

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Der Einfluss des Multityrosinkinaseinhibitors Sunitinib
auf die Proliferation und Steroidbiosynthese
von Nebennierenkarzinomzellen *in vitro***

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Miriam Reuter (geb. Reuß)
aus Kürnach**

Würzburg, Mai 2015

Referent: Professor Dr. med. Martin Faßnacht-Capeller

Korreferent: Professor Dr. med. Ralf Bargou

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07. März 2016

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Tyrosinkinaseinhibitoren	1
1.1.1 Tyrosinkinasen im Überblick.....	1
1.1.2 Tyrosinkinaseinhibitoren in der Krebstherapie.....	5
1.1.3 Sunitinib	7
1.2 Nebenniere	9
1.2.1 Adrenale Steroide und ihre Biosynthese	10
1.2.2 Nebennierenkarzinom	17
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.2 Zellkultur	23
2.2.1 NCI-h295-Zelllinien.....	23
2.2.2 SW-13-Zelllinie	25
2.3 Proliferationsstudien	25
2.3.1 Zellzählung	25
2.3.2 MTT-Tests.....	26
2.4 Hormonanalysen.....	27
2.4.1 Chemilumineszenz: Bestimmung von Cortisol und DHEA-S....	27
2.4.2 Radioimmunoassay: Bestimmung von 17-OH-Progesteron und Androstendion.....	28
2.4.3 Isotopenverdünnungs/Gaschromatographie-Massenspektrometrie: Steroidprofil.....	29
2.5 Transkriptionsanalysen	30
2.5.1 RNA-Extraktion.....	31
2.5.2 Umschreiben von mRNA in cDNA.....	31
2.5.3 Real-Time-PCR (RTq-PCR)	32
2.6 Proteinuntersuchungen.....	34
2.6.1 Proteinprobenaufbereitung.....	34
2.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.6.3 Proteintransfer „Western Blot“	36
2.6.4 Färbung mit spezifischen Antikörpern	36
2.7 Statistische Auswertung.....	37
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Wirkung von Sunitinib auf die Zellproliferation	38
3.1.1 Wachstumskurven	38
3.1.2 MTT-Tests.....	39

3.2 Wirkung von Sunitinib auf die Steroidogenese	41
3.2.1 Hormonanalysen nach vier Tagen Sunitinib-Behandlung.....	41
3.2.2 Hormonanalyse nach Stimulation mit Forskolin.....	44
3.2.3 Steroidprofil	45
3.3 Wirkung von Sunitinib auf Enzyme der Steroidogenese	51
3.3.1 Einfluss auf die 3 β -Hydrosteroiddehydrogenase	51
3.3.2 Einfluss auf weitere Enzyme der Steroidbiosynthese	53
4 Diskussion	55
4.1 Einfluss auf die Zellproliferation	55
4.2 Einfluss auf die Steroidbiosynthese	56
4.3 Mögliche Ursachen der beobachteten Veränderungen.....	60
4.4 Mögliche klinische Bedeutung	62
4.4.1 Sunitinib als Therapieoption beim Nebennierenkarzinom	62
4.4.2 Mögliche Nebenwirkung von Sunitinib in der Behandlung anderer Tumoren	66
4.5 Limitierungen der Arbeit.....	70
5 Zusammenfassung	72
6 Literaturverzeichnis	74

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
NSCLC	Nicht-kleinzelliges-Bronchialkarzinom
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
PDGF(R)	Platelet-derived Growth Factor (Receptor)
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
SCF	Stem Cell Factor
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3 Receptor
CSF-1(R)	Colony Stimulating Factor 1 (Receptor)
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF1R	Insulin-like Growth Factor Receptor Type 1
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FCS	Fetales Kälberserum
RIA	Radioimmunoassay
ID/GC-MS	Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
SF-1	Steroidogenic factor 1

Steroidhormone:

Abkürzung	Bedeutung
DHEA(-S)	Dehydroepiandrosteron(-sulfat)
17-OH-P	17-Hydroxyprogesteron
17-OH-Preg	17-Hydroxypregnenolon
T	Testosteron
DHT	Dihydrotestosteron

Enzyme der Steroidbiosynthese:

Gencode	P450	Synonym
<i>CYP11A1</i>	P450 _{scc}	Cholesterol-(20,17)-Desmolase
<i>CYP11B1</i>	P450-11 β	11 β -Hydroxylase
<i>CYP11B2</i>	P450 _{c18}	Aldosteronsynthase, Corticosteronmethyloxidase, Aldosteron synthetisierendes Enzym
<i>CYP17</i>	P450 _{c17}	17 α -Hydroxylase/17,20-lyase
<i>CYP21B</i>	P450 _{c21}	21-Hydroxylase
<i>HSD3B2</i>		3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase, 3 β -Hydroxy-5-ene-Steroiddehydrogenase 2
<i>HSD17B</i>		17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
<i>SULT2A1</i>		DHEA-Sulfotransferase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Sunitinib: N-[2-(Diethylamino)ethyl]-5-[(Z)- (5-fluor-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidin)methyl] -2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-carboxamid.....	7
Abbildung 2: Übersicht über die adrenale Steroidsynthese, modifiziert nach [51]	10
Abbildung 3: Halbschematische Darstellung der Cortisolsynthese in einer Nebennierenrindenzelle	12
Abbildung 4: Strukturformel des Mineralokortikoids Aldosteron	14
Abbildung 5: Strukturformel des Glukokortikoids Cortisol.....	15
Abbildung 6: Strukturformel des Androgens DHEA	16
Abbildung 7: Mitotane: 1-chloro-2-(2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)-ethyl)-benzene	19
Abbildung 8: Ausschnitt aus der Steroidbiosynthese.....	58
Diagramm 1: Wachstumskurven von NCI-h295-Zellen unter Sunitinib.....	38
Diagramm 2: MTT-Tests nach Inkubation mit Sunitinib.....	40
Diagramm 3: Hormonbestimmungen nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib.....	42
Diagramm 4: Cortisol- und DHEA-S Konzentration normiert auf die Zellzahl ...	43
Diagramm 5: Steroidprofil von NCI-h295-Zellen nach drei Tagen Inkubation mit Sunitinib und Stimulation mit Forskolin (FSK)	46
Diagramm 6: Steroidprofil nach zwei Tagen Inkubation mit Sunitinib.....	48
Diagramm 7: Steroidprofil nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib	49
Diagramm 8: Veränderungen der Hormonquotienten nach Inkubation mit Sunitinib	50
Diagramm 9: RTq-PCR HSD3B nach Inkubation mit Sunitinib.....	51
Diagramm 10: Western Blot HSD3B nach 24 Stunden Inkubation mit Sunitinib	52
Diagramm 11: RTq-PCR CYP11B1 nach 24 Stunden Inkubation mit Sunitinib	53

1 Einleitung

Das Nebennierenkarzinom ist ein seltener, aggressiver Tumor, der oft erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert wird. Die bisherigen Therapiemöglichkeiten (Mitotane, Chemotherapien) zeigen nur sehr begrenzte Erfolge, so dass neue Therapiestrategien dringend erforderlich sind. Im Verlauf wird dies noch näher ausgeführt.

In der Onkologie werden in den vergangenen Jahren zunehmend Tyrosinkinasehemmer eingesetzt, da Tyrosinasen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und damit auch beim Tumorwachstum spielen. Sunitinib, einer dieser Tyrosinkinaseinhibitoren, zeigte in Tierversuchen eine adrenotoxische Wirkung und ist daher als mögliche Therapieoption beim Nebennierenkarzinom besonders interessant. Die Effekte von Sunitinib auf die Proliferation von Nebennierenkarzinom-Zellen und auf die Steroidbiosynthese in der Nebenniere sollen in der vorliegenden Arbeit unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten *in vitro* untersucht werden.

1.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Seit einigen Jahren findet ein Wandel in der onkologischen Therapie statt. Vor allem sogenannte „small molecules“ geraten in den Fokus und erfahren eine immer größere Bedeutung in der Therapie maligner Erkrankungen. Zu den wichtigsten Zielstrukturen dieser „targeted therapies“ zählen dabei verschiedene Tyrosinasen, die eine große Rolle bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung und damit auch bei Tumorwachstum und Metastasierung spielen [1-2].

1.1.1 Tyrosinasen im Überblick

Tyrosinasen sind Enzyme, die die γ -Phosphatübertragung von Adenosintriphosphat (ATP) auf Tyrosinreste verschiedener Proteine

katalysieren. Mittlerweile sind 90 Tyrosinkinasegene bekannt, die in zwei Hauptklassen unterteilt werden können [3]: 58 Rezeptortyrosinkinasen und 32 Nichtrezeptortyrosinkinasen.

Rezeptortyrosinkinasen sind an der Zellmembran lokalisiert. Sie sind wichtige Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z. B. EGF (Epidermal Growth Factor) oder VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Viele Zellprozesse wie Zellzyklus, Proliferation, Zelldifferenzierung, Motilität oder Apoptose werden über Rezeptortyrosinkinasen geregelt. Sie bestehen aus drei Domänen: extrazellulär (mit Ligandenbindungsstelle), transmembranär und intrazellulär (mit ATP-Bindungsstelle). In der inaktiven Form, also wenn kein Ligand gebunden ist, liegen Rezeptortyrosinkinasen unphosphoryliert und als Monomer vor. Um die Signalkaskade zu starten, bindet der Ligand an der extrazellulären Domäne und verursacht eine Dimerisation mit einer gleichen oder ähnlichen Rezeptorkinase. Das Dimer wird autophosphoryliert und aktiviert so die intrazelluläre Tyrosinkinase, die ihrerseits verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle initiiert [1, 3].

Nichtrezeptortyrosinkinasen unterscheiden sich von den Rezeptortyrosinkinasen dadurch, dass sie intrazellulär liegen und keine transmembranäre Domäne aufweisen. Sie werden durch intrazelluläre Signale aktiviert. Ein typischer Vertreter ist c-ABL.

Tyrosinkinasen sind in sämtlichen Zellen aktiv und werden streng reguliert. In nichtproliferativen Zellen findet man nur einzelne phosphorylierte Tyrosinreste an Proteinen. Bei proliferierenden Zellen, zu denen sämtliche Tumorentitäten zählen, spielen aktivierte Tyrosinkinasen dagegen eine wichtige Rolle im Wachstumsprozess. Bei autonomem Tumorstadium finden sich oft Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen oder eine Abschwächung der negativen Feedback-Kontrolle [2].

Auf einige Rezeptortyrosinkinasen, die im Zusammenhang mit Sunitinib relevant sind, wird im Folgenden näher eingegangen.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Die Familie der EGF-Rezeptoren besteht aus vier transmembranären Rezeptoren: EGFR (Synonym erbB1, HER1), erbB2 (Her2/neu), erbB3 (Her3) und erbB4 (HER4). Wird der EGF-Rezeptor aktiviert, dann phosphoryliert er über Tyrosinkinasen verschiedene intrazelluläre Signalwegmoleküle und startet so Signaltransduktionskaskaden für zelluläre Funktionen wie Proliferation, Überleben, Beweglichkeit, Invasion und Fähigkeit zur Metastasierung. Zudem können EGFR-Signale weitere Tyrosinkinasen aktivieren, z. B. über Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Mutationen im EGFR, die zu einer kontinuierlichen Aktivierung und Überexpression des EGFR führen, sind bei vielen Tumorentitäten zu finden. Am bekanntesten ist die Überexpression von HER2/neu bei Mammakarzinomen und EGFR-Überexpression beim Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom [4-7].

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)

(Neo-)Angiogenese, also die Neubildung von Blutgefäßen, spielt bei der Tumorausbreitung und Metastasierung eine wichtige Rolle. Die VEGF-Familie gehört dabei zu den wichtigsten proangiogenetischen Signalmolekülen. Hauptvertreter und am besten untersucht ist VEGF-A (meist mit VEGF gleichgesetzt). Es induziert Proliferation, Aussprossen und Formation von Endothelzellen und hat auch antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen. Wie EGF wirkt auch VEGF über Bindung an verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen: VEGF Rezeptor 1 (VEGFR; FLT1), VEGF Rezeptor 2 (VEGFR2; FLK1/KDR) und VEGF Rezeptor 3 (VEGFR3; FLT4). VEGFR1 scheint neben proangiogenetischen Effekten auch die parakrine Freisetzung von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren zu induzieren. Der VEGFR2 ist der hauptverantwortliche Rezeptor für die durch VEGF vermittelte Angiogenese.

Der VEGF/VEGFR-Signalweg induziert Wachstum von Endothelzellen, Migration und Überleben. Im gesunden Organismus ist VEGF überall da notwendig, wo physiologisch eine Neubildung von Blutgefäßen gefordert ist: bei Wundheilung, Aufrechterhaltung des Blutdrucks, Ovulation, Menstruation und Schwangerschaft. Aber auch Tumorzellen nutzen diesen proangiogenetischen

Mechanismus: Sie produzieren VEGF, unterdrücken antiangiogenetische Mechanismen, induzieren so die Blutgefäßbildung und stellen ihre eigene Versorgung mit Sauerstoff und weiteren Nährstoffen sicher. VEGF wird in beinahe allen soliden menschlichen Tumoren exprimiert [8-10].

Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)

Eine weitere Rezeptortyrosinkinase ist der Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR). Nach Bindung des Liganden und Dimerisation induziert der PDGFR Stimulation oder Inhibition von Chemotaxis, mesenchymaler Proliferation, Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und zelluläre Myelinisierung. Die klassischen PDGF-Zielzellen sind Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Vor allem bei entzündlichen Vorgängen und bei Wundheilung werden in diesen Zellen die PDGF-Rezeptoren hochreguliert. Erhöhte PDGF-Aktivität ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, deren Ursache in einer vermehrten Fibrosierung liegt: Atherosklerose, Lungenfibrose, Leberzirrhose und glomeruläre Nierenerkrankungen. Direkten Einfluss hat PDGF auf die Entwicklung von Tumoren mesenchymalen Ursprungs, wie Sarkome oder Gastrointestinale Stromatumore (GIST). PDGFR stimuliert aber auch die Angiogenese. Einerseits exprimieren auch Endothelzellen PDGFR- β , andererseits aktiviert PDGF Perizyten, die zur Entwicklung und Stabilität von Kapillaren beitragen. So beeinflusst PDGFR auch indirekt das Tumorwachstum anderer Tumorentitäten [11].

Weitere Rezeptortyrosinkinasen

Zur Familie der Typ III Rezeptortyrosinkinasen, zu der auch der PDGFR gehört, zählen noch weitere Tyrosinkinasen, die spezielle Funktionen haben und in spezifischen Geweben exprimiert werden: KIT, FLT3 und CSF-1R.

Die Rezeptortyrosinkinase KIT ist der Rezeptor für den sogenannten Stammzellefaktor (SCF), der unter anderem wichtig ist für die Entwicklung von Melanozyten, Keimzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Aktivierende Mutationen in KIT können bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), akuten myeloischen Leukämien (AML) und systemischen Mastozytosen gefunden

werden, weshalb Tyrosinkinaseinhibitoren gegen diesen Rezeptor v. a. bei diesen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden [12].

Der FMS-like Tyrosine Kinase 3 Rezeptor (FLT3) wird auf unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist wichtig für die normale Entwicklung von Stammzellen und Immunsystem. Sobald die Zellen differenzieren, wird die Expression von FLT3 normalerweise eingestellt, FLT3 spielt so eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von akuten myeloischen Leukämien [13].

Eine weitere Familie der Rezeptortyrosinkinasen ist die Familie der Insulinrezeptoren. Als Beispiel hierfür ist der Rezeptor für Insulin-like Growth Factor (IGF) zu nennen. IGF und Insulin sind als Regulatoren von Stoffwechsel und Wachstumshormonen des Menschen wichtig. In den vergangenen Jahren wird ihnen aber auch immer mehr eine Bedeutung bei der Entwicklung von Neoplasien beigemessen [14]. Über den IGF1R wirken die beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II [15].

1.1.2 Tyrosinkinaseinhibitoren in der Krebstherapie

Da Tyrosinkinasen bei vielen malignen Erkrankungen überexprimiert oder überaktiviert sind, lässt sie das zu einer wichtigen Zielstruktur bei der Behandlung maligner Erkrankungen werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Tyrosinkinaseaktivität zu mindern: 1. Antikörper gegen den Liganden, 2. Antikörper gegen die Ligandenbindungsstelle, 3. Tyrosinkinaseinhibitoren („small molecules“), die an der intrazellulären katalytischen Einheit wirken [1-2].

Als erfolgreiche Beispiele der Antikörperstrategie sind hier der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Roche, zugelassen unter anderem bei Kolonkarzinomen in Kombination mit einer Chemotherapie als first-line-Therapie), der Her2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Roche, bei Mammakarzinomen mit Her2/neu-Überexpression) und der EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix®, Merck, unter anderem in Kombination mit Irinotecan bei Kolonkarzinomen) zu nennen.

Nachdem EGFR und andere Tyrosinkinasen als geeignete therapeutische Ziele erkannt wurden, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche „small molecules“ entwickelt. Als selektiver EGFR-Inhibitor wurde Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca) 2003 in den USA zur Behandlung des weit fortgeschrittenen Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) eingesetzt, später jedoch die Zulassung eingeschränkt, da kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden konnte [16]. Für NSCLC mit nachgewiesener aktivierender EGFR-Mutation ist es seit 2009 auch in Europa zugelassen. Im Laufe der Behandlung treten allerdings bei den meisten Patienten Resistenzen auf, so dass sich weitere EGFR-Inhibitoren der zweiten und bereits dritten Generation in unterschiedlichen Phasen der Erprobung befinden [17-18].

Als weitere Entwicklung in der Erfolgsgeschichte von Tyrosinkinaseinhibitoren ist Imatinib (Glivec®, Novartis) [19] zu nennen, ein Blocker der ABL-Tyrosinkinase, die bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) typischerweise durch die Translokation BCR-ABL (auch „Philadelphia-Chromosom“ genannt) aktiviert ist. Außerdem hemmt Imatinib auch Rezeptortyrosinkinasen wie PDGFR und KIT effektiv. Weil KIT v. a. bei GIST-Tumoren überexprimiert ist, wurde Imatinib bei diesen Tumoren erfolgreich getestet und gilt seitdem als Standardtherapie bei CML [20] und GIST. Allerdings sind auch bei GIST mittlerweile zunehmend Resistenzen zu beobachten [21], weshalb sich neuere Tyrosinkinaseinhibitoren in Entwicklung befinden [22].

Die Zahl der zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitoren und ihrer Indikationen steigt jährlich. 2015 sind bereits über 20 Substanzen in der EU zugelassen oder befinden sich im Zulassungsprozess (Homepage der European Medicines Agency EMA), z. B. Nilotinib (Tasigna®, Novartis, CML), Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers Skibb, Imatinib-resistente CML), Sorafenib (Nexavar®, Bayer, Nierenzellkarzinom und hepatozelluläres Karzinom), Lapatinib (Tyverb®, GlaxoSmithKline, Her2/neu-positives Mammakarzinom), Erlotinib (Tarceva®, Hoffmann-La Roche, NSCLC, Pankreaskarzinom) und Sunitinib (Sutent®, Pfizer, Nierenzellkarzinom, GIST, pankreatische Neuroendokrine Tumore). Sämtliche dieser Tyrosinkinaseinhibitoren sind oral verfügbar und dadurch für den Patienten einfach anzuwenden.

1.1.3 Sunitinib

Pfizer hat Sunitinib (Entwicklungsname SU11248) unter dem Namen Sutent® auf den Markt gebracht. 2006 wurde es in den USA und ein Jahr später in Europa zugelassen für das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom, Imatinib-resistente gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sowie 11/2011 für pankreatische Neuroendokrine Tumoren [23-26]. Sunitinib zählt zu den oral verfügbaren Multityrosinkinaseinhibitoren. Unter anderem hemmt Sunitinib die oben beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen VEGF1 und VEGF2, sowie die Familie der Typ III-Rezeptortyrosinkinasen PDGFR α , PDGFR β , KIT, FLT3, CSF-1 (Colony Stimulating Factor-1) und RET, einen Rezeptor der neuronalen Zellen [27]. Über die VEGF- und PDGF-Rezeptoren hat es so antiangiogenetische Eigenschaften, hemmt aber bei mehreren Tumorentitäten z. B. über KIT (bei GIST) und FLT3 (bei AML) direkt die Proliferation der Tumorzellen.

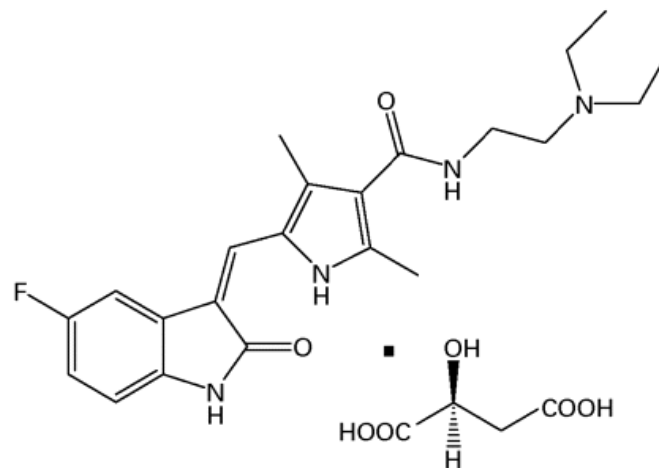


Abbildung 1: Strukturformel von Sunitinib: N-[2-(Diethylamino)ethyl]-5-[(Z)- (5-fluor-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidin)methyl] -2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-carboxamid

Beim metastasierten Nierenzellkarzinom konnte für Sunitinib im Vergleich zur bis dahin als Standardtherapie angesehenen Interferon-alpha-Therapie ein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden [28-29]. Auch in der verlängerten Beobachtungsphase bestätigte sich eine Verdoppelung des progressionsfreien Überlebens und eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei einer Ansprechrate von 47 % [30]. Mittlerweile gehört Sunitinib zu den empfohlenen medikamentösen Erstlinientherapien dieser Erkrankung [31].

Auch bei c-Kit positiven GIST, die eine Resistenz gegen Imatinib entwickelt haben, zeigten sich Erfolge [25, 32]. Seit 2011 ist Sunitinib auch in der Behandlung von pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren zugelassen, in einer Phase III-Studie konnte das mediane progressionsfreie Überleben von 5,5 Monaten (Placebo) auf 11,4 Monate mit Sunitinib verlängert werden, die Studie wurde aufgrund des deutlichen Behandlungsvorteils mit Sunitinib frühzeitig abgebrochen [26].

Bei zahlreichen weiteren Neoplasien wie zum Beispiel Mammakarzinom [33] und NSCLC [34-35] befindet sich Sunitinib noch in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung [36]. Nicht bei allen Entitäten konnte ein Ansprechen nachgewiesen werden, z. B. fand sich in der Monotherapie nur bei einem von 84 Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom ein klinisches Ansprechen [37].

Ein Einnahmeschema mit 50 mg Sunitinib täglich im sogenannten 4/2-Schema wurde in den initialen Studien weiterverfolgt. Dabei nehmen die Patienten vier Wochen täglich eine Dosis Sunitinib, gefolgt von einer zweiwöchigen Pause. So können nach zwei Wochen Plasmaspiegel von etwa 50 bis 100 ng/ml erreicht werden [38]. Alternativ werden auch kontinuierliche Dosierschemata mit Sunitinib 37,5 mg in Studien evaluiert. Erstmals wurde dieses Schema zugelassen zur Behandlung von pankreatischen Neuroendokrinen Tumoren [26].

Dosisanpassungen sind im Verlauf einer Sunitinib-Therapie häufig nötig [39]. Insbesondere bei Plasmaspiegeln über 100 ng/ml steigt das Risiko für unerwünschte Wirkungen stark an. Zu den typischen dosislimitierenden Nebenwirkungen zählen Müdigkeit, Durchfall, Hand-Fuß-Syndrom, Mundschleimhautentzündungen und Myelosuppression [38]. Auch Kardio- [40-41] und Thyreotoxizitäten [42-46] werden beobachtet.

Im Tierversuch bei Ratten und Affen fielen unter sehr hohen Dosen Sunitinib auch adrenale Toxizitäten auf in Form von Hämorrhagien und Nekrosen der Nebenniere [38, 47]. Beim Menschen konnten bisher in der Bildgebung mittels CT/MRT keine Nebennierenhämorrhagien nachgewiesen werden (Kontrolle von 336 Patienten nach Sunitinibbehandlung). Bei zwölf von 400 Patienten fielen

allerdings ACTH-Tests nach der Behandlung mit Sunitinib durch einen erniedrigten Cortisolpeak auf. Nach Herstellerangaben entwickelte keiner dieser Patienten eine klinisch relevante Nebennierenrindeninsuffizienz [48-49].

1.2 Nebenniere

Die Nebennieren (Glandulae suprarenales) sind kleine paarig angelegte Organe, die den beiden oberen Nierenpolen aufsitzen. Schon makroskopisch ist die Aufteilung in Rinde und Mark sichtbar, die jeweils eine endokrine Drüse darstellen. Das Mark gilt als modifiziertes sympathisches Ganglion, seine chromaffinen Zellen schütten nach cholinergischer Aktivierung durch den Sympathikus die biogenen Amine Adrenalin und Noradrenalin aus. Die Nebennierenrinde ist der Ort der Steroidbiosynthese. Sie ist in verschiedene, mikroskopisch sichtbare Zonen eingeteilt: In der subkapsulären Zona glomerulosa werden vorwiegend Mineralkortikoide wie Aldosteron und Corticosteron gebildet. Ohne scharfe Grenze schließt sich die Zona fasciculata und schließlich die Zona reticularis an [50].

1.2.1 Adrenale Steroide und ihre Biosynthese

Steroidhormone werden vor allem in der Nebennierenrinde und in den Gonaden gebildet. Funktionell unterscheidet man dabei in der Nebennierenrinde: Mineralokortikoide (Aldosteron, Corticosteron), Glukokortikoide (Cortisol) und Androgene. Einen Überblick über die adrenale Steroidbiosynthese von Cholesterol bis zu den aktiven Hormonen und den beteiligten Enzymen zeigt Abbildung 2.

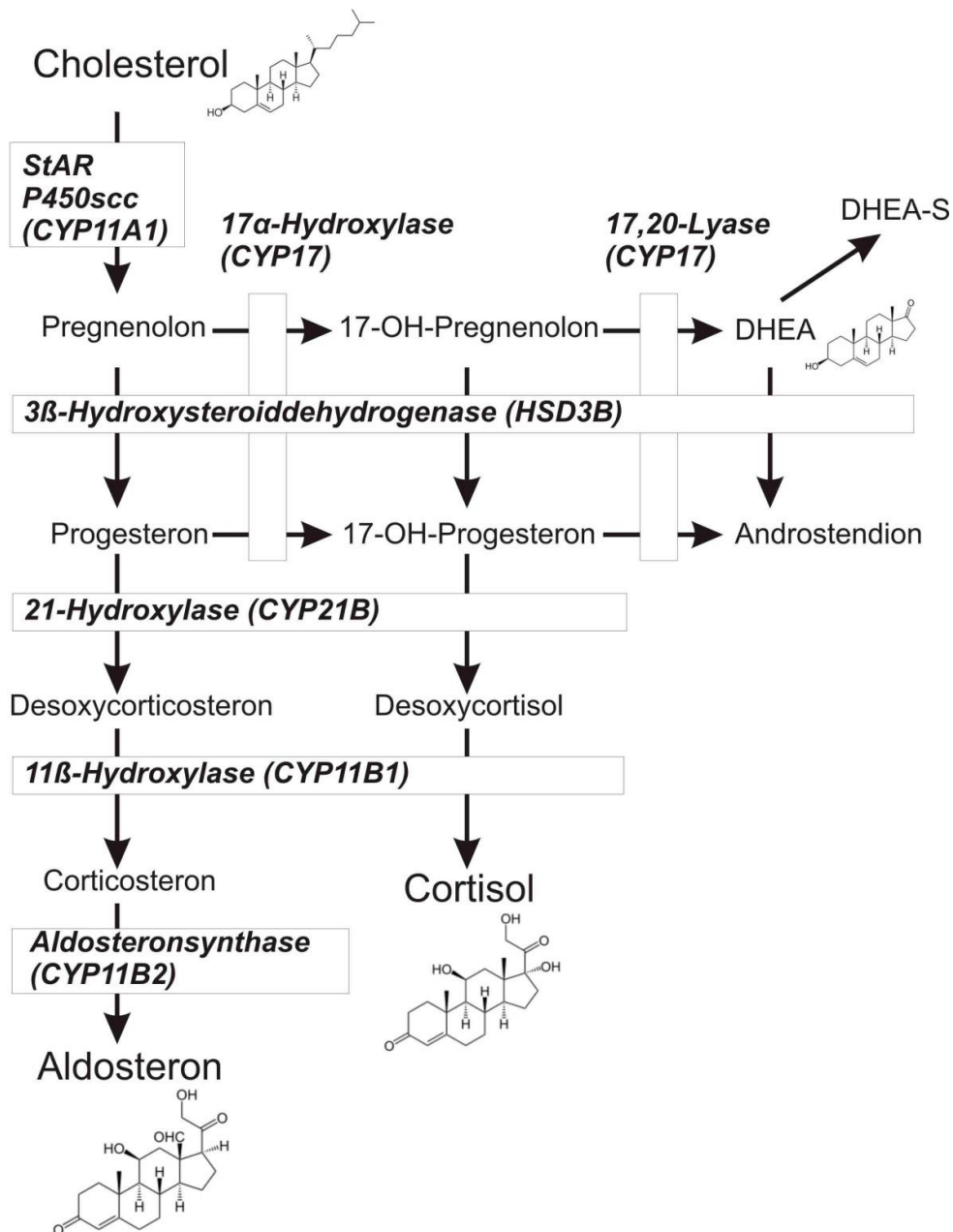


Abbildung 2: Übersicht über die adrenale Steroidsynthese, modifiziert nach [51]

Alle adrenalen Steroide leiten sich vom Cholesterol ab, das in den Lipidtröpfchen der Zellen gespeichert wird. Es kann von den Zellen selbst am glatten endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gespeichert werden, Hauptquelle ist jedoch das „low density lipoprotein“ als Cholesterinspeicher, das aus dem Blutplasma endozytotisch aufgenommen wird. Um aus Cholesterol mit 27 C-Atomen die Endprodukte Aldosteron und Cortisol (21 C-Atome) sowie Androgene (19 C-Atome) zu synthetisieren, sind mehrere Schritte nötig. Einen Großteil davon katalysieren die sogenannten CYP-Enzyme: Cytochrom P450-abhängige Enzyme, die zu der Familie der häm-haltigen Proteine gehören. Der Name leitet sich von ihrem speziellen Absorptionsverhalten bei 450 nm *in vitro* ab. In der Steroidhormonbiosynthese katalysieren sie Hydroxylierungen und Abspaltungen von kohlenstoffhaltigen Seitenketten. Sie liegen membrangebunden entweder an den Mitochondrienmembranen (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) oder am endoplasmatischen Retikulum (CYP17, CYP21) [51].

Neben Cytochrom P450-Proteinen sind Hydroxysteroiddehydrogenasen an der Steroidsynthese beteiligt. Als wichtigste sind hier die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen zu nennen. Von ihnen existieren zwei Isoformen: die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 und Typ 2 (HSD3B1 bzw. HSD3B2). Sie werden gewebespezifisch exprimiert, die HSD3B2 in der Nebenniere und in den Gonaden, die HSD3B1 in Plazenta, Haut und Brustgewebe. Auch sie sind in Mikrosomen und Mitochondrien membrangebundene Enzyme, die in zwei Reaktionsschritten (Wirkung zunächst als Dehydrogenase, dann als Isomerase) sowohl die Reaktionen von Pregnenolon zu Progesteron, von 17-OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron als auch von DHEA zu Androstendion katalysieren (vgl. Abbildung 2) [51-52].

Die 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen sind für die letzten Schritte der gonadalen Biosynthese der Sexualhormone Östradiol und Testosteron verantwortlich. In der Nebennierenrinde spielen sie keine Rolle [51].

Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidogenese wird zunächst Cholesterol an die innere Mitochondrienmembran gebracht, wo durch CYP11A1 die Seitenkette abgespalten wird, so dass aus einem Molekül mit 27 C-Atomen

Pregnenolon mit 21 C-Atomen entsteht. Der Cholesteroltransport an die Mitochondrienmembran wird von einem weiteren Protein unterstützt: dem StAR (Steroidogenic acute regulatory protein). Dieses wird Proteinkinase-A abhängig über verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert. Die weiteren Schritte finden im Zytoplasma bzw. am endoplasmatischen Retikulum statt; bis auf den letzten Schritt der Cortisol- und Aldosteronsynthese. Die CYP11-Komplexe sind wieder an den Mitochondrien zu finden. Über CYP17, das sowohl Hydroxylase- (von Pregnenolon bzw. Progesteron zu 17-OH-Pregnenolon bzw. 17-OH-Progesteron) als auch Lyaseeigenschaften hat, kann der Weg auch in Richtung Androgene zu DHEA-(S) und Androstendion eingeschlagen werden [53].

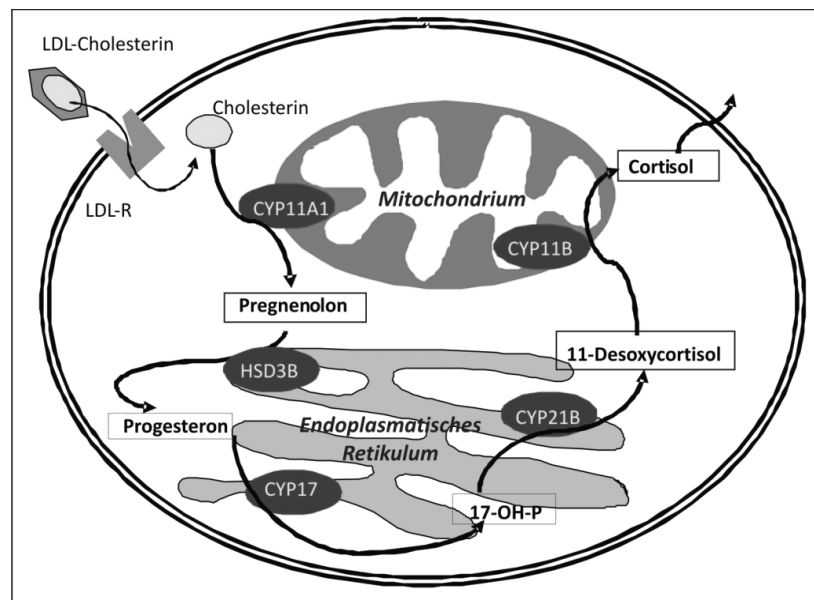


Abbildung 3: Halbschematische Darstellung der Cortisolsynthese in einer Nebennierenrindenzelle

Ob Mineralokortikoide, Glukokortikoide oder Androgene gebildet werden, hängt vom vorhandenen Enzymmuster in den verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde ab. So ist zum Beispiel CYP11B2, das Enzym, das für die Synthese von Aldosteron aus Corticosteron verantwortlich ist, nur in der Zona glomerulosa exprimiert.

Da Steroidhormone nicht intrazellulär gespeichert werden können, erfordert ihre Synthese eine präzise Regulation. Hauptregulator vor allem der Zonae reticularis und fasciculata ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Darüber

hinaus gibt es auch innerhalb der Nebenniere weitere Faktoren, die auf die Steroidogenese Einfluss nehmen: Allein die Tatsache, dass bei einer akuten Stresssituation schon nach kürzester Zeit (30 Sekunden) der Cortisolspiegel stark ansteigt, bevor also ACTH wirken kann, zeigt, dass es weitere, schnellere Faktoren geben muss [54]. Als schnellstes System in der Stressreaktion gilt das sympathische Nervensystem, über das Katcholamine und Neuropeptide (zum Beispiel im Nebennierenmark) freigesetzt werden, die wiederum über die Freisetzung verschiedener Zytokine [55] auch die Glukokortikoidsekretion in der Nebennierenrinde anregen. Es konnte belegt werden, dass auch die Nebennierenrinde sympathisch innerviert ist [54, 56] und sich Nebennierenrinde und Nebennierenmark gegenseitig beeinflussen [57]: Die doppelte Blutversorgung des Nebennierenmarks weist darauf hin, dass Steroidhormone Einfluss auf das sympathische Ganglion nehmen. Doch auch umgekehrt konnten *in vitro*-Studien [58] zeigen, dass Nebennierenkarzinomzellen in Cokultur mit chromaffinen Zellen deutlich mehr Cortisol bilden als alleine. Auch die Vaskularisierung der Nebennierenrinde hat einen Einfluss auf die Steroidsynthese [59]: In der Zona fasciculata liegen Endothelzellen und Nebennierenrindenzellen so eng beieinander, dass sie sich gegenseitig parakrin über Endothelin beeinflussen können. Mastzellen finden sich gehäuft in der Nebenniere, die über verschiedene Zytokine (zum Beispiel Interleukin-6) bei Infektionen oder anderem immunologischen Stress die Steroidsynthese steigern können [57].

Mineralokortikoide

Mineralokortikoide sorgen für einen ausgeglichenen Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Um dies sicherzustellen muss die Aldosteronsynthese streng reguliert und an den Wasser- und Kaliumhaushalt des Körpers angepasst sein. Deshalb ist die Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa im Gegensatz zu den Steroiden der anderen Zonen größtenteils unabhängig vom hypophysären ACTH. Stattdessen wird sie über den Kaliumspiegel (erhöhtes Plasmakalium führt zu einer vermehrten Aldosteronausschüttung) und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System gesteuert. Weil der Enzymkomplex CYP11B2, der die finalen

Schritte in der Synthese von Corticosteron zu Aldosteron katalysiert, nur in der Zona glomerulosa exprimiert wird, findet die Aldosteronsynthese nur dort statt. Im Vergleich zu Glukokortikoiden wird relativ wenig Aldosteron in der Nebenniere gebildet, die durchschnittliche Sekretion liegt bei etwa 50-150 µg pro Tag [60] (zum Vergleich: täglicher Cortisol-Output 10-20 mg).

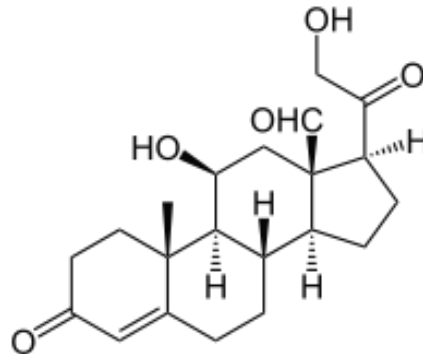


Abbildung 4: Strukturformel des Mineralokortikoids Aldosteron

Glukokortikoide

Zu den Vertretern der Glukokortikoide zählen neben dem Hauptvertreter Cortisol auch sein inaktiver Metabolit Cortison sowie Corticosteron als Aldosteron-Vorläufer. Die normale, stressunabhängige Cortisolausschüttung folgt einer ausgeprägten Tagesrhythmik: Sein Maximum erreicht der Cortisolspiegel normalerweise in den frühen Morgenstunden und fällt während des Tages ab [50, 61].

Hauptaufgabe der Glukokortikoide, allen voran Cortisol, ist die Anpassung des Organismus an Stressreaktionen. Aktiviert werden die Cortisol-produzierenden Zellen in der Zona fasciculata vor allem über das Hypothalamus-Hypophysensystem: Bei Stress (physische oder psychische Belastung, Schmerzen, Blutdruckabfall, Hypoglykämie) wird im Hypothalamus CRH freigesetzt. Dieses führt zur Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse, welches wiederum über ACTH-Rezeptoren in der Nebenniere die Cortisolsynthese aktiviert [61]. Wie alle Steroidhormone kann Cortisol nicht gespeichert werden.

Es diffundiert durch Zellmembranen und bindet intrazellulär an Glukokortikoidrezeptoren, die ihre Wirkung vor allem über Regulierung der Transkription entfalten. Generell haben Glukokortikoide verschiedenste modulatorische Effekte auf das Herzkreislaufsystem, das Immunsystem (antiinflammatorisch, immunsuppressiv) und Stoffwechsel (Bereitstellung von Energie). Sie beeinflussen aber auch Neurobiologie und Reproduktion [62].

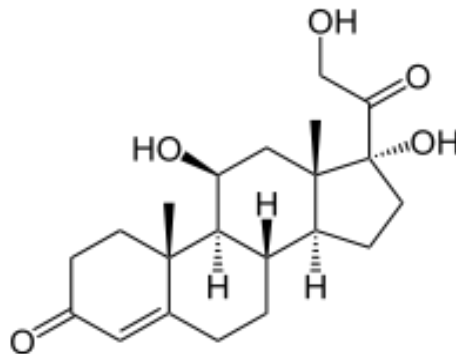


Abbildung 5: Strukturformel des Glukokortikoids Cortisol

Die Glukokortikoidsekretion muss reguliert werden, denn sowohl Überschuss als auch Mangel können schwerwiegende Folgen für den Organismus haben und Krankheiten auslösen. Für einen Glukokortikoidüberschuss (Cushing-Syndrom) kommen verschiedene Ursachen in Frage: Am häufigsten ist ein Hypercortisolismus iatrogen verursacht durch Glukokortikoidgabe, zum Beispiel im Rahmen der Behandlung einer Autoimmunerkrankung. Außerdem kann es aus einem Tumor der Nebennierenrinde (adrenales Cushing-Syndrom) oder sekundär ACTH-induziert durch einen Hypophysentumor (Morbus Cushing) oder paraneoplastisch ektope ACTH-Bildung (z. B. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom) zu einer vermehrten Cortisol-Ausschüttung kommen. Die Auswirkungen sind unabhängig von der Ursache: Abbau von Fett und Proteinen an Extremitäten, Hyperglykämie und Umverteilung des Fettes an Stamm und Nacken, weshalb ein Cushing-Syndrom klinisch auch mit den Begriffen „Vollmondgesicht“, „Stammfettsucht“, „Stiernacken“ und Striae in Verbindung gebracht wird. Zudem kann es zu Diabetes mellitus, Blutdruckanstieg, Magenulkus, Schwächung der Immunabwehr, Wundheilungsstörungen, bei Kindern zu Wachstumsstörungen und bei Erwachsenen zu Osteoporose führen. Bei sehr hoher Cortisolkonzentration kann Cortisol auch am

Mineralokortikoidrezeptor binden und so zur Entwicklung einer Hypertonie mit niedrigem Kaliumspiegel und metabolischer Alkalose beitragen.

Ohne Glukokortikoide ist der Mensch nicht lebensfähig. Eine Nebennierenunterfunktion (Morbus Addison) kann Hypoglykämien, Muskelschwund, Gewichtsverlust und bei fehlender Kreislaufaktivierung lebensbedrohliche Blutdruckabfälle verursachen. Eine lebenslange Hydrocortisonsubstitution mit Dosisanpassung in besonderen Stresssituationen ist dann lebensnotwendig.

Androgene

Neben den Glukokortikoiden werden in den inneren Zonen der Nebennierenrinde auch Androgene gebildet. Im Gegensatz zu der Androgenbildung in den Gonaden ist die Synthese hier nicht über FSH und LH gesteuert, sondern durch ACTH. DHEA, das peripher oft als das sulfatierte DHEA-S vorliegt, und Androstendion sind nur schwache Androgene, die in den Gonaden dann zu Testosteron und seinem aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron oder Östrogenen umgewandelt werden können. Dennoch können sie bei einem Androgenexzess Virilisierungerscheinungen und Zyklusstörungen bei Frauen hervorrufen. Außerdem scheint DHEA bei Alterungsprozessen eine Rolle zu spielen [63].

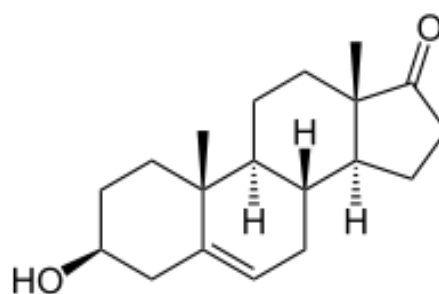


Abbildung 6: Strukturformel des Androgens DHEA

1.2.2 Nebennierenkarzinom

Obwohl Nebennierentumore mit einer Prävalenz von etwa 3 -10 % relativ häufig sind, ist das Nebennierenkarzinom mit einer geschätzten weltweiten Inzidenz von ein bis zwei Erkrankungen pro eine Million Einwohner eine sehr seltene Erkrankung, die etwa 0,2 % aller Krebstodesfälle ausmacht [64-67].

Klinik und Stadieneinteilung des Nebennierenkarzinoms

Klinisch auffällig werden die Patienten mit Nebennierenkarzinom in über 60 % der Fälle durch endokrine Störungen, meist in Form eines Cushing-Syndroms (Muskelschwäche, Ekchymosen, Hautveränderungen, Diabetes mellitus). Auch Androgenexzesse sind relativ häufig und können bei Frauen zu Hirsutismus, Zyklusstörungen und anderen Virilisierungserscheinungen führen. Östrogenbildende Nebennierentumore bei Männern sind selten, aber immer malignitätsverdächtig. Aldosteronbildende Nebennierenkarzinome sind ebenfalls selten. Symptome eines Hyperaldosteronismus mit Hypertonie und Hypokaliämie finden sich dennoch häufig in Folge des Überangebots an Cortisol, das an den Mineralokortikoidrezeptor binden kann. Bei nichthormonbildenden Karzinomen steht die intraabdominelle Tumormasse im Vordergrund, die sich durch Bauch- und Rückenschmerzen äußern kann. Immer häufiger werden Nebennierenkarzinome zufällig als sogenannte Inzidentalome im Rahmen von bildgebenden Untersuchungen (CT, Sonographie) entdeckt. B-Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust und Tumorkachexie sind eher eine Ausnahme [67-68].

Die Prognose des Nebennierenkarzinoms ist sehr schlecht. Etwa 20 % der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits Metastasen (bevorzugt in Leber und Lunge) [64]. Das 5-Jahresüberleben liegt insgesamt bei etwa 40 %, im metastasierten Stadium liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei Diagnosestellung bei unter einem Jahr. Die einzige kurative Therapie ist die radikale chirurgische Adrenalektomie, dennoch treten oft auch nach initial kurativer Operation schon früh Rezidive und Metastasen auf [69-70]. In Einzelfällen wird aber auch bei bereits metastasierter Erkrankung ein Langzeitüberleben über mehr als 15 Jahre beschrieben [71].

Die Stadieneinteilung nach Sullivan [72], an der sich 2004 auch die UICC (International Union Against Cancer) und die Weltgesundheitsorganisation orientierten, gilt mittlerweile als überholt. Ein Vorschlag des ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) von 2008 [73] hat sich auf Grund der besseren Prognoseabschätzung auch international durchgesetzt [74] und ist Tabelle 1 zu entnehmen. Je nach Stadium kann hier von einem prognostischen 5-Jahres-Überleben von 13 % (Stadium IV) bis über 80 % (Stadium I) ausgegangen werden, wobei für die Zukunft noch weitere Modifizierungen der Stadiumeinteilung anhand weiterer Prognosemarker erwartet werden [67].

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Nebennierenkarzinoms [73]

	<i>Alte Klassifikation</i>	<i>ENSAT 2008</i>
Stadium I	T1 N0 M0	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 oder T1-2 N1 M0	T3-4 N0-N1 M0 oder T1-2 N1 M0
Stadium IV	Alle T4, T3 N1 M0, alle M1	Alle M1
Dabei gilt: T1: Tumor < 5 cm; T2: Tumor > 5 cm; T3: Infiltration von Nachbargeweben; T4: Invasion von anderen Organen (neu ENSAT: oder Tumorthrombus in V. cava oder V. renalis); N1: Lymphknotenbefall; M1: Fernmetastasen		

Therapie des Nebennierenkarzinoms

Die besten Heilungschancen bietet in den Stadien I-III die komplette chirurgische R0-Resektion des Tumors mit möglichst intakter Kapsel. Oft muss die Operation ausgeweitet werden mit einer Resektion von Nachbarorganen (Niere, Milz, Leber, Pankreas). Nach neueren Daten werden regelhafte Lymphadenektomien empfohlen [75]. Wenn ein linksseitiges Karzinom in die Vena cava eingewachsen ist, kann sogar ggf. ein Bypass nötig sein. Ob Tumordebulking bei Metastasen

und inoperablen Primärtumoren sinnvoll ist, bleibt noch immer offen, da die Prognose in diesen Stadien sehr schlecht ist [68-69, 76].

Eine adjuvante Bestrahlung des Tumorbetts kann bei Patienten im Stadium III oder in Risikosituationen sinnvoll sein. Obwohl ältere Studien das Nebennierenkarzinom meist als strahlenresistent bezeichneten, konnte in mehreren Analysen [77-80] ein verlängertes progressionsfreies Überleben sowohl nach adjuvanter als auch palliativer Radiatio nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit, medikamentös auf die Nebennierenrinde und vor allem die Steroidproduktion einzuwirken, ist o',p'-DDD (Mitotane), ein Abkömmling des im zweiten Weltkrieg und als Pestizid eingesetzten Gifts DDT. Mitotane (Lysodren®, HRA Pharma, Paris) hat sehr variable Ansprechraten und zahlreiche Nebenwirkungen [81]. Neuere große, retrospektive Studien zeigen einen Überlebensvorteil einer adjuvanten Mitotane-Therapie bei Nebennierenkarzinomen der Stadien I bis III nach radikaler Operation [82]. Aktuell wird in einer Phase-3-Studie der Effekt von Mitotane vs. Beobachten bei Nebennierenrindencarcinomen in frühen Stadien I und II nach R0-Resektion bei niedrigem bis mittlerem Risiko untersucht (ADIUVO-Studie (Efficacy of adjuvant Mitotane treatment in prolonging recurrence-free survival in patients with Adrenocortical Carcinoma at low-intermediate risk of recurrence submitted to radical resection), www.adiuvo-trial.org).

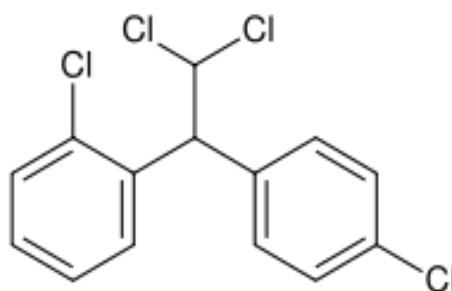


Abbildung 7: Mitotane: 1-chloro-2-(2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)-ethyl)-benzene

Chemotherapien sind beim Nebennierenkarzinom oft nur schlecht wirksam. Als einzig verfügbare randomisierte kontrollierte Studie konnte in der FIRM-ACT-

Studie (First International Randomized Trial for Locally Advanced and Metastatic Adrenocortical Tumors [83]) eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens durch einer Kombination aus Mitotane, Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin im Vergleich zur Kombination Streptozotocin/Mitotane von 2,1 auf 5 Monate erreicht werden. Deshalb wird diese Kombination nach Fehlschlagen einer hochdosierten Mitotane-Monotherapie nun als Erstlinientherapie bei fortgeschrittener Erkrankung empfohlen [67], wobei häufig das Therapieregime im Verlauf gewechselt werden muss.

Andere, zunehmend in der Onkologie eingesetzte Therapiestrategien wie z. B. Antikörper oder die bereits beschriebenen Tyrosinkinaseinhibitoren befinden sich noch in Testphasen [84]. Sie werden später in dieser Arbeit noch diskutiert.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Das Nebennierenkarzinom ist eine sehr seltene Tumorerkrankung mit in fortgeschrittenem Stadium schlechter Prognose. Insbesondere bei fortgeschrittenen metastasierten Tumoren fehlen weiterhin gute Therapieoptionen. Gleichzeitig werden Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib immer verbreiteter in der Behandlung verschiedener onkologischer Erkrankungen.

In dieser Arbeit sollen die Effekte des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib auf Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* untersucht werden.

Insbesondere folgenden Fragen soll deshalb nachgegangen werden:

1. Hat Sunitinib eine direkte **Wirkung auf die Proliferation** von Nebennierenkarzinomzellen?
2. Hat Sunitinib einen direkten Einfluss auf **die Steroidbiosynthese** bei Nebennierenkarzinomzellen?
3. Wenn Sunitinib die Steroidbiosynthese beeinflusst, welche **Enzyme** sind betroffen?

Hierdurch sollen Anhaltspunkte dafür überprüft werden, ob Sunitinib eine mögliche Option zur Therapie von Nebennierenkarzinomen (siehe 1.2.2) darstellt. Andererseits sollen potentielle Nebenwirkungen auf den Steroidhaushalt – auch bei Einsatz von Sunitinib bei anderen Tumorentitäten – aufgedeckt werden.

Als Modell wurde für die Untersuchungen die etablierte hormonproduzierende Nebennierenkarzinomzelllinie NCI-h295 gewählt. Vergleichsuntersuchungen wurden mit der zweiten verfügbaren humanen Nebennierenkarzinomzelllinie SW-13 durchgeführt, einer nicht-hormonproduzierenden Zelllinie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Sämtliche verwendete Materialien werden in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Verbrauchsmaterialien, Reagenzien	Firma
Sunitinib (SU11248)	Pfizer, Karlsruhe
Forskolin, DMEM/HAM's F12, RPMI 1640, Leibovitz L15, DMEM F10, Bovines Serumalbumin, Selenium, Insulin, Transferrin, ITS-Solution, Glutamin, Trypsin-EDTA, Trypanblau, MTT-Salz, DMSO, β -Mercaptoethanol, Ammoniumpersulfat (APS), Poncerau-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Nu-Serum	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Fetales Kälberserum, DPBS ohne Ca/Mg	PAN-Biotech, Aidenbach
Alle Materialien für Chemilumineszenz, RIA-Assays für Androstendion und DHEA-S	Siemens Medical Solution, Bad Nauheim
RIA-Assay für 17-OH-Progesteron	Beckman Coulter, Krefeld
RNeasy Mini Kit, Qias shredder, Quantitect Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Primer und Sonde für β -Aktin	Biomers.net, Ulm
TaqMan Gene Expression PCR Master Mix Primer-Sonden-Mix für: HSD3B2 (HS00605123_M1) CYP11B1 (HS01596404_M1) und CYP11A1 (HS00167984_M1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Acrylamid/Bis 30 %, TEMED Mini Protean II, TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell, Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad Laboratories, München
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Hybond ECC Nitrocellulose membrane, ECL-Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg

Anti-rabbit IgG	GE-Healthcare, München
Zelllinien	
NCI-h295, NCI-h295R	American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, USA
SW-13	Cell Line Service (CLS), Heidelberg
Geräte	
Photometer ELISA plate reader (400 SF)	SLT Lab Instruments, Crailsheim
Immolute 2000	Siemens Medical Solution, Bad Nauheim
Gaschromatograph Agilent 6890, ausgerüstet mit Agilent 7683 Autoinjektor Massenspektrometer Agilent 5973 N	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Fused Silica Kapillarsäule	Macherey-Nagel, Düren
iCycler	BioRad Laboratories, München

2.2 Zellkultur

Als Modell für die Experimente wurden die beiden etablierten humanen Nebennierenkarzinom-Zelllinien NCI-h295 (hormonproduzierend) und SW-13 (hormoninaktiv) gewählt. Sunitinib wurde vom Hersteller Pfizer zur Verfügung gestellt und in Wasser bei pH 7 gelöst.

2.2.1 NCI-h295-Zelllinien

NCI-h295-Zellen stammen ursprünglich vom Nebennierenkarzinom einer 48-jährigen dunkelhäutigen Frau, die klinisch Symptome sowohl eines Mineralokortikoid-, Glukokortikoid- als auch Androgenexzesses zeigte. Der Tumor wurde 1980 bei einer Größe von 14 x 11 x 13 cm chirurgisch entfernt und nach zehn Jahren in Kultur von Gazdar et. al. [85] als Zelllinie etabliert [85-87]. Da sie fast alle Steroidhormone (sowohl Mineralokortikoide als auch Glukokortikoide

und Androgene) sezernieren und sämtliche für die Steroidogenese nötigen Enzyme exprimieren [88], gelten sie als das Standard-Zellmodell der Nebennierenrinde und sind Grundlage vieler Studien zur Steroidbiosynthese, ihrer Regulation und pharmakologischen Beeinflussbarkeit [87, 89].

Wie auch die Nebennierenrinde, können NCI-h295-Zellen sowohl über den Proteinkinase-A-Weg, über den bei einer Erhöhung des cAMP-Spiegels die Transkription verschiedener Enzyme in Richtung Glukokortikoide/Androgene gesteigert wird, als auch über den Proteinkinase-C-Weg, der im menschlichen Körper Angiotensin II-vermittelt die Mineralokortikoidsynthese steigert, stimuliert werden. In der Zellkultur kann die Steroidsynthese durch z. B. Forskolin, einem Stimulator der Adenylatzyklase, effektiv gesteigert werden, da unter anderem CYP11A1, CYP17 und CYP21 vermehrt transkribiert werden. Auf ACTH dagegen reagieren NCI-h295-R-Zellen nur schwach [87-88], weshalb in den Versuchen dieser Arbeit Forskolin als Steroidstimulator verwendet wurde.

Für die verschiedenen Testmethoden dieser Arbeit wurden sowohl NCI-h295-Suspensionszellen als auch die adhärenente NCI-h295R-Linie verwendet. Die adhärenenten NCI-h295R-Zellen wuchsen als Monolayer in 250 ml-Zellkulturflaschen, wobei dem DMEM Nutrient Mixture F12 HAM-Medium noch ITS-Solution (fixe Mischung aus Insulin, Transferrin und Selenium), 1,2 % bovines Serumalbumin und 2,5 % Nu-Serum zugesetzt wurde. Bei 37 °C und 5 % CO₂ vermehrten sich die Zellen nur langsam mit einer Verdopplungszeit von etwa vier bis fünf Tagen. Je nach Wachstumsverhalten wurde alle zwei bis drei Tage das Nährmedium ausgetauscht bzw. die Zellen nach Lösung von der Flaschenwand mit Trypsin auf mehrere Zellkulturflaschen gesplittet.

Die Suspensionszellen wurden in 750 ml-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-Medium 1640 unter Zusatz von 5 µg/ml Insulin, 50 µg/ml Transferrin und 1,3 µl/ml Selenium bei einem Serumgehalt von 10 % FCS (Fetal calf serum) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde nach Zentrifugation der Zellen das Medium gewechselt, bzw. die Zellen gesplittet, wobei etwa ein Drittel des alten Mediums behalten wurde, da die Zellen einige Wachstumsfaktoren selbst zu produzieren scheinen. Für die Versuche wurde das Altmedium jeweils restlos

entfernt und der Serumgehalt bereits zwei Tage vor Versuchsbeginn auf 5 % FCS reduziert.

2.2.2 SW-13-Zelllinie

Die SW-13-Zelllinie wurde 1973 von Leibovitz [90] etabliert. Im Gegensatz zu NCI-h295-Zellen produziert sie keine Glukokortikoide oder Mineralokortikoide [91] und nur geringe Mengen Androgene [92]. Als adhärent wachsende Zellen wurden die SW-13-Zellen als Vergleich zu den NCI-h295R-Zellen für MTT-Tests verwendet.

In Zellkultur vermehrten sie sich sehr rasch in 250 ml-Zellkulturflaschen bei 37 °C unter CO₂-armen Bedingungen (luftundurchlässiger Flaschendeckel), so dass die Zellen etwa alle zwei Tage in drei bis fünf Teile gesplittet werden konnten. Als Nährmedium wurde Leibovitz L15-Medium verwendet, mit einem Zusatz von 10 % FCS und 1 % Glutamin.

2.3 Proliferationsstudien

Zunächst wurde der Einfluss von Sunitinib auf das Wachstum der oben beschriebenen Nebennierenkarzinomzelllinien NCI-h295 und SW-13 untersucht.

2.3.1 Zellzählung

Anhand von NCI-h295-Suspensionszellen wurden nach Anfärbung mit Trypanblau Wachstumskurven erstellt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, die Zellmembran von vitalen Zellen dagegen kann es nicht durchdringen, so dass vitale Zellen hell auf blauem Hintergrund erscheinen. Die Suspensionszellen wurden in 6-well-Platten mit einer Dichte von 500.000 Zellen/ml ausgesät, jeweils ein Triplet mit Medium als Kontrolle, sowie jeweils Triplets mit 0,1 µM, 1 µM und 5 µM Sunitinib als Endkonzentration inkubiert. An den Tagen 2, 4, 6 und 8 erfolgte die manuelle Zellzählung nach Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Hierfür wurden die Zellsuspensionen zunächst mittels Pipetten verschiedener Größen gut resuspendiert, schließlich mit Trypanblau im

Verhältnis 1:1 angesetzt und damit eine Neubauer-Zählkammer befüllt. Anschließend wurden die vitalen Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zahl der ursprünglich in der Suspension vorhandenen Zellen berechnet.

2.3.2 MTT-Tests

Das Prinzip von MTT-Tests beruht darauf, dass das farblose Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) nur in vitalen Zellen zum blauen Formazan umgewandelt wird. Dieses kann mittels Spektrophotometer bestimmt werden. Dabei ist ein Anstieg der Extinktion direkt proportional zur Zellzahl [93-95].

Adhärente NCI-h295R-Zellen sowie SW-13-Zellen wurden hierfür in 96-well-Platten ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurde am nächsten Tag Sunitinib in steigenden Konzentrationen (Zielkonzentration 0,1 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM und 10 µM) bzw. als Kontrolle reines Kulturmedium hinzugefügt und die Zellen für weitere vier Tage im Brutschrank inkubiert.

Am Auswertetag wurden die Mediumüberstände entfernt und mittels DPBS Serumrückstände abgewaschen. Die MTT-Substanz (0,5 mg/ml) wurde in serumfreien Kulturmedium (DMEM F10) gelöst, die Lösung auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere drei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde jedem Well eine Lösung aus 4 % HCl und Isopropanol hinzugefügt, um das Formazan zu lösen, bevor die photometrische Messung mittels Elisa Reader bei 570 nm erfolgte.

2.4 Hormonanalysen

Untersucht wurden in dieser Arbeit Glukokortikoide und Androgene. Ein eventueller Einfluss von Sunitinib auf die Mineralokortikoidsynthese wurde nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der einzelnen Hormonwerte erfolgte mittels Chemilumineszenz bzw. Radioimmunoassays. Für einen kompletten Überblick über die gesamte Glukokortikoid- und Androgensynthese wurde für einzelne Versuche ein genaues Steroidprofil mittels Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie erstellt.

Die Proben für die Hormonanalysen stammen aus den gleichen Versuchsansätzen, die zur Erstellung der Wachstumskurven dienten. Nach dem Zählen der Zellen wurden die Zellsuspensionen in Eppendorf Caps überführt, zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und bei -18 °C bis zur Messung der Hormone eingefroren. Einzelne orientierende Cortisolmessungen wurden zusätzlich nach 2, 6, 12 und 24 Stunden durchgeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Hormonsynthese nach Stimulation mit dem Adenylatcyclaseaktivator Forskolin untersucht. Hierzu wurden NCI-h295-Suspensionszellen mit Sunitinib ($1\text{ }\mu\text{M}$, $5\text{ }\mu\text{M}$) oder mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Forskolin bzw. mit einer Kombination beider Substanzen inkubiert und nach drei Tagen die Überstände wie oben beschrieben abpipettiert, zentrifugiert und für die späteren Hormonbestimmungen bei -18 °C eingefroren. Für einen Vergleich von Hormonkonzentration zur Zellzahl wurde bei den Stimulationsversuchen jeweils ein Well der Triplets manuell in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.4.1 Chemilumineszenz: Bestimmung von Cortisol und DHEA-S

Die Messung von Cortisol und DHEA-S erfolgte mittels Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics), einem vollautomatischen Zentralanalyser. Der Test läuft nach dem Prinzip eines kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay ab (Assaybeschreibung des Herstellers): Zunächst werden Kugeln mit Antikörpern gegen die zu messende Substanz in eine Küvette pipettiert, dann wird sowohl die Probe als auch ein Reagenz, das das Antigen gebunden an

alkalische Phosphatase enthält, in die Küvette gegeben. Während der Inkubationszeit konkurrieren das Enzym-gebundene Antigen und das Hormon aus der Probe um die freien Antikörperbindungsstellen an der Kugel. Schließlich wird das ungebundene Substrat mittels mehrerer Waschschriffe entfernt und ein luminogenes Substrat zugesetzt. Dieses wird mittels der alkalischen Phosphatase zu einem Zwischenprodukt umgesetzt, das beim Zerfallen ein Photon aussendet und so gemessen werden kann. Die ausgesendete Lichtmenge ist also direkt proportional zur Menge des an alkalische Phosphatase gebundenen Hormons und damit indirekt proportional zur Menge des ursprünglich in der Probe enthaltenen Hormons, so dass anhand einer Eichkurve die Konzentration des Hormons errechnet werden kann [96].

2.4.2 Radioimmunoassay:

Bestimmung von 17-OH-Progesteron und Androstendion

Zur Messung von Androstendion und 17-OH-Progesteron wurden Radioimmunoassays (RIA) mit kommerziell erhältlichen RIA-Kits für die entsprechenden Hormone gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Um die Aussagekraft des Chemilumineszenzverfahren zu prüfen, wurde in einer Versuchsreihe auch DHEA-S mittels RIA bestimmt und die Ergebnisse des Immulite 2000 bestätigt.

Prinzip des Tests: Hormone des Testmediums konkurrieren mit I-125-markierten Hormonen (Tracer) um die Bindungsstellen an gegen die Hormone gerichtete spezifische Antikörper, die in beschichteten Röhrchen fest gebunden sind. Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Flüssigkeit dekantiert und die gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Dabei ist die Menge an Radioaktivität indirekt proportional zur Menge des zu messenden Hormons, dessen Konzentration dann mittels Standard-Eichkurve ermittelt werden kann.

2.4.3 Isotopenverdünnungs/Gaschromatographie-Massenspektrometrie: Steroidprofil

Um einen kompletten Überblick über die Steroidbiogenese der Glukokortikoide und Androgene zu bekommen, wurde je eine Versuchsreihe des Wachstumskurvenversuchs und des Forskolinversuchs an der Universitätsklinik Gießen im Steroidlabor von Herrn Prof. Dr. med. Wudy analysiert, wo mittels Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie (ID/GC-MS) ein Steroidprofil mit folgenden Hormonen erhoben wurde: Testosteron (T), Androstendion (4-A), DHEA, Androstandiol (AD), Dihydroxytestosteron (DHT), 17-Hydroxyprogesteron (17-OH-P), 17-Hydroxypregnenolon (17-OH-Preg), 11-Desoxycortisol und Cortisol.

Bei der ID/GC-MS werden verschiedene Techniken aneinander gekoppelt: Die hochspezifische Gaschromatographie trennt die Substanzen aus dem Probengemisch auf. Identifizierung und Quantifizierung der Hormone erfolgen dann mittels Massenspektrometrie. Da Steroidhormone oft nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, werden zur Analyse interne Standards mit stabilen Isotopen (Deuterium) markierte Analoge der zu messenden Hormone zugegeben. So reichen bereits geringe Probenvolumina von weniger als 0,5 ml aus, um das oben genannte Steroidprofil darzustellen.

Dazu werden die Proben mit einem internen Standard inkubiert, der Deuterium-markierte Steroidanaloge enthält (Details siehe [97]), anschließend die Steroide extrahiert, mittels Gelchromatographie gereinigt und derivatisiert. Das GC-MS-System besteht aus einem Gaschromatographen mit einer Fused-silica-Kapillare, der an einen Massenselektor gekoppelt ist. Die Quantifizierung erfolgte schließlich mit Peakflächenberechnung [98].

2.5 Transkriptionsanalysen

Um einen eventuellen Einfluss von Sunitinib auf die Transkription verschiedener Enzyme der Steroidogenese aufzuzeigen, wurden NCI-h295-Zellen wie oben beschrieben für 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Dosen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) Sunitinib inkubiert und anschließend mittels quantitativer Real-time-PCR (Polymerasekettenreaktion) untersucht. Sie beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR, mit der Genfragmente vervielfältigt werden können:

Im ersten Schritt (Denaturierung) werden die beiden DNA-Stränge bei ca. 90-95 °C in Einzelstränge aufgetrennt. Daran lagern sich im zweiten Schritt (Annealing; bei etwa 50 °C) Oligonukleotidprimer an, die als Startermoleküle für DNA-Polymerasen dienen, durch die der Strang vervollständigt wird (Elongation, Schritt 3). Bei der quantitativen Real-Time-PCR (RTq-PCR) lagert sich zusätzlich eine Sonde an den Primer an, die durch Fluoreszenzmessungen während jedes Zyklus eine Quantifizierung der entstehenden Genabschnitte in Echtzeit („Real-time“) erlaubt. In dieser Arbeit wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Sie lagert sich an den komplementären DNA-Strang an, während der Elongation (Schritt 3 der PCR) wird sie durch die Taq-Polymerase, einer speziellen DNA-Polymerase, abgebaut und ein sogenannter Reporter freigesetzt, der fluoreszieren kann [99].

Diese Fluoreszenz wird während jedes Zyklus im RTq-PCR-Gerät (in dieser Arbeit ICycler von Bio-Rad) protokolliert. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als sogenannter CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwertzyklus“) oder CP-Wert („Crossing point“) angegeben. Zur Auswertung wurde neben der RTq-PCR für das gesuchte Gen jeweils auch eine RTq-PCR für ein Referenzgen (β -Aktin) durchgeführt. So kann man die relative Quantifizierung der Genexpression errechnen nach der Formel:

$$\text{Normalisierter Wert} = 2^{[(\text{CT-Wert des Referenzgens}) - (\text{CT-Wert des Zielgens})]}$$

2.5.1 RNA-Extraktion

Bevor mit RNA aus der Zellkultur gearbeitet werden kann, muss diese erst aus den Zellen extrahiert werden. Alle RNA-Extraktionen wurden nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen (RNeasy Mini Handbook 9/2006) mit Hilfe des RNeasy Mini Kit durchgeführt: Die Zellen wurden bei 5.400 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet sofort in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 μ l/ml) gelöst. Dieses führt zur Denaturierung RNAsen. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde eine weitere Homogenisation mittels Qiashreder durchgeführt, dafür wurden die Zellen erneute in speziellen Tubes für zwei Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde mit 70 % Ethanol gemischt und zur Proteinausfällung in RNeasy Zentrifugenröhrchen gegeben. In diesen Röhrchen ist eine beschichtete Membran eingelassen, die unter bestimmten Salzbedingungen RNA einer Mindestgröße von 200 Basen binden kann.

Nach anschließendem dreimaligen Waschen und Zentrifugieren mit Waschpuffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen (zunächst RW1-Puffer, dann zweimalig RPE-Puffer) wurde die RNA mit RNA-freiem Wasser aus der Membranbindung eluiert. Die so gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren.

2.5.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Für das Umschreiben der gewonnen mRNA in cDNA wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen (QuantiTect Reverse Transcription Handbook 2009) in modifizierter Form vorgegangen: Für jeden Versuch wurden 500 ng RNA verwendet. Genomische DNA wurde eliminiert, indem die Template-RNA mit gDNA Wipeout Buffer und RNase-freiem Wasser für fünf Minuten bei 42 °C inkubiert wurde. Ein Mastermix wurde hergestellt aus Quantiscript Reverse Transcriptase (mit RNase-Inhibitor), Quantiscript RT Buffer und RT Buffer. Dieser Mastermix wurde zur Template-RNA gegeben und für 25 Minuten erneut bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurde die Temperatur auf 95 °C erhöht, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und damit die Reaktion zu stoppen. Die so

entstandene cDNA konnte direkt für Untersuchungen mittels Real-Time-PCR weiterverwendet werden.

2.5.3 Real-Time-PCR (RTq-PCR)

Für die quantitative Real-time PCR wurde der TaqMan Gene Expression Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Darin sind bereits sämtliche für die RTq-PCR relevanten Substanzen (Polymerasen, Nukleotide etc.) enthalten bis auf Primer, Sonde und cDNA. Ein Probevolumen von 25 µl wurde angesetzt, das Pipettierschema ist in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Ansatz RTq-PCR pro Well

	Zielgene	Referenzgen (β-Aktin)
Master Mix	12,5 µl	12,5 µl
Sonden-Primer-Mix	1,25 µl	-
Vorwärtsprimer	-	2 µl
Rückwärtsprimer	-	1 µl
Sonde	-	1 µl
H2O	9,25 µl	6,5 µl
cDNA	2 µl	2 µl

Die RTq-PCR wurde im iCycler iQ Real Time PCR detection system durchgeführt. Der Ablauf entspricht dem in Tabelle 3 angegebenen Programm:

Tabelle 3: iCycler iQ Real time PCR detection System

Reaktionsschritt	Temperatur
Aktivierung der Taq-Polymerase, Reaktionsstart und Denaturierung	50 °C für 2 Minuten 95 °C für 10 Minuten
Vervielfältigung (45x)	
- Denaturierung	95 °C für 15 Sekunden
- Annealing und Elongation	55 °C für 1 Minute
Währenddessen Echtzeitanalyse	
Abkühlen	15 °C

Das iCycler iQ Real Time PCR detection system analysiert nach o.g. Programm vollautomatisch und ermittelt die CT-Werte für die jeweiligen Gene. Durch Normalisierung des CT-Werts des Zielgens gegen den von β -Aktin wurde die relative Quantifizierung nach der Formel $\text{Normalisierter Wert} = 2^{[(\text{CT-Wert des Referenzgens}) - (\text{CT-Wert des Zielgens})]}$ errechnet.

Verwendete Primer und Sonden

Referenzgen: β -Aktin (biomerase.net., Ulm)

Forward-Primer: 5'TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG 3'

Reverse-Primer: 5'CAG AGG CGT ACA GGG ATA GC 3'

Sonde: 5'TTT GAG ACC TTC AAC ACC CC 3'

Für die untersuchten Gene HSD3B, CYP11B1, CYP11A1 wurden kommerziell erhältliche Primer-Sonden-Mixes des Herstellers Applied Biosystems verwendet.

HSD3B2: Nr. HS00605123_M1

CYP11B1: Nr. HS01596404_M1

CYP11A1: Nr. HS00167984_M1

2.6 Proteinuntersuchungen

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine aufgetrennt, nachgewiesen und semiquantifiziert werden. Das Prinzip: Proteine werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mittels spezifischer Antikörper können dann einzelne Proteine detektiert werden. Das Prinzip des Elektrobloottransfers von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen wurde von Towbin [100] eingeführt. Durch Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern können sie dort sichtbar gemacht werden.

2.6.1 Proteinprobenaufbereitung

Zur Vorbereitung für den eigentlichen Western Blot mussten die Proteine aus den Zellen gewonnen werden. Dazu wurde nach der Laemmli-Methode [101] vorgegangen. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert, die Pellets mit eiskaltem DPBS gewaschen und anschließend zusammen mit dem Lysispuffer (10 ml Glycerin 8,7 %; 12,5 ml Upper Tris, pH 6,7; 30 ml SDS 10 %; 250 mg Bromphenolblau; 5 ml beta-Mercaptoethanol; ad 100 ml H₂O) für fünf Minuten bei 96 °C zur Proteindenaturierung erhitzt. Das Verhältnis von Zellen zu Puffer betrug zwei Millionen Zellen in 200 µl Lämmli-Puffer. Das im Puffer enthaltene SDS ist ein amphiphatisches Detergenz, das zu einer starken negativen Ladung der Proteine führt. Aufgrund dieser negativen Ladung wird die eigene Ladung der einzelnen Proteine maskiert, so dass die elektrophoretische Auftrennung in der Gelelektrophorese entsprechend dem Molekulargewicht erfolgt (siehe 2.6.2).

2.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Zunächst durchlaufen die Proteine ein Sammelgel und anschließend das eigentliche Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine aufgrund eines schwach sauren pH-Wertes (pH 6,8) und der Wechselwirkung mit Pufferionen konzentriert, bevor sie das engporige, leicht

alkalische (pH 8,8) Trenngel erreichen und entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Anleitung für ein Gel

Trenngel: 10%iges Acrylamidgel (Biorad)

- Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2 ml
- Lower buffer pH 8,8	1,875 ml
- H ₂ O	3,125 ml
- TEMED	7,5 µl
- APS 10 % (Ammoniumpersulfat)	70 µl

Sammelgel: 5%iges Polyacrylamidgel

- Acrylamid/Bisacrylamid	1,2 ml
- Upper buffer pH 6,8	2,25 ml
- H ₂ O	1,875 ml
- TEMED	4 µl
- APS	30 µl

4x **Lower buffer** pH 8,8: 4 g SDS, 181,72 g Tris ad 1000 ml ddH₂O

4x **Upper buffer** pH 6,8: 2 g SDS, 30,28 g Tris ad 1000 ml ddH₂O

Für die Gelelektrophorese wurde das System BioRad Mini Protean II verwendet. Die Glasplatten wurden zunächst mit Mucosol-Schnellreiniger gereinigt und fest mit Halterungen in das System eingespannt. Die Bestandteile des Trenngels wurden zusammenpipettiert. Um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern, wurde APS und TEMED erst kurz vor dem Gießen zugegeben. Anschließend wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten bis etwa 2 cm unter den Rand gegossen. Das Trenngel wurde dann mit H₂O überschichtet bis zur Polymerisation des Gels. H₂O wurde abgegossen und schließlich das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm als Taschenformer (75 mm Dicke) eingesetzt.

Nach erneutem Abwarten der Polymerisation konnte der Kamm entfernt und die zu analysierenden Proben (20 µl) in die Taschen gegeben werden. Als Größenstandard wurde der Marker β-Aktin zugegeben und die Gelkammern mit

Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 15 Minuten bei 80 V im Sammelgel und zwei Stunden bei 120 V im Trenngel.

Elektrophorese Puffer: 15,1 g Tris, 94 g Glycin, 50 ml 10 % SDS,
ad 1000 ml ddH₂O

2.6.3 Proteintransfer „Western Blot“

Mittels „Semi-dry Blot“ wurde das eigentliche Blotten durchgeführt (TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad), bei dem die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Der Elektrophoreseprozess wurde gestoppt, das Gel vorsichtig aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und das Sammelgel entfernt. Gel-Blotting-Papier und Nitrozellulosemembran wurde auf eine dem Gel entsprechende Größe zugeschnitten, die Membran und die Filterpapiere in Transferpuffer getränkt. Zehn Schichten feuchtes Papier wurden möglichst luftblasenfrei auf die Anode gelegt, darauf die Membran, das Gel und schließlich wieder zehn Schichten Papier. Während des Proteintransfers (zwei Stunden bei 25 V) wandern die SDS-geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode vom Gel auf die Membran, wo sie haften bleiben.

Semidry-Puffer: 2,905 g Tris, 1,465 g Glycin, 1,85 ml 10 % SDS,
100 ml Methanol ad 500 ml ddH₂O

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran anschließend mit Poncerau-Lösung gefärbt und schließlich die Lösung wieder mit DPBS ausgewaschen. 5 % Magermilch in TBS wurden mit 0,1 % Tween 20 (=TTBS) angesetzt und damit die Membran für eine Stunde abgesättigt.

2.6.4 Färbung mit spezifischen Antikörpern

Als Erstantikörper gegen HSD3B2 wurde der Antikörper R1484 von Ian Mason (Edinburgh, [102]) in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet, der CYP11B1-Antikörper wurde von Hiroshi Takemori (National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan, [103]) zur Verfügung gestellt und 1:1000 verdünnt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran über Nacht mit dem jeweiligen

Erstantikörper inkubiert, am nächsten Tag mit TBS gewaschen und schließlich vor erneutem Waschen ein Zweitantikörper (Anti-rabbit IgG, GE-Healthcare, Verdünnung 1:1000) für eine Stunde auf die Membran gegeben.

Die Antikörperbindung wurde mittels ECL (enhanced chemiluminescent) sichtbar gemacht. Dafür ist am Zweitantikörper das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, das die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert. Dadurch wird Luminol in einen angeregten Zustand gebracht. Beim Übergang in den Grundzustand wird Licht freigesetzt, diese Lichtemission führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms, so dass sich die spezifischen Protein-Antikörperbindungen als Bandenmuster darstellen.

Als ECL-Lösung wurden die ECL-Western blotting detection reagents der Firma Amersham verwendet. In der Dunkelkammer wurde ein Film (Fuji Super Rx) belichtet. Die Dauer der Belichtung (1-5 Sekunden) richtete sich nach der Signalstärke.

Die Auswertung der Blots erfolgte nach dem Einscannen der Filme mit BioDoc Analyse (Biometra, Göttingen) mit dem Computerprogramm JImage (NIH, Bethesda) und Normalisierung gegen β -Aktin als Kontrolle.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden in Triplets angesetzt und bis auf die ID/GC-MS mindestens dreimal reproduzierbar durchgeführt. Für die statistische Auswertung und zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gemessenen Zellzahlen bzw. Hormonkonzentration der einzelnen Versuche prozentual im Vergleich zum Mittelwert der unbehandelten Kontrollzellen ausgedrückt. Dargestellt wird jeweils ein repräsentativer Versuch (Triplikate) als Mittelwert \pm Standardabweichung, wobei 100 % definitionsgemäß dem Mittelwert der unbehandelten Kontrollzellen entspricht.

Signifikanzen wurden mittels One-Way-ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test berechnet (Graphpad Prism 3.02). Ein $p < 0,05$ (*) wurde als signifikant angesehen, $p < 0,01$ (**) als hochsignifikant.

3 Ergebnisse

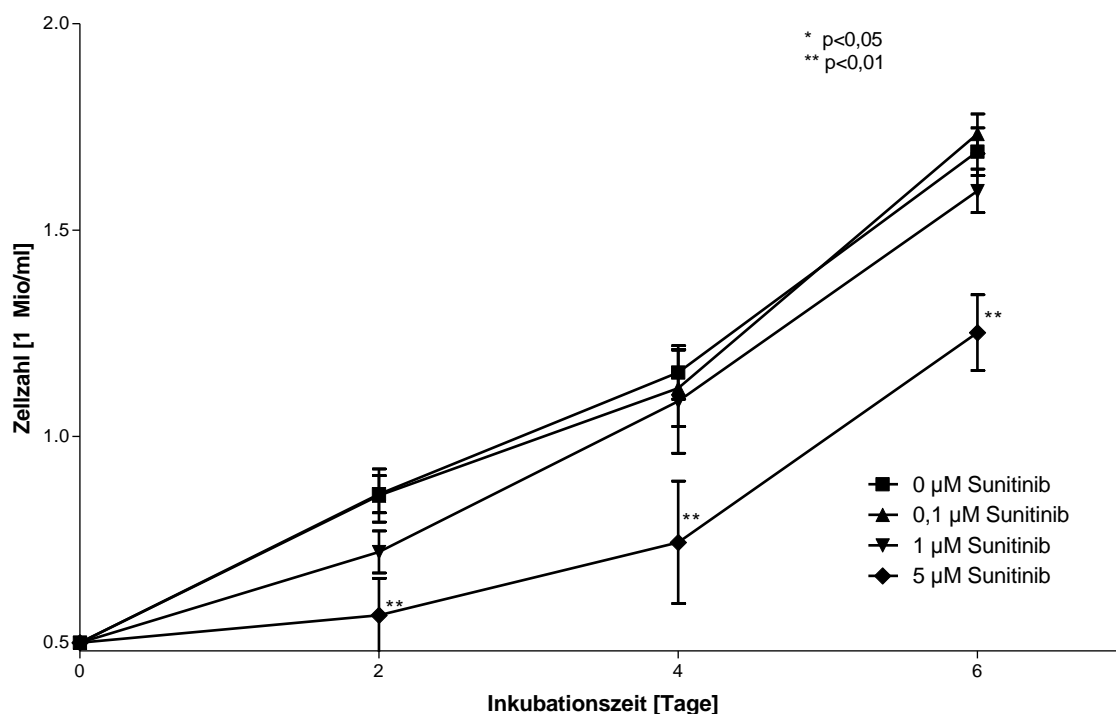
3.1 Wirkung von Sunitinib auf die Zellproliferation

Zur Evaluierung einer potentiellen Therapieoption beim Nierenkarzinom wurden die Nierenkarzinomzelllinien NCI-h295 und SW-13 mit steigenden Sunitinibkonzentrationen behandelt und der Effekt auf die Zellproliferation untersucht.

3.1.1 Wachstumskurven

Bei den Zellzählungen von NCI-h295-Zellen zeigte sich im Verlauf über mehrere Tage eine signifikante Proliferationshemmung durch hohe (5 μM) Konzentrationen von Sunitinib. Bei niedrigeren Konzentrationen fand sich keine signifikante Hemmung (siehe Diagramm 1).

Diagramm 1: Wachstumskurven von NCI-h295-Zellen unter Sunitinib



Am Tag 0 wurden NCI-h295-Zellen 500.000 Zellen/ml ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib inkubiert, manuelle Zellzählungen in der Neubauer-Zählkammer folgten nach zwei, vier und sechs Tagen, Werte angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

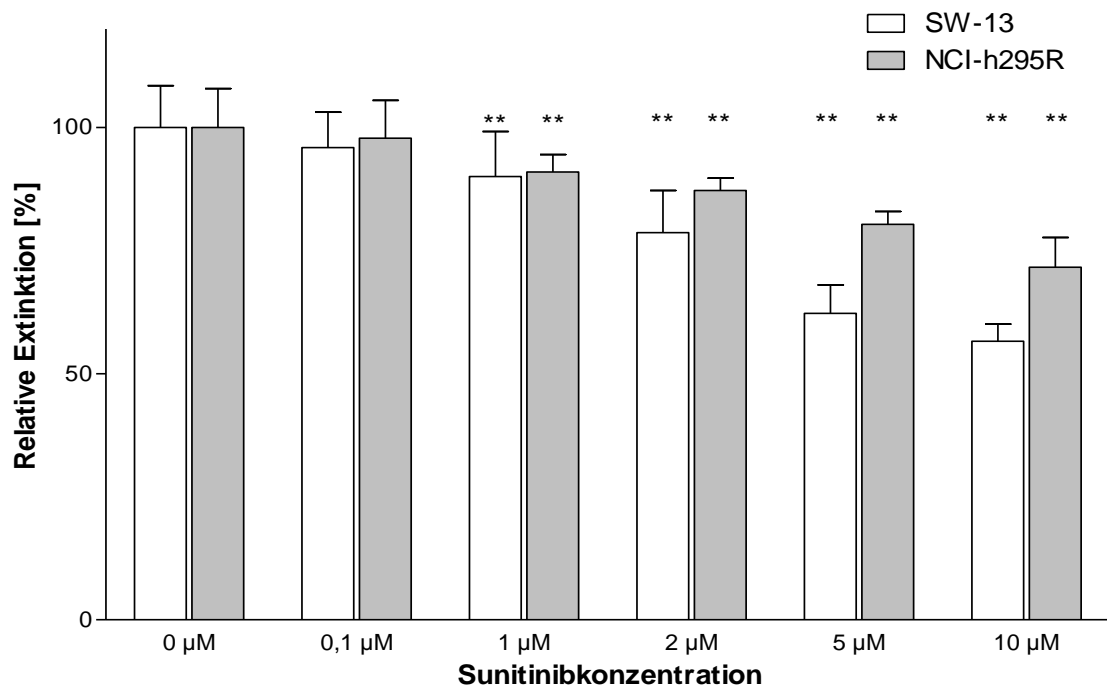
Prozentual ausgedrückt fiel nach zwei Tagen Inkubation mit 5 μM Sunitinib mit $65,9 \pm 10,4 \%$ ** eine deutlich niedrigere Zellzahl auf im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($100 \pm 5,2 \%$; 1 μM Sunitinib $99,6 \pm 7,5 \%$; 1 μM Sunitinib $83,7 \pm 5,9 \%$).

Auch nach vier und sechs Tagen blieb dieses Verhältnis der Zellzahlen etwa konstant: Nach vier Tagen Inkubation: 0,1 μM Sunitinib $96,7 \pm 8,0 \%$; 1 μM Sunitinib $93,9 \pm 10,9 \%$; 5 μM Sunitinib $64,3 \pm 12,8 \%$ **; unbehandelte Kontrollen $100 \pm 5,6 \%$. Nach sechs Tagen Inkubation: 0,1 μM Sunitinib $102,6 \pm 2,8 \%$; 1 μM Sunitinib $94,4 \pm 3,1 \%$; 5 μM Sunitinib $74,1 \pm 5,4 \%$ **; unbehandelte Kontrollen $100 \pm 3,4 \%$. ** $p < 0,01$

3.1.2 MTT-Tests

Als weiterer Proliferationstest wurden MTT-Tests durchgeführt. Hier zeigte sich sowohl bei der NCI-h295R- als auch bei der hormoninaktiven SW-13-Zelllinie eine signifikante dosisabhängige Abnahme der gemessenen Extinktion und damit der vitalen Zellen nach fünf Tagen Inkubation ab einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM (siehe Diagramm 2 und Tabelle 4).

Diagramm 2: MTT-Tests nach Inkubation mit Sunitinib



Adhärente NCI-h295-R- und SW13-Zellen wurden für fünf Tage mit steigenden Dosen Sunitinib inkubiert und anschließend ein MTT-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte im Vergleich zu den Kontrollen \pm Standardabweichung. ** $p < 0,01$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Tabelle 4: MTT-Tests nach Inkubation mit Sunitinib

	Kontrolle	0,1 µM Sunitinib	1 µM Sunitinib	2 µM Sunitinib	5 µM Sunitinib	10 µM Sunitinib
NCI-h295R	100 ± 7,9	97,8 ± 7,7	91,0 ± 3,6	87,2 ± 2,5	80,4 ± 2,6	71,6 ± 6,1
SW-13	100 ± 8,5	95,9 ± 7,2	90,0 ± 9,2	78,6 ± 8,6	62,3 ± 5,8	56,6 ± 3,4

MTT-Tests nach fünftägiger Inkubation mit Sunitinib, Werte angegeben als Mittelwert der gemessenen Extinktion in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen \pm Standardabweichung. $p < 0,01$ ab 1 µM Sunitinib im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

3.2 Wirkung von Sunitinib auf die Steroidogenese

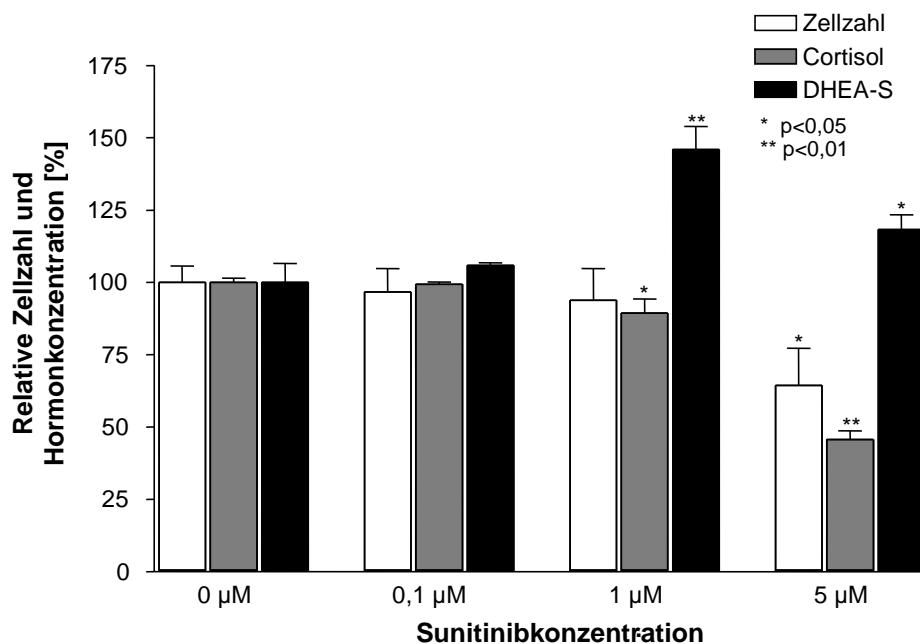
Da bei Nebennierenkarzinomen neben der Tumormasse häufig auch Hormonexzesse für die Morbidität und Mortalität mit verantwortlich sind, soll im Folgenden der Einfluss von Sunitinib auf die Steroidogenese untersucht werden. In sämtlichen Versuchen zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Cortisol synthese und Anreicherung von Steroidvorstufen unter hohen Dosen Sunitinib.

3.2.1 Hormonanalysen nach vier Tagen Sunitinib-Behandlung

Orientierende Cortisolmessungen im Zellkulturmedium nach mehreren Stunden, einem und zwei Tagen Sunitinib-Behandlung ergaben keine deutlich sichtbaren Effekte. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse nach vier Tagen Sunitinib-Behandlung dargestellt.

Diagramm 3 und Tabelle 5 geben einen Überblick über Zellzahl, Cortisol- und DHEA-S-Konzentration (gemessen mittels Immulite 2000) bei NCI-h295-Zellen nach viertägiger Sunitinib-Inkubation. Dosisabhängig findet sich ein Abfall der Cortisol-Konzentration bis auf 45,7 % bei 5 μ M Sunitinib und ein Anstieg der DHEA-S-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

Diagramm 3: Hormonbestimmungen nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib



NCI-h295-Zellen wurden für vier Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen Sunitinib inkubiert, die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, die zellulären Bestandteile abzentrifugiert und die Konzentration der Hormone im Medium mittels Immulite 2000 bestimmt, dargestellt eine repräsentative Versuchsreihe als Mittelwert \pm Standardabweichung prozentual zu den Messergebnissen der unbehandelten Kontrollzellen; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Tabelle 5: Übersicht Hormonkonzentration nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib

	Zellzahl	Cortisol	DHEA-S
Kontrolle	100,0 \pm 5,6 (=1,155 Mio/ml)	100,0 \pm 1,5 (=276 µg/dl)	100,0 \pm 6,6 (=25,0 µg/dl)
0,1 µM Sunitinib	96,7 \pm 8,0	99,4 \pm 0,7	105,9 \pm 0,8
1 µM Sunitinib	93,9 \pm 10,9	89,4 \pm 4,9*	145,9 \pm 7,9**
5 µM Sunitinib	64,4 \pm 12,8**	45,7 \pm 3,0**	118,3 \pm 5,1*

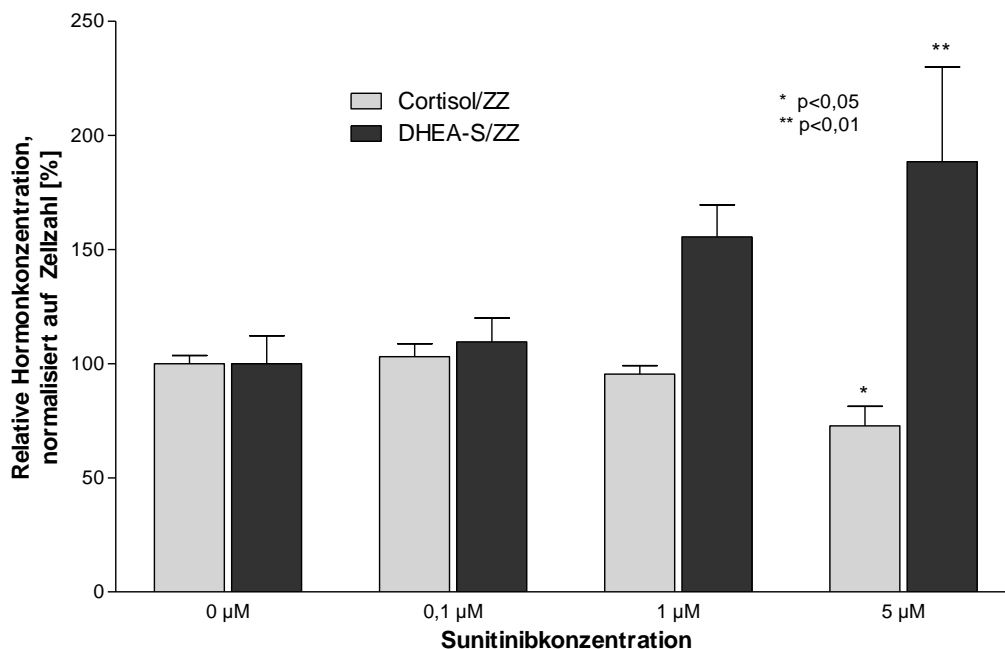
Übersicht über die Hormonkonzentrationen nach vier Tagen Sunitinib-Inkubation, gemessen mittels Immulite 2000. Die Zellzahl wurde mittels Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung prozentual zu den Ergebnissen der unbehandelten Kontrollzellen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Normiert man die Hormone auf die Zellzahl (Hormonkonzentration/eine Million Zellen in Prozent zu den Messergebnissen der unbehandelten Kontrollzellen), nimmt Cortisol nach Sunitinibbehandlung dosisabhängig auch in Relation zur Zellzahl ab: 0,1 μM Sunitinib $103,1 \pm 9,8 \%$; 1 μM Sunitinib $95,4 \pm 6,5 \%$; 5 μM Sunitinib $72,8 \pm 14,8 \%^*$; im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen $100,0 \pm 5,6 \%$. * $p < 0,05$.

Das Androgen DHEA-S reichert sich dagegen im Vergleich zur Zellzahl dosisabhängig an: 0,1 μM Sunitinib $109,6 \pm 10,4 \%$; 1 μM Sunitinib $155,6 \pm 14,0 \%$; 5 μM Sunitinib $188,5 \pm 41,6 \%^{**}$; im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen $100,0 \pm 12,3 \%$. ** $p < 0,01$.

Man erkennt, dass die Cortisolkonzentration nach Sunitinibbehandlung deutlich stärker abnimmt als die Zellzahl, so dass die beobachteten Effekte nicht alleine auf die geringere Zellzahl unter 5 μM Sunitinib zurückgeführt werden können. Auch die Schwankungen von DHEA-S lassen sich durch die Hemmung der Zellproliferation nicht ausreichend erklären (siehe Diagramm 4).

Diagramm 4: Cortisol- und DHEA-S Konzentration normiert auf die Zellzahl



Hormonkonzentration/eine Million Zellen nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung im Vergleich zu den Messergebnissen der unbehandelten Kontrollzellen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen.

Unabhängig von der Zellzahl ist der Vergleich des Verhältnisses zwischen dem Androgen DHEA-S und dem Endprodukt Cortisol. Es ändert sich folgendermaßen: 0,1 μM Sunitinib $1,07 \pm 0,0003$; 1 μM Sunitinib $1,63 \pm 0,05^{**}$; 5 μM Sunitinib $2,59 \pm 0,10^{**}$, wobei das Verhältnis DHEA-S/Cortisol der Kontrollen auf 1 festgelegt wurde, $** p < 0,01$. Ein ansteigender Quotient deutet auf eine Hemmung der Steroidsynthese auf einer zwischen diesen beiden Hormonen gelegenen Ebene hin.

3.2.2 Hormonanalyse nach Stimulation mit Forskolin

Die beobachteten Effekte von Sunitinib auf die Steroidbiosynthese ließen sich auch in den Stimulationsversuchen mit Forskolin bestätigen: Dosisabhängig nimmt die Cortisol-Konzentration im Zellkultur-Medium nach Sunitinib-Behandlung ab, während sich Vorläufersubstanzen anreichern. Im Folgenden werden die einzelnen Hormone Cortisol, DHEA-S, 17-OH-Progesteron und Androstendion genauer betrachtet. Dabei wurden Cortisol und DHEA-S mittels Immulite 2000 bestimmt, 17-OH-Progesteron und Androstendion mittels Radioimmunoassay. Einen Überblick über die gemessenen Hormonkonzentrationen gibt Tabelle 6.

Der hemmende Effekt von Sunitinib auf die Cortisolsynthese bestätigte sich auch nach Stimulation mit Forskolin. Noch deutlicher wurde die dosisabhängige Anreicherung von Vorläuferhormonen wie DHEA-S und Androstendion, der nun auch unabhängig von der Zellzahl nach Stimulation der Steroidogenese deutlich zu sehen ist.

Auf eine graphische Darstellung dieser Daten wird verzichtet, da in dieser Arbeit auch eine Steroidanalyse mittels der exakteren Methode ID/GC-MS durchgeführt wird (vgl. Kap. 3.2.3).

Tabelle 6: Übersicht über die Steroidhormone nach drei Tagen Inkubation mit Sunitinib und Stimulation mit Forskolin

		<i>Kontrolle</i>	<i>1 µM Sunitinib</i>	<i>5 µM Sunitinib</i>
Cortisol (100 % = 171 µg/dl)	Basal	100,0 ± 9,0	83,7 ± 9,6	46,3 ± 3,4**
	10 µM FSK	247,1 ± 18,3	246,3 ± 21,4	114,6 ± 17,7**
DHEA-S (100 % = 15,5 µg/dl)	Basal	100,0 ± 6,4	126,7 ± 16,5	138,8 ± 26,2
	10 µM FSK	115,8 ± 7,9	167,5 ± 13,5*	238,8 ± 26,8**
17-OH-P (100 % = 34,9 ng/ml)	Basal	100,0 ± 12,3	113,4 ± 17,6	74,2 ± 10,0
	10 µM FSK	124,7 ± 8,2	172,5 ± 11,13**	167,7 ± 12,0**
Androstendion (100 % = 278 ng/ml)	Basal	100,0 ± 17,9	125,5 ± 41,4	73,7 ± 7,0
	10 µM FSK	138,7 ± 41,1	197,8 ± 5,6	222,0 ± 9,6*

*NCl-h295-Zellen wurden für drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib inkubiert, simultan wurde die Steroidogenese mit 10 µM Forskolin (FSK) stimuliert. Die zellulären Bestandteile wurden abzentrifugiert und anschließend die Hormon-Konzentrationen im Medium mittels Immