte Expression von der aktivierten Form der Caspase-3, sowie auf das Vorliegen der gespaltenen Form von PARP untersucht (keine Abbildung). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Proben beobachtet werden.

### 3.5 Durchflusszytometrie

#### 3.5.1 Zellzyklusanalyse mittels FACS

Des Weiteren wurde der Einfluss von Sunitinib auf den Zellzyklus untersucht. Gemessen wurden sowohl die Zellen der Cisplatin-sensitiven, als auch der Cisplatin-resistenten KZT-Linien. Dazu wurden die Zellen mit ihrer jeweiligen  $IC_{50}$ -Dosis von Sunitinib behandelt und 48 Stunden inkubiert. Danach wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Kontrollzellen geerntet und wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben mit Ethanol fixiert und anschließend mit Propidiumiodid gefärbt. Daraufhin wurden die einzelnen Zellsuspensionen im FACS-Gerät analysiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind den nachfolgenden Abbildungen zu entnehmen. Links sind jeweils die Untersuchungen der Kontrollzellen abgebildet, die rechte Grafik zeigt die mit der jeweiligen  $IC_{50}$  behandelten Zellen.

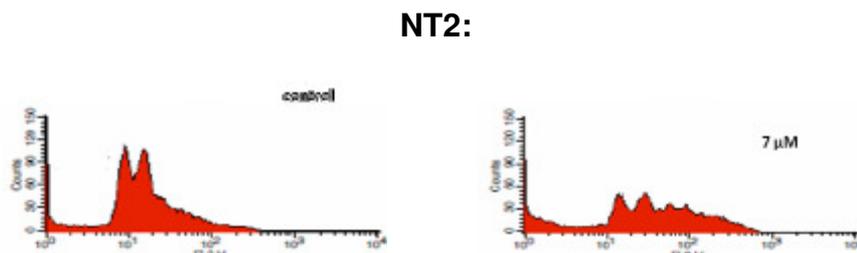


Abb. 41: Zellzyklusanalyse der Zelllinie NT2. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer  $IC_{50}$ -Dosis von  $7\mu\text{M}$  Sunitinib behandelten Zellen.

**2102EP:**

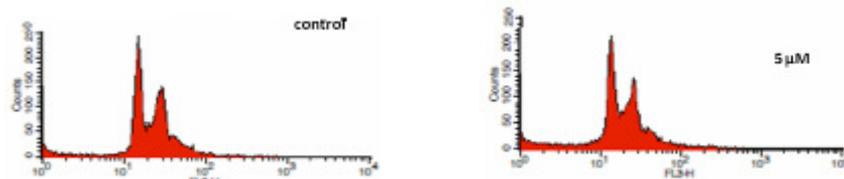


Abb. 42: Zellzyklusanalyse der Zelllinie 2102EP. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer IC<sub>50</sub>-Dosis von 5μM Sunitinib behandelten Zellen.

**NCCIT:**

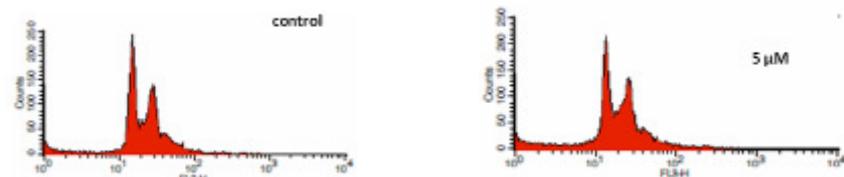


Abb. 43: Zellzyklusanalyse der Zelllinie NCCIT. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer IC<sub>50</sub>-Dosis von 5μM Sunitinib behandelten Zellen.

Der Messung der Cisplatin-sensitiven Zellen folgte die Messung der Cisplatin-resistenten Zelllinien:

**NT2-R:**

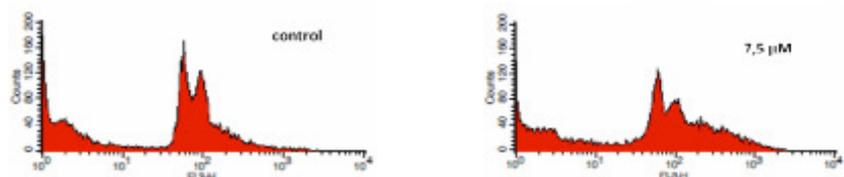


Abb. 44: Zellzyklusanalyse der Zelllinie NT2-R. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer IC<sub>50</sub>-Dosis von 7,5μM Sunitinib behandelten Zellen.

**2102EP-R:**

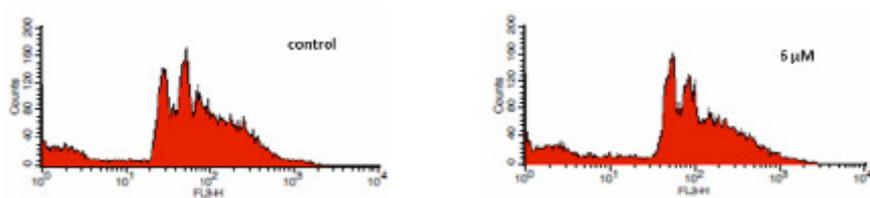


Abb. 45: Zellzyklusanalyse der Zelllinie 2102EP-R. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer IC<sub>50</sub>-Dosis von 6μM Sunitinib behandelten Zellen.

### NCCIT-R:

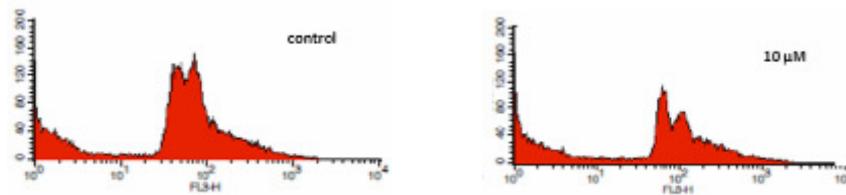


Abb.46: Zellzyklusanalyse der Zelllinie NCCIT-R. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: die über 48h mit einer  $IC_{50}$ -Dosis von  $10\mu\text{M}$  Sunitinib behandelten Zellen.

Es konnten hier keine gravierenden Änderungen des Zellzyklus beobachtet werden. Weder bei den Cisplatin-sensitiven, noch bei den Cisplatin-resistenten Zellen konnte eine Arretierung des Zellzyklus nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich bei keiner der Zelllinien eine relevante Induktion der Apoptose.

### 3.5.2 Untersuchung von Caspase-3-Aktivierung

Zusätzlich wurde untersucht, ob eine gesteigerte Apoptoseinduktion mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen die aktivierte Form der Caspase-3 mittels Durchflusszytometrie nachweisbar ist. Es wurden alle Zelllinien, sowohl die Cisplatin-sensitiven, als auch die Cisplatin-resistenten, untersucht. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit der Sunitinib-Konzentrationsreihe von  $1,25\mu\text{M}$  bis  $20\mu\text{M}$  behandelt und anschließend wie in Punkt 2.4.2 beschrieben mit dem Antikörper versetzt und im FACS gemessen (keine Abbildung). Es ließ sich jedoch auch mit dieser Methode keine Aktivierung von Caspase-3, das heißt keine Apoptoseinduktion unter der Sunitinib-Behandlung, nachweisen.

### 4 Diskussion

#### 4.1. Zielgerichtete Therapieansätze bei testikulären Keimzelltumoren

Testikuläre KZT treten vor allem bei jungen Männern im Alter von 25 bis 35 Jahren auf und sind in der Regel gut zu therapieren. Bei über 80% der Betroffenen kann mit einer vollständigen Remission gerechnet werden. Zu verdanken hat man diesen positiven Verlauf der Erkrankung weitgehend dem Chemotherapeutikum Cisplatin, das seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts in der Behandlung eingesetzt wird. In rund 20% der Fälle kommt es jedoch zu einem Therapieversagen. Bei diesen Patienten tritt eine primäre oder sekundäre Resistenz auf dieses Medikament auf, der Tumor spricht also schon zu Therapiebeginn nicht auf Cisplatin an oder es kommt zu einem späteren Tumorrezidiv. Diese Patienten haben in etwa der Hälfte der Fälle eine sehr schlechte Prognose. Zwar werden mittlerweile mit einigem Erfolg weitere Chemotherapeutika eingesetzt, wie etwa eine Dreierkombination aus Gemcitabin, Oxaliplatin und Paclitaxel, was in 10-15% zur langfristigen Remission führt. Trotz dieses Therapieerfolgs können jedoch Patienten mit Therapieversagen nach Cisplatin noch nicht zufriedenstellend behandelt werden. Die Erforschung und Entwicklung neuer Therapieoptionen ist daher dringend notwendig.

Bislang konnte mit Hilfe etlicher Untersuchungen geklärt werden, dass die Cisplatinresistenz bei KZT ein multifaktorielles Geschehen darstellt. Dies macht es schwierig, ein Therapiekonzept zu entwickeln, das auf die Wiederherstellung der Cisplatinsensitivität abzielt. Daher wird derzeit die Suche nach einem Medikament mit einem anderen Wirkmechanismus als Cisplatin deutlich forciert. Damit soll vermieden werden, dass eine Kreuzresistenz auftritt.

Da bekannt ist, dass KZT-Zellen zwei- bis vierfach sensitiver auf Zytostatika reagieren als andere Tumorzelllinien (Ebbing et al. 2008) und somit generell gut mit Medikamenten behandelbar sind, erscheint es sinnvoll, nach weiteren *medikamentösen* Therapieansätzen zu suchen. Zudem ist bekannt, dass KZT eine Vielzahl von Wachstumsfaktor-Rezeptoren exprimieren, die zum größten Teil Rezeptor-Tyrosinkinasen darstellen. Daher liegt es nahe, einen Therapieansatz zu untersuchen, durch den diese RTK gehemmt werden. Dadurch sollen im Tumor Wachstumssignale unterbunden sowie die weitere Ausbildung der Blutversorgung des Tumors gehemmt werden. Mit der Untersuchung des Medikaments Sunitinib, einem multiplen Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, war ein solcher Therapieansatz Gegenstand dieser Arbeit.

### 4.2 Inhibierung von Wachstumsfaktoren durch Sunitinib in der Tumorthherapie

Eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung spielen aktivierte Signaltransduktionswege, die von Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausgehen. Häufig kommt es zu dauerhaft aktivierten Proliferationssignalen, da Signaltransduktionswege nicht abgeschaltet bzw. durch fehlerhafte autokrine oder parakrine Stimulation ständig aktiviert werden. Sunitinib hemmt etliche dieser potentiell betroffenen Rezeptor-Tyrosinkinasen wie VEGF-R 1-3, PDGF-R  $\alpha$  und  $\beta$ , c-Kit, RET, Flt-3 sowie CSF-R. Dadurch kommt es zum einen zur intrazellulären Inhibierung von Proliferationssignalen, zum anderen zur Hemmung der Vaskulo- bzw. Angiogenese im Tumor.

Mit Hilfe dieses Wirkprinzips wird Sunitinib bereits erfolgreich bei einigen Tumorerkrankungen eingesetzt, beispielsweise bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). Hier beruht die wesentliche Wirkung auf der Inhibierung von c-Kit. Zudem stellt Sunitinib beim Nierenzellkarzinom die Standardtherapie dar, wo die wichtigste Wirkung auf der Hemmung von VEGF-R und PDGF-R basiert. Sunitinib befindet sich außerdem hinsichtlich der Behandlung vieler weiterer Tumorerkrankungen in der Testphase.

### 4.3 Wirkung von Sunitinib auf testikuläre Keimzelltumoren

#### 4.3.1 IC<sub>50</sub>-Konzentration von Sunitinib

Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Sunitinib bei KZT-Zellen wurde die IC<sub>50</sub> nach 48-stündiger Behandlung getestet, sowohl bei Cisplatin-sensitiven als auch bei Cisplatin-resistenten Tumorklinen. Die durch Zellzählung ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen in einem Bereich zwischen 5 und 10  $\mu$ M, die im MTT gemessenen Werte lagen zwischen 3,0 und 3,8  $\mu$ M.

Die Varianz zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten der MTT-Messungen und der Trypanblau-Methode mittels Zellzählung ist wohl auf die geringere Sensitivität der Trypanblau-Methode zurückzuführen. Dieses Phänomen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Altmann 1993, Falkenhain et al. 1998). Während zum Beispiel die sicher nachgewiesene IC<sub>50</sub>-Konzentration von Aceton bei 444 mM/l liegt, wurde in Versuchen mit der Trypanblau-Methode eine IC<sub>50</sub> von 703 mM/l gemessen (Schärfe 2004).

Diese Ungenauigkeit der Trypanblau-Methode könnte darauf zurückzuführen sein, dass die toten Zellen noch immer von einer semipermeablen Membran umgeben

sein müssen, damit das Zytoplasma angefärbt wird. Weiter zerstörte Zellen, bei denen nur noch einzelne Zellbestandteile vorhanden sind, können bei der Messung leicht übersehen werden und somit das Verhältnis von vitalen zu toten Zellen zugunsten der vitalen Zellen verzerren. Dieses Phänomen lässt davon ausgehen, dass die tatsächlichen  $IC_{50}$ -Werte eher im Dosisbereich der im MTT gemessenen Werte bei durchschnittlich 3-4  $\mu\text{M}$  liegen.

Diese Werte überschreiten jedoch die aufgrund von Phase I/II-Studien empfohlene Dosis von 0,1 bis 0,4 $\mu\text{M}$  (Faivre et al. 2006). Sie sind deutlich höher als die Konzentrationen, die zur Inhibierung der einzelnen Tyrosinkinasen benötigt werden. Diese liegen für VEGF-R bei 0,004 $\mu\text{M}$ , für PDGF-R  $\alpha$  bei 0,069 $\mu\text{M}$ , für PDGF-R  $\beta$  bei 0,039 $\mu\text{M}$  (Askadiusz 2009), für c-Kit zwischen 0,01 und 0,1 $\mu\text{M}$  und für RET ebenfalls bei 0,1 $\mu\text{M}$  (Chow und Eckhardt 2007). Trotzdem zeigen alle der gemessenen Zelllinien ein gutes Ansprechen auf Sunitinib in etwas höheren Konzentrationen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Sunitinib selbst bei klarzelligen Nierenzellkarzinom-Zellen diese pharmakologisch relevanten Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{M/l}$ , welche die RTK inhibieren, übersteigt (Huang et al. 2010). Trotzdem zeigt Sunitinib bei den Nierenzellkarzinomen eine so gute Wirkung, dass es bei diesen Tumoren als First-Line-Therapie zum Einsatz kommt. Vermutet wird, dass Sunitinib das Wachstum von Nierenzellkarzinomen hauptsächlich durch antiangiogenetische Mechanismen inhibiert und nicht direkt die Tumorzellen selbst zum Ziel hat. Dies wird angenommen, da Sunitinib die endotheliale Zellproliferation und Motilität bereits bei den Konzentrationen hemmte, bei denen die VEGF-R 2-Signale unterdrückt wurden. So zeigte sich bei Xenografts renaler Tumorzellen, dass Sunitinib innerhalb einer Behandlungsdauer von zwölf Stunden in der Lage war, das Zellwachstum zu hemmen und die Mikrogefäßdichte herabzusetzen. Allerdings konnten auch bei 72-stündiger Behandlung mit den oben erwähnten niedrigen Konzentrationen keine signifikanten Effekte auf die Proliferation und Apoptose *in vitro* auf Tumorzellen beobachtet werden (Huang et al. 2010).

Bei anderen mit Sunitinib behandelten Tumorarten zeigten sich ebenfalls deutlich höhere  $IC_{50}$ -Konzentrationen als die, die zur Hemmung der einzelnen Rezeptor-Tyrosinkinasen benötigt wurden. Trotzdem konnte das Tumorwachstum zu einem sehr hohen Prozentsatz inhibiert werden. So lag bei Nasopharyngealkarzinom-Zellen die ermittelte  $IC_{50}$  zwischen 2 und 7,5 $\mu\text{M}$  (Gu et al. 2010), bei Neuroblastomzellen zwischen 0,8 und 2,6 $\mu\text{M}$  (Calero et al. 2010) und bei Ewing-Sarkom-Zellen zwischen

5 und 17 $\mu$ M (Konanz 2008). Bei Thyroidkarzinom-Zellen ergab sich eine IC<sub>50</sub> von 1,8 $\mu$ M, klassische Apoptoseaktivität konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Fenton et al. 2010).

Was die Höhe der IC<sub>50</sub> bei Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien betrifft, konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Eine Kreuzresistenz kann somit ausgeschlossen werden. Dies legt nahe, dass die Mechanismen, die der Cisplatinresistenz zugrunde liegen, sich von denen einer möglichen Sunitinibresistenz deutlich unterscheiden.

Da die IC<sub>50</sub> *in vitro* über der Dosis liegt, die aus Phase II/III Studien bekannt sind, müssen weitere Aufschlüsse über Effekte von Sunitinib aus Xenograft-Versuchen gewonnen werden. Zwischenzeitlich liegen Ergebnisse von Versuchen an Mäusen vor, die sowohl mit Cisplatin-sensitiven als auch mit Cisplatin-resistenten Nichtseminom-Zellen inokuliert wurden (Castillo-Avila et al. 2009). Nach einer 15-tägigen Behandlungsdauer der Xenografts testikulärer KZT mit 40mg/kg/d Sunitinib zeigte sich eine deutliche Reduktion der Tumormasse, die sich zwischen den Cisplatin-sensitiven und den Cisplatin-resistenten Tumoren nicht signifikant unterschied. Außerdem wirkte sich die Sunitinib-Behandlung positiv auf die Überlebenszeit aus und erhöhte diese von 13 auf 36 Tage. Castillo-Avila et al. (2009) führten ebenfalls *in vitro* Versuche zur Proliferationshemmung nach einer 24-stündigen Behandlungsdauer mit Sunitinib anhand MTT-Assays durch, wobei die IC<sub>50</sub> etwa bei 6 $\mu$ M lag. KZT-Linien zeigten also ein durchaus gutes Ansprechen auf Sunitinib. Betrachtet man die in der hier vorgelegten Arbeit anhand von MTT-Assays ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen, liegen diese mit 3-4  $\mu$ M eher im unteren Bereich dessen, was für andere Tumorklinien angegeben wurde. Ein Einsatz als Therapie nach Erstlinientherapie bei Cisplatin-resistenten Tumoren bot sich demnach an. In jüngster Zeit sind klinische Studien zum Einsatz von Sunitinib bei Patienten mit KZT und Versagen einer Cisplatin-haltigen Therapie durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind entweder bereits publiziert (Feldman et al. 2010) oder derzeit zur Publikation eingereicht (Oechsle, Honecker et al.). So haben Feldman et al. (2010) bei 10 Patienten mit refraktären KZT die Wirksamkeit von Sunitinib getestet. Es konnte zwar bei einigen Patienten ein Tumormarkerabfall beobachtet werden, jedoch konnte kein objektives Ansprechen nachgewiesen werden, so dass die Studie gestoppt wurde. Oechsle und Honecker et al. haben eine Studie mit 33 Patienten durchgeführt, wobei

sie ein moderates Ansprechen auf diese Substanz feststellen konnten (Manuskript eingereicht; s. auch Kollmannsberger et al., ASCO 2010).

### 4.3.2 Einfluss der Zellkonfluenz auf die Wirkung von Sunitinib

Die Konzentration der  $IC_{50}$  hängt von der vorhandenen Zellzahl und damit dem durchschnittlich jeder Zelle zur Verfügung stehenden Platz ab. Dieser Zusammenhang konnte anhand von mehreren Versuchen in dieser Arbeit belegt werden. Je mehr Zellen vorhanden sind und je höher demnach die Zelldichte ist, desto höher ist die benötigte  $IC_{50}$ -Konzentration. Zwischen diesen beiden Größen konnte ein proportionaler Zusammenhang aufgezeigt werden. Eine indirekte Proportionalität besteht zwischen dem Wert der  $IC_{50}$  und dem der jeweiligen Zelle zur Verfügung stehenden Platz. Somit kann angenommen werden, dass fehlende Verbindungen zu Nachbarzellen Zellen anfälliger für den Effekt von Sunitinib macht. Sollte sich eine Übertragbarkeit dieses Phänomens auf die Tumorgöße und Tumorzelldichte *in vivo* zeigen, könnte dieser Nachweis durchaus auch von klinischem Interesse sein.

Diese Annahme wird durch Beobachtungen in anderen Versuchen gestützt. So zeigte sich in einem Versuch bei Cisplatin-behandelten Lymphomzellen, dass bei niedriger Zelldichte die Apoptoserate beträchtlich höher war als die bei in hoher Zelldichte ausgesäten Zellen. Hier wurden Konzentrationen von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml sowie  $1 \times 10^9$  Zellen/ml über 48 Stunden mit Cisplatin behandelt (Singh und Singh 2007).

Bei einer genaueren Untersuchung dieses Effekts fanden Singh und Singh (2007) zudem in Versuchen mit Mäusen heraus, dass die Apoptoserate bei den Tumorproben der späten Stadien niedriger war. Hierzu wurden Tumorproben, die fünf Tage in den Körpern der Tiere gewachsen waren, mit Proben der gleichen Tumore nach 17 Tagen verglichen. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen aus beiden Stadien wurden mit Cisplatin und Doxorubicin behandelt, anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass ein großer Teil der Tumorzellen in einem späteren Stadium in einen proliferativen Abschnitt des Zellzyklus wechselt. Dadurch entsteht eine erhöhte Resistenz gegen Apoptoseinduktion.

Außerdem könnten Kontakte zwischen den Zellen dazu führen, dass diese sich gegenseitig schützen. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass die Expression des Onkogens *src* in einer Zelle das Überleben der umliegenden benachbarten

Zellen gegenüber Zytostatika, in diesem Fall Cisplatin, erhöhen kann (Peterson-Roth et al. 2009). Ob unter Sunitinib-Behandlung ähnliche Phänomene auftreten, ist bislang nicht untersucht worden.

Der nachgewiesene Einfluss der Zellkonfluenz auf die Wirkung von Zytostatika zeigt zum einen, wie wichtig es ist, bei *in vitro* Experimenten die eingesetzte Zellzahl zu kontrollieren, um eine Vergleichbarkeit von Versuchsergebnissen zu gewährleisten. Zum anderen impliziert er, dass kleine Tumoren, die sich in einem frühen Stadium befinden, besser auf Tyrosinkinase-Inhibitoren ansprechen als große Tumoren. Somit könnte sich Sunitinib bei minimaler Resttumorlast als effektiver erweisen als im Zustand einer weit fortgeschrittenen Metastasierung.

### 4.3.3 Kombinationsbehandlung von Sunitinib und Cisplatin

Die durch eine Kombinationsbehandlung erzielten Wirkungen haben sich als durchaus effektiv erwiesen. Es zeigte sich vor allem in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien ein deutlich erhöhter Effekt auf die Apoptoserate, besonders bei den Zelllinien 2102EP und NCCIT. Hier besaßen die Kombinationswerte fast überall eine statistisch signifikant erhöhte Toxizität gegenüber einer Monotherapie mit Sunitinib.

Auch die Cisplatin-resistenten Zellen sprachen gut auf eine Kombinationstherapie an. Zwar wurde die Zellproliferation weniger stark gehemmt als bei den Cisplatin-sensitiven Zellen, jedoch erwies sich bei diesen Zellen eine Kombinationstherapie vereinzelt, z.B. bei NCCIT-R, einer Monotherapie signifikant überlegen.

Auch diese Tatsache könnte von klinischer Relevanz sein. Durch Einsatz einer Kombinationsbehandlung könnten beispielsweise geringere Dosen von Cisplatin benutzt werden, um die relativ starken Nebenwirkungen dieses Medikaments zu reduzieren. Außerdem könnte eine Kombinationstherapie einen neuen Therapieansatz für Cisplatin-resistente Tumoren darstellen.

Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützen die Annahme, dass Cisplatin und Sunitinib als Kombinationsbehandlung eine gute Effektivität besitzen. So wurde die Kombination auch an Ehrlich Aszites Karzinomzellen geprüft. Die Zellen wurden mit der  $IC_{50}$  dieser Tumorzellen mit Cisplatin behandelt ( $85\mu\text{M}$ ), kombiniert mit 1 bzw.  $2\mu\text{M}$  Sunitinib. Daraufhin wurden die Zellproben für 24 Stunden inkubiert und anhand der Trypanblau-Methode gezählt. Auch hier zeigte die Kombinationsbehandlung eine signifikant höhere Toxizität als eine Monotherapie mit Sunitinib bzw. Cisplatin (Suddek 2010).

Diese Kombinationstherapie wurde bereits auch *in vivo* bei mit Tumorzellen inokulierten Mäusen überprüft. Hier wurde in einer Gruppe eine Sunitinib-Monotherapie durchgeführt. Eine zweite Gruppe erhielt eine Cisplatin-Monotherapie, eine dritte wurde einer Kombinationstherapie mit Sunitinib und Cisplatin unterzogen. Es zeigte sich, dass unter Sunitinib das Tumorstadium um 84% gehemmt wurde, während es unter der Cisplatin-Behandlung zu einer Wachstumshemmung um 80% kam. Die Kombinationstherapie bewirkte hingegen eine Inhibierung um 103% - die Größe des Tumors nahm also um 3% ab (Suddeck 2010).

Die Kombinationsbehandlung mit Sunitinib zeigte zudem den Effekt, dass die Nephrotoxizität von Cisplatin reduziert wurde. Dies wurde zum einen durch ein abnehmendes Verhältnis von Nierengewicht zu Körpergewicht bei Mäusen bewiesen, zum anderen durch verbesserte Nierenfunktionsparameter unter Sunitinib im Vergleich zu Cisplatin (Suddeck 2010).

Des Weiteren liegen Kombinationsversuche von Sunitinib und Cisplatin an Xenografts testikulärer KZT vor (Castillo-Avila et al. 2009). Mit sowohl Cisplatin-sensitiven als auch Cisplatin-resistenten Nichtseminomzellen inokulierte Mäuse wurden in verschiedene Versuchsgruppen geteilt. Eine Gruppe erhielt eine Sunitinib-Monotherapie, eine weitere eine Cisplatin-Monotherapie und eine dritte Gruppe eine Kombinationsbehandlung. Bei der Cisplatin-resistenten Gruppe zeigte sich wie erwartet kein Ansprechen auf die Cisplatin-Monotherapie. Die Sunitinib-Monotherapie und die Kombinationstherapie erzielten die gleichen Effekte, die in einer deutlichen Reduktion der Tumormasse resultierten. Bei den Cisplatin-sensitiven Tumoren konnten durch die Kombinationstherapie sowohl in Bezug auf Reduktion der Tumormasse als auch hinsichtlich Verlängerung der Überlebenszeit (47 Tage versus 13 Tage der unbehandelten Kontrollgruppe, bzw. 33 und 36 Tage bei Monotherapien) deutlich bessere Effekte erreicht werden als durch die jeweiligen Monotherapien. Ein Test der Kombinationsbehandlung im klinischen Bereich erscheint daher sinnvoll.

### 4.3.4 Wirkung auf MEK/ERK

Auf proteinchemischer Ebene wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es nach einer 48-stündigen Behandlung mit Sunitinib zu einer Herabregulierung von phosphoryliertem ERK1/2 kommt, allerdings nur bei den Zelllinien NT2, 2102EP und 2102EP-R. Phosphoryliertes MEK1/2 war in den behandelten Zellen im Vergleich zu den

unbehandelten Kontrollzellen völlig unverändert. Dafür war jedoch das unphosphorylierte MEK1/2, also die inaktive Form, in den behandelten Zellen herabreguliert. Es konnte unter Sunitinib-Behandlung keine veränderte Aktivierung von Caspase-3 oder eine veränderte Anzahl von Spaltprodukten von PARP nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur teilweise zu finden. So zeigte sich eine verminderte Expression von pERK bei der Behandlung von papillären Schilddrüsenkarzinomzellen unter der Behandlung von Sunitinib, eine pMEK-Veränderung wurde nicht beschrieben (Fenton et al. 2010).

Ebenfalls konnte unter Sunitinib bei Leukämiezellen eine pERK-Inhibierung festgestellt werden, auch hier wurde keine Veränderung von pMEK beschrieben (Ikezoe et al. 2006). Dort wurde allerdings bereits nach einstündiger Behandlungsdauer mit Sunitinib die Veränderung in der Proteinexpression analysiert. In dieser Arbeit betrug die Behandlungsdauer bis zur Untersuchung auf veränderte pMEK/ERK Expression jedoch 48 Stunden. Dies könnte die im Vergleich relativ schwache Herabregulierung von pERK erklären.

Dass der Einfluss eines Zytostatikums auf pERK von der Behandlungsdauer abhängt, wurde in einem Cisplatin-basierten Versuch dargestellt. Dort wurde deutlich, dass die Apoptoserate und somit die Caspase-3 Aktivität unter Behandlung mit Cisplatin bis zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden deutlich zunahm. Anschließend jedoch nahm die Apoptoserate wieder ab. Dies ist auf eine plötzlich auftretende Hemmung der Caspasen-3, -8 und -9 zurückzuführen (Schweyer et al. 2004). Im Unterschied zu den Versuchen mit Sunitinib nahm die MEK/ERK-Phosphorylierung jedoch unter Cisplatin zu frühen Zeitpunkten zu.

Dass Sunitinib allerdings anders wirkt als Cisplatin, nämlich über eine Hemmung von pMEK/pERK, dafür sprechen die im Western Blot gezeigten Effekte und zudem die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung bei Kombinationsversuchen von Sunitinib und einem MEK-Inhibitor (Nishioka et al. 2007). Die Kombination von Cisplatin mit einem MEK-Inhibitor reduzierte hingegen die Wirksamkeit von Cisplatin (Schweyer et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Sunitinib zumindest in den Zelllinien NT2, 2102EP und 2102EP-R eine geringere Expression von pERK, vermutlich über eine Hemmung des Signalwegs und somit der Phosphorylierung von ERK, bewirkt. Da ERK in der Regel von pMEK phosphoryliert wird, könnte es sinnvoll sein, Sunitinib

auch bei den eben erwähnten KZT-Linien mit einem MEK-Inhibitor zu kombinieren und zu überprüfen, ob hierunter eine verstärkte Zytotoxizität resultiert.

Da der Behandlungszeitraum mit 48 Stunden sehr lang war, ist nicht auszuschließen, dass sich zu einem früheren Zeitpunkt vielleicht auch bei den Zelllinien NT2-R, NCCIT und NCCIT-R Effekte bezüglich pERK gezeigt hätten. Um dies zu untersuchen, müssten Versuche mit kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt werden. Angaben zur unter Sunitinib verringerten Expression von unphosphoryliertem MEK sind aus der Literatur bislang nicht bekannt. Möglicherweise wird durch die Behandlung mit Sunitinib in zytotoxischen Dosen ( $IC_{50}$ ) die Synthese von MEK gehemmt, oder aber es kommt zu einem verstärkten Abbau des Proteins. Dieser Effekt sollte in weiteren Versuchen näher untersucht werden.

### 4.3.5 Wirkung auf Zellzyklus und Apoptose

In der Literatur wurde bei verschiedenen Tumorzellen unter Sunitinib-Behandlung ein G0/G1-Arrest beschrieben. Dies zeigte sich zum Beispiel bei Untersuchungen an Nasopharyngeal-Karzinomzellen (Hui et al. 2010), an Schilddrüsen-Karzinomzellen (Fenton et al. 2010) sowie an Neuroblastom-Zellen (Calero et al. 2010). Bezüglich KZT konnte in dieser Arbeit jedoch nach einer 48-stündigen Behandlungsdauer kein G0/G1-Arrest beobachtet werden.

Des Weiteren konnte anhand der FACS-Analyse keine Caspase-3-Aktivierung und somit keine verstärkte Induktion einer klassischen Apoptose gezeigt werden. Dies stimmte mit den Caspase-3- und PARP-Untersuchungen mittels Western Blot überein, die nach 48-stündiger Behandlungsdauer ebenfalls keine erhöhte Apoptoseinduktion aufzeigten (siehe Punkt 3.4). Dass Sunitinib keine klassische Apoptose auslöst, ist in der Literatur, beispielsweise bei Thyroid-Karzinomzellen (Fenton et al. 2010) oder bei Nierenzell-Karzinomzellen (Huang et al. 2010), bereits früher berichtet worden. Somit ist anzunehmen, dass die Tumorstillung durch Sunitinib nicht auf direkter Apoptoseinduktion in den Zellen beruht, sondern möglicherweise über Nekrose oder aber Auslösen einer „mitotischen Katastrophe“ induziert wird.

Das Fehlen eines direkten Apoptosenachweises und eine deutlich höhere  $IC_{50}$ -Konzentration als sie zur singulären Hemmung der Wachstumsrezeptor-Tyrosinkinasen benötigt wird, wurden auch bei Untersuchungen an Nierenzell-Karzinomzellen gefunden (Huang et al. 2010). Nicht nur bei *in vivo* Versuchen,

sondern auch bei der Behandlung von Patienten mit KZT dürfte allerdings – vergleichbar zum Nierenzellkarzinom – ein zusätzlicher anti-angiogenetischer Effekt zu erwarten sein, der den Antitumor-Effekt unterstützt.

Die Untersuchung auf verstärkte Apoptoseinduktion fand in der vorgelegten Arbeit allerdings erst zu einem relativ späten Zeitpunkt statt, nämlich 48 Stunden nach Beginn der Behandlung. Daher ist nicht auszuschließen, dass zu einem früheren Zeitpunkt eine gewisse Apoptoseinduktion stattfindet. Dass keine verstärkte Caspase-Aktivität nachweisbar war, könnte dann darauf beruhen, dass die Caspasen zu diesem Zeitpunkt bereits gehemmt wurden. Wie bereits erwähnt, konnte an anderer Stelle in Cisplatin-basierten Versuchen eine Hemmung der Caspasen nach maximal 24 Stunden gezeigt werden (Schweyer et al. 2004). Allerdings ist bisher nicht bekannt, dass solche Effekte ebenfalls nach einer Behandlung mit Sunitinib auftreten. Um dies sicher auszuschließen, wären weitere Messungen zu einem früheren Behandlungszeitpunkt durchzuführen.

### 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirksamkeit des Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf Keimzelltumoren (KZT) zu testen. Alle Untersuchungen wurden anhand von *in vitro* Versuchen sowohl an den Cisplatin-sensitiven KZT-Linien NT2, 2102EP und NCCIT als auch an den Cisplatin-resistenten Sublinien NT2-R, 2102EP-R und NCCIT-R durchgeführt.

Untersucht wurde zunächst die zytotoxische Wirkung von Sunitinib auf KZT-Linien. Dazu wurde mittels Zellzählungen und MTT-Messungen die  $IC_{50}$ -Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse der MTT Messungen lagen zwischen 3 und  $3,8\mu\text{M}$ , die der Zellzählung zwischen 5 und  $10\mu\text{M}$ . Die Inkongruenz der Ergebnisse ist wahrscheinlich auf die in der Literatur bereits mehrfach beschriebene Ungenauigkeit der Trypanblau-Methode und damit der Zellzählungsmethode zurückzuführen. Selbst wenn man jedoch die  $IC_{50}$ -Werte der MTT-Messungen als korrekt annimmt, liegen diese noch deutlich höher als es zur Hemmung der einzelnen Rezeptor-Tyrosinkinasen wie beispielsweise VEGF-R notwendig wäre. Bei den ermittelten Konzentrationen zeigten aber alle KZT-Linien ein gutes Ansprechen auf Sunitinib. Auch die Cisplatin-resistenten Zelllinien sprachen gut auf die Behandlung an, womit eine Kreuzresistenz zwischen Sunitinib und Cisplatin ausgeschlossen werden konnte. Da im Rahmen der Zellversuche auffiel, dass die Höhe der  $IC_{50}$  mit der Zellzahl korrelierte, wurde dieser Effekt genauer untersucht. Mittels Zellzählungen und MTT-Messungen wurde festgestellt, dass die gleiche Konzentration an Sunitinib bei einer niedrigen Zelldichte eine höhere Toxizität aufweist als bei dicht gesäten Zellen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Höhe der  $IC_{50}$  positiv mit der Anzahl ausgesäter Zellen korreliert. Beide verhalten sich proportional zueinander. Zudem wurde ein nahezu kompletter indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen der  $IC_{50}$  und dem durchschnittlich jeder Zelle zur Verfügung stehenden Platz festgestellt.

Des Weiteren wurde die Kombinationstherapie von Sunitinib und Cisplatin, dem Standardmedikament der Therapie von KZT, untersucht. Dazu wurden die jeweiligen  $IC_{10}$ -,  $IC_{25}$ - und  $IC_{50}$ -Konzentrationen beider Medikamente kombiniert und mit den Effekten verglichen, die sich unter einer Monotherapie mit Sunitinib ergaben. Ausgewertet wurden diese Ergebnisse ebenfalls anhand von Zytotoxizitätsassays und Zellzählungen viabler Zellen nach Behandlung. Hier zeigte sich in der Kombinationstherapie eine verstärkte Abnahme viabler Zellen, vor allem bei den Cisplatin-sensitiven Zelllinien. Zu einem geringeren Teil konnte dies auch bei den

Cisplatin-resistenten Zellen beobachtet werden. Weiterer Gegenstand dieser Arbeit stellte die Analyse der Wirkung von Sunitinib auf pMEK und pERK dar. Hier wurde nach einer 48-stündigen Behandlungsdauer der KZT-Linien mittels Western Blot untersucht, ob sich die Expression von MEK und ERK bzw. pMEK und pERK verändert. Es zeigte sich, dass die pERK-Konzentration in den Zelllinien NT2, 2102EP sowie 2102EP-R gehemmt wurde. In den Zelllinien NT2-R, NCCIT sowie NCCIT-R wurde kein eindeutiger Effekt beobachtet. Ebenfalls war bei pMEK und ERK keine Wirkung zu erkennen. MEK hingegen zeigte bei allen mit Sunitinib behandelten Zellen eine Abnahme der Expressionsstärke.

Mittels der Western Blot Methode wurden außerdem die beiden Apoptosemarker Caspase-3 und PARP auf erhöhte Aktivierung bzw. Spaltung untersucht. In den über 48 Stunden mit Sunitinib behandelten Zellen konnte jedoch keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden. Zusätzlich wurde die Caspase-3-Aktivität auch mittels FACS-Analyse untersucht. Auch hier konnte kein Unterschied beobachtet werden. Außerdem erfolgte nach 48-stündiger Behandlungsdauer eine Zellzyklusanalyse unter Einfluss von Sunitinib mittels FACS. Hier zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Sunitinib bei Patienten mit Cisplatin-resistenten KZT als Therapiemöglichkeit in Betracht kommt, da sich bei Konzentrationen zwischen 3 $\mu$ M und 10 $\mu$ M sowohl bei den Cisplatin-sensitiven als auch bei den -resistenten Zelllinien ein gutes Ansprechen zeigte und keine Kreuzresistenz bestand. Erste klinische Studien hierzu wurden bereits durchgeführt, wobei z.B. Oechsle, Honecker et al. bei 33 Patienten ein allerdings nur moderates Ansprechen auf Sunitinib zeigen konnten. Da die Monosubstanz demnach eine nicht allzu effektive Behandlungsstrategie darstellt, könnte sowohl einer Kombinationsbehandlung von Sunitinib mit Cisplatin als auch einer Kombination von Sunitinib mit einem anderen zielgerichteten Medikament, beispielsweise einem MEK-Inhibitor, klinische Bedeutung zukommen.

Ebenfalls von klinischem Interesse könnte die positive Korrelation der IC<sub>50</sub> mit der vorhandenen Zellzahl sein. Um zu überprüfen, ob dieser *in vitro* beobachtete Effekt ebenfalls *in vivo* auftritt, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Des Weiteren lassen die Untersuchungen auf proteinchemischer Ebene darauf schließen, dass Sunitinib über die Herabregulierung von pERK im Ras-/Raf-Signalweg wirkt, ohne dass dabei eine relevante Apoptoseinduktion im klassischen Sinne erfolgt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDDP	Cis-Diaminodichloroplatin (Cisplatin)
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EC	embryonal carcinoma (Embryonalkarzinom)
et al.	et altera (und andere)
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure
IC	inhibitorische Konzentration
KZT	Keimzelltumor
l	Liter
log-	Logarithmische- oder Exponential-
M	molar
m	milli-; -meter
μ	mikro-
mAb	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
MilliQ	Reinstwasser
min	Minute(n)
mol	Mol
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid; Natronlauge
NSCGT	Nonseminomatous germ cell tumor
pAb	polyklonaler Antikörper
PEB	Cisplatin (P), Etoposid (E), Bleomycin (B): Standard-Chemotherapieschema
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF-R	Platelet derived Growth Factor Receptor
PGC	primordial germ cell (Urkeimzelle)
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonucleic acid

## Abkürzungsverzeichnis

---

rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SU	Sunitinib
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tem	Temsirolimus
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
WB	Western Blot
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

### 7 Literaturverzeichnis

Abrams, T.J., Lee, L.B., Murray, L.J., Pryer, N.K., Cherrington, J.M. (2003). SU 11248 Inhibits KIT and Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\beta$  in Preclinical Models of Human Small Cell Lung Cancer. *Mol Canc Therapeut*, Vol. 2, 471-478.

Allegrucci, C., Young, L.E. (2006). Differences in human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update*, Vol. 13, No 2, 103-120.

Altman, S. (1993). Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. *Biotechnol Progr*, Vol.9, 671-674.

Arioka, H., Nishio, K., Ishida, T., Fukumoto, H., Fukuoka, K., Nomoto, T. (1999). Enhancement of cisplatin sensitivity in high mobility group 2 cDNA transfected human lung cancer cells. *Jpn J Canc Res*, Vol. 90, No. 1, 108-115.

Becker, K. (2005). Genomweite Analyse der Expression von Rezeptor-Tyrosinkinase bei der akuten myeloischen Leukämie. Medizinische Dissertation, Münster. Online im Internet: [http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=974885002&dok\\_var=d1&dok\\_ext=pdf&file name=974885002.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=974885002&dok_var=d1&dok_ext=pdf&file name=974885002.pdf) (Stand 13.07.2010).

Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S., Hunter, T. (2000). Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet*, Vol. 24, No. 2, 157-162.

Bokemeyer, C., Oechsle, K., Honecker, F., Mayer, F., Hartmann, J.T., Waller, C.F., Böhlke, I., Kollmannsberger, C. (2008). Combination chemotherapy with gemcitabine, oxaliplatin, and paclitaxel in patients with cisplatinrefractory of multiply relapsed germ-cell tumors: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *Ann Oncol*, Vol. 19, 448-453.

Brandl, S. (2008). Akute Behandlungsstrategie bei Gastrointestinalen Strumatumoren. Behandlungspfad, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg. Online im Internet: [www.uke.de/kliniken/medizinische-klinik-2/.../Brandl\\_GIST.pdf](http://www.uke.de/kliniken/medizinische-klinik-2/.../Brandl_GIST.pdf) (Stand: 02.08.2010).

Calero, R., Serrano, R., Avendano, L., Poblet, E., Ocana, A. (2010). Activity of the multi-tyrosine kinase inhibitor sunitinib in neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol*, Vol. 28, No. 15. Online im Internet: [http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15\\_suppl/e13640](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15_suppl/e13640) (Stand: 28.06.2010).

Castillo-Avila, W., Piulats, J.M., Garcia del Muro, X., Vidal, A., Condom, E., Casanovas, O., Mora, J., Germa, J.R., Capella, G., Villanueva, A., Vinals, F. (2009). Sunitinib Inhibits Tumor Growth and Synergizes with Cisplatin in Orthopic Models of Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Human Testicular Germ Cell Tumors. *Clin Cancer Res*, Vol. 15, No. 10, 3384-3395.

Chow, L.Q.M., Eckhardt, S.G. (2007). Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J Clin Oncol*, Vol. 25, No. 7, 884-896.

- De Jong, J., Stoop, H., Dohle, G.R., Bangma, C.H., Kliffen, M., van Esser, J.W., van den Bent, M., Kros, J.M., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H. (2005). Diagnostic value of OCT 3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol*, Vol. 206, 242-249.
- Ebbing, J., Christoph, F., Kempkensteffen, C., Weikert, S., Schostak, M., Hinz, S., Lein, M., Miller, K., Schrader, M. (2008). Testikuläre Keimzelltumoren – Erklärungsmodelle für die hohe Ansprechrate auf Cisplatin-basierte Chemotherapien und neue Therapieoptionen. *Aktuelle Urol*, Vol. 39, 429-435.
- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., Kerbel, R.S. (2007). Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am*, Vol. 104, No. 43, 17069-17074.
- Ehlers, C. (2010). Medulläres Schilddrüsenkarzinom. Online im Internet: <http://www.genetik-dresden.de/node/87> (Stand: 31.07.2010).
- Ehrenfels, Y. (2000). Mutationen in den „fibroblast growth factor“ (FGF) – Rezeptorgenen FGFR 1, 2 und 3 bei primären Craniosynostosen. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen. Online im Internet: [geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/290/pdf/d000092.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/290/pdf/d000092.pdf) (Stand 14.07.2010).
- Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.P., Scigalla, P., Raymond, E. (2006). Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*, Vol. 24, 25-35.
- Falkenhain, A., Behrendt, U., Lehma, J., Lorenz, Th. (1998). Dead cell estimation – a comparison of different methods. *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology*, 15th ESACT Meeting, Kluwer Academic Publishers, 333–336.
- Fedi, P., Kimmelman, A., Aaronson, S.A. (2000). Growth Factor Signal Transduction in Cancer. *Cancer Medicine*, Vol. 5. Online im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&part=A471> (Stand 22.07.2010).
- Feldman, D.R., Turkula, S., Ginsberg, M.S., Ishill, N., Patil, S., Carousso, M., Bosl, G.J., Motzer, R.J. (2010). Phase II trials of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Investig New Drugs*, Vol. 28, 523-528.
- Fenner, M.H. , Beutel, G., Grünwald, V. (2008). Targeted therapies for patients with germ cell tumors. *Expert Opin Investig Drugs*, Vol. 17, No. 4, 511-522.
- Fenton, M.S., Marion, K.M., Salem, A.K., Hogen, R., Naeim, F., Hershman, J.M. (2010). Sunitinib Inhibits MEK/ERK and SAPK/JNK Pathways and Increases Sodium/Iodide Symporter Expression in Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid*, Online im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629553> (Stand: 30.08.2010).

Fischer, C., Oberneder, R. (2008). Nierenzellkarzinom. In: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien, Deutsche Krebsgesellschaft (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag, 103-112.

Fung, M.K.L., Cheung, H.-W., Ling, M.-T., Cheung, A.L.M., Wong, Y.-C., Wang, X. (2006). Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Canc*, Vol. 95, 475-484.

Fry A.M., Chresta C.M., Davies S.M., Walker M.C., Harris A.L., Hartley J.A., Masters J.R., Hickson I. D. (1991). Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res*, Vol. 51, 6592-6595.

Gläser, S. (2010), Vergleichende globale Proteomanalyse zur Identifizierung von Mechanismen der Chemotherapieresistenz in Keimzelltumoren. Naturwissenschaftliche Dissertation, Hamburg. Online im Internet: <http://www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2010/4659/> (Stand: 10.07.2010).

Gosepath, E.M. (2005). Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen: Identifizierung neuer Kandidatengene und Evaluierung der Rolle von DKK1. Naturwissenschaftliche Dissertation, Bonn. Online im Internet: <http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=98633281x> (Stand: 04.07.2010).

Gu, Y., Zhao, W., Meng, F., Qu, B., Zhu, X., Sun, Y., Shu, Y., Xu, Q. (2010). Sunitinib impairs the proliferation and function of human peripheral T cell and prevents T-cell-mediated immune response in mice. *Clin Immunol*, Vol. 135, No. 1, 55-62.

Gschwend, J., Schulte, C. (2005). Keimzelltumor des Mannes – Hodenkarzinom. Uniklinik Ulm. Allgemeine Patienteninformation. Online im Internet: <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/keimzelltumor.html> (Stand 19.06.2010).

Holzer, A.K., Samimi, G., Katano, K., Naerdemann, W., Lin, X., Safaei, R. (2004). The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol*, Vol. 66, No. 4, 817-823.

Honecker, F., Oosterhuis, J.W., Mayer, F., Hartmann, J.T., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H.J. (2004a). New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. *World J Urol*, Vol. 22, 15-24.

Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R.R., Chris Lau, Y.F., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H. (2004b). Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol*, Vol. 203, No. 3, 849-857.

Honecker, F., Stoop, H., Mayer, F., Bokemeyer, C., Castrillon, D.H., Lau, Y.-F.C., Looijenga, L.H., Oosterhuis, J.W. (2006). Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. *J Pathol*, Vol. 208, 395-400.

Honecker, F., Oechsle, K., Bub, J., Hartmann, M., Mayer, F., Bokemeyer, C. (2008). Refraktäre Keimzelltumoren, Biologie und Behandlungskonzepte. *Onkologe*, Vol. 14, 575-580.

Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A.J., Stoop, H., van Gurp, R.J., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J.T., Dinjens, W.N. (2009). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol.*, Vol. 27, 2129-2136.

Honecker, F., Souchon, R., Krege, S., Bokemeyer, C. (2010). Therapie von Hodentumoren, Stadienspezifisch und leitliniengerecht behandeln. *Best Practice Onkologie*, Vol. 5, No. 1, 3-14.

Huang, D., Ding, Y., Li, Y., Luo, W.-H., Zhang, Z.-F., Snider, J., VandenBeldt, K., Quian, C.-N., Teh, B.T. (2009). Sunitinib Acts Primarily on Tumor Endothelium rather than Tumor Cells to Inhibit the Growth of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*, Vol. 70, 1063-1071.

Hui E.P., Lui, V.W., Wong, C.S., Ma, B.B., Lau, C.P., Cheung, C.S., Ho, K., Cheng, S.H., Ng, M.H., Chan, A.T. (2010). Preclinical evaluation of sunitinib as single agent or in combination with chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Investig New Drugs*. Online im Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467883> (Stand: 14.08.2010).

Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Yang, Y., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H.P., Taguchi, H. (2006). The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther*, Vol. 5, No. 10, 2522-2530.

Johnke, M. (2007). Hodentumor. Bundeswehrkrankenhaus Hamburg. Allgemeine Patienteninformation. Online im Internet: [http://www.bundeswehrkrankenhaus-hamburg.de/portal/a/hamburg/kcxml/04\\_Sj9SPykssy0xPLMnMz0vM0Y\\_QjzKLN\\_SN d3MyAslB2Ba--pFw0aCUVH1fj\\_zcVH1v\\_QD9gtylckdHRUUAgrAAWw!!/delta/Base 64xml/L2dJQSEvUUt3QS80SVVFLzZfMU1fTkUx?yw\\_contentURL=/01DB08100000 0001/W27A4BWX074INFODE/content.jsp](http://www.bundeswehrkrankenhaus-hamburg.de/portal/a/hamburg/kcxml/04_Sj9SPykssy0xPLMnMz0vM0Y_QjzKLN_SN d3MyAslB2Ba--pFw0aCUVH1fj_zcVH1v_QD9gtylckdHRUUAgrAAWw!!/delta/Base 64xml/L2dJQSEvUUt3QS80SVVFLzZfMU1fTkUx?yw_contentURL=/01DB08100000 0001/W27A4BWX074INFODE/content.jsp) (Stand: 21.06.2010).

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (2002). *Histologie*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 376-388.

Kartalou M., Samson L.D., Essigmann J.M. (2000). Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry*, Vol. 39, No. 27, 8032-8038.

Kartalou, M., Essigmann, J.M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res*, Vol. 478, No. 1, 1-21.

King, A.J., Patrick, D.R., Batorsky, R.S., Ho, M.L., Do, H.T., Zhang, S.Y., Kumar, R., Rusnak, D.W., Takle, A.K., Wilson, D.M., Hugger, E., Wang, L., Karreth, F., Loughheed, J.C., Lee, J., Chau, D., Stout, T.J., May, E.W., Rominger, C.M., Schaber, M.D., Luo, L., Lakdawala, A.S., Adams, J.L., Contractor, R.G., Smalley, K.S.M., Herlyn, M., Morrissey, M.M., Tuveson, D.A., Huang, P.S. (2006). Demonstration of a Genetic Therapeutic Index for Tumors Expressing Oncogenic BRAF by the Kinase Inhibitor SB-590885. *Cancer Res*, Vol. 66, No. 23, 11100-11105.

- Konanz, C. (2008). Wirkung des Tyrosinkinase Inhibitors Sunitinib und des mTOR Inhibitors Rapamycin auf die Proliferation und Apoptose von Ewing-Sarkom-Zellen *in vitro*. Medizinische Dissertation, Freiburg. Online im Internet: <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/6218/> (Stand: 03.08.2010).
- Konieczny, A. (2003). Bedeutung der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit in der Pathogenese der Philadelphiatranslokation Bcr-Abl positiven, chronischen myeloischen Leukämie. Medizinische Dissertation, München. Online im Internet: [edoc.ub.uni-muenchen.de/1562/1/Konieczny\\_Andreas.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/1562/1/Konieczny_Andreas.pdf) (Stand: 22.07.2010).
- Koolman, J., Röhm, K.H. (2003). Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 384-389, 392-393.
- Larsen, W.J. (2001). Human Embryology. 3. Auflage, Churchill Livingstone, Philadelphia. 3-11, 276-284.
- Ljungberg, B., Hanbury, D.C., Kuczyk, M., Merseburger, A.S., Mulders, P., Patard, J., Sinescu, I.C. (2007). Urology Guideline Group for renal cell carcinoma. Renal cell carcinoma guideline. Eur Urol, Vol. 51, No. 6, 1502-1510.
- Looijenga, L.H., Zafarana, G., Grygalewicz, B., Summersgill, B., Debiec-Rychter, M., Veltman, J., Schoenmakers, E.F., Rodriguez, S., Jafer, O., Clark, J., van Kessel, A.G., Shipley, J., van Gorp, R.J., Gillis, A.J., Oosterhuis, J.W. (2003). Role of gain of 12p in germ cell tumour development. APMIS Vol. 111, 161-71.
- Manski, D. (2010). Urologielehrbuch. Online im Internet: <http://www.urologielehrbuch.de/hodentumoren.html> (Stand: 09.06.2010).
- Mayer F., Gillis A.J., Dinjens W., Oosterhuis J.W., Bokemeyer C., Looijenga L.H. (2002). Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. Cancer Res, Vol. 62, 2758-2760.
- Middel, P. (2008). Pathologie und Prognosefaktoren bei Hodentumoren. Allgemeine Information Online im Internet: <http://www.pathologie-nordhessen.de/Downloads/files/Vortraege/Middel/Pathologie%20Hodentumore.pdf> (Stand: 13.07.2010).
- Müller-Tidow, C., Krug, U., Brunneberg, U., Berdel, W.E., Serve, H. (2007). Tyrosinkinasen als Ziele neuer onkologischer Therapien. Dtsch Arztebl, Vol. 104, No. 19, 1312-1319.
- Mueller, T., Voigt, W., Simon, H., Fruehauf, A., Bulankin, A., Grothey, A., Schmall, H.J. (2003). Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. Cancer Res, Vol. 63, 513-521.
- Müller, T. (2005). Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors. Naturwissenschaftliche Dissertation, Halle. Online im Internet: [http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/06H016/of\\_index.htm](http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/06H016/of_index.htm) (Stand: 11.07.2010).

Nishioka, C., Takayuki, I., Yang, J., Takeshita, A., Taniguchi, A., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H.P., Yokoyama, A. (2008). Blockade of MEK/ERK signalling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk Res*, Vol. 32, No. 6, 865-872.

Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, Vol. 24, 372-376.

Oosterhuis, J.W., Andrews, P.W., Knowles, B.B., Damjanov, I. (1984). Effects of cisplatin on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int J Canc*, Vol. 34, 133-139.

Ottesen A.M., Skakkebaek, N.E., Lundsteen, C., Leffers, H., Larsen, J., Rajpert-De Meyts, E. (2003). High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Gene Chromosome Canc*, Vol. 38, 117-125.

Perez, R.P. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer*, Vol. 34, No. 10, 1535-1542.

Pesce, M., Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, Vol. 19, 271-278.

Peterson-Roth, E., Brdlik, C.M., Glazer, P.M. (2009). Src-Induced Cisplatin Resistance Mediated by Cell-to-Cell. *Cancer Res*, Vol. 69, No. 8, 3619-3624.

Pfizer (Hrsg.) (2007). Fachinformation Sutent. Karlsruhe.

Potapova, O., Laird, A.D., Nannini, M.A., Barone, A., Li, G., Moss, K.G., Cherrington, J. M., Mendel, D.B. (2006). Contribution of individual targets to the antitumor efficacy of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor SU 11248. *Mol Cancer Ther*, Vol. 5, 1280-1289.

Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, Vol. 4, No. 3, 138-144.

Rajpert-De Meyts, E., Hanstein, R., Jorgensen, N., Graem, N., Vogt, P.H., Skakkebaek, N.E. (2004). Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod*, Vol. 19, 1338-1344.

Reed, E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anticancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, Vol. 24, 331-344.

Reindl, C. (2007). Aberrante Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase FLT3 in der akuten myeloischen Leukämie. Medizinische Dissertation, München. Online im Internet: [edoc.ub.uni-muenchen.de/6445/1/Reindl\\_Carola.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6445/1/Reindl_Carola.pdf) (Stand: 09.08.2010).

Riede, U.N., Schaefer, H.E. (2001). Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 904-910.

Robinson, D.R., Wu, Y.-M., Lin, S.-F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, Vol. 19, 5548-5557.

Rosenberg, C., van Gurp, R.J., Geelen, E., Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H. (2000). Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene*, Vol. 19, 5858-5862.

Roskoski, R.Jr. (2007). Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Comm*, Vol. 356, 323-328.

Samimi, G., Katano, K., Holzer, A.K., Safaei, R., Howell, S.B. (2004). Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol*, Vol. 66, No. 1, 25-32.

Sadler, T.W., Langman, J. (2003). *Medizinische Embryologie – Die Normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Schärfe, J. (2003). Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau Assay. *Biospektrum*, Vol. 3, 334-336.

Schmelz, H.U., Sparwasser, C., Weidner, W. (2006). *Facharztwissen Urologie, Differenzierte Diagnostik und Therapie*, 1. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 258-286.

Schmidinger, M., Loidl, W. (2007). Arzneimittelprofil Sunitinib, *Medizin Medien Austria*, Wien.

Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K. (Hrsg.) (2005). *Kompendium Internistische Onkologie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

Schöni-Affolter, F., Dubuis-Grieder, C., Strauch, E. (1999). Die Keimbahn – Ursprung der Keimzellen. Allgemeine Information. *Swiss Virtual Campus / Embryology.ch*. Online im Internet: <http://www.embryology.ch/allemand/cgametogen/keimbahn01.html> (Stand: 29.06.2010).

Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H.J., Fayyazi, A. (2004). Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer*, Vol. 91, 589-598.

Schweyer, S., Fayyazi, A. (2005). Pathogenese maligner Keimzelltumoren des Hodens. *Dtsch Arztebl*, Vol. 36, No. 102, 2404–2407.

Singh, V., Singh, S.M. (2007). Effect of high cell density on the growth properties of tumor cells: a role in tumor cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 18, 1123-1132.

Sonpavde, G., Jian, W., Liu, H., Wu, M.-F., Shen, S.S., Lerner, S.P. (2009). Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. *Urol Oncol*, Vol. 27, 391-399

Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., Thomson, J. A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 100, 13350-13355.

Stein, M.N., Flaherty, K.T. (2007). Sorafenib and Sunitinib in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, Vol. 13, 3765-3770.

Stockinger, M. (2007). Genexpressionsuntersuchungen in Seminomen und Nichtseminomen. Medizinische Dissertation, Gießen. Online im Internet: [http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=989690962&dok\\_var=d1&dok\\_ext=pdf&filename=989690962.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=989690962&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=989690962.pdf) (Stand 17.07.2010).

Stojic, L., Brun, R., Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair. Amst*, Vol. 3, No. 8, 1091-1101.

Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2003). *Biochemie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 449-456.

Suddek, G.M. (2010). Sunitinib improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental animals. *Cancer Chemother Pharmacol*, online im Internet: <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1402-1> (Stand: 23.07.2010).

Topaly, J., Zeller, W.J., Fruehauf, S. (2001). Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia*, Vol. 15, 342-347.

Wang, D., Hara, R., Singh, G., Sancar, A., Lippard, S.J. (2003). Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes. *Biochemistry*, Vol. 42, No. 22, 6747-6753.

Weiland, F. (2010): Hodenkrebs: Definition. Online im Internet: <http://www.onmeda.de/krankheiten/hodenkrebs-definition-1460-2.html> (Stand: 28.06.2010).

Wylie, C. (1999). Germ cells. *Cell*, Vol. 96, 165-174.

Xin, H., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., Yu, H. (2009). Sunitinib Inhibition of Stat3 Induces Renal Cell Carcinoma Tumor Cell Apoptosis and Reduces Immunosuppressive Cells. *Cancer Res*, Vol. 69, No. 6, 2506-2513.

### 8 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in dem Labor für Experimentelle Onkologie unter der Leitung von PD Dr. Dr. med. Friedemann Honecker und Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer in der II. Medizinischen Klinik des Onkologischen Zentrums des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg angefertigt. Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die beim Zustandekommen dieser Arbeit geholfen haben.

Besonders danken möchte ich vor allem PD Dr. Dr. med. Friedemann Honecker für die schnelle Bereitstellung des interessanten Themas, die entsprechenden Voraussetzungen zur Bearbeitung und für die sehr gute und immer zuverlässige Betreuung. Vor allem danke ich für die ständige Ansprechbarkeit bei aufgetretenen Problemen, den äußerst netten und freundlichen Umgang und die gewährten Freiheiten sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Stephanie Gläserer für die unermüdliche und perfekte Anleitung sämtlicher praktischer Methoden. Außerdem bedanke ich mich für die durchgehende Unterstützung und die Hilfe beim Lösen aufgetretener Probleme sowie die ausgestrahlte Ruhe und Gelassenheit. Ohne Dich wäre ich einige Male verzweifelt. Danke auch für die lustigen gemeinsamen Stunden im Labor und etlichen interessanten und aufschlussreichen Gespräche.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem übrigen Laborteam, Tina Rohlfing und Juliane Pohl, denen ich für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima danken möchte.

Der Firma Pfizer danke ich für die großzügige Bereitstellung des Medikaments Sunitinib, das Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war.

Für den privaten Ausgleich und die moralische Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meinem Freund. Meinen Eltern danke ich ganz besonders für den zuverlässigen Rückhalt und die großzügige Entscheidungsfreiheit, meiner Schwester vor allem für die zahlreichen hilfreichen und aufbauenden Gespräche.

**9 Lebenslauf**

**10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....Katharina Hoch.....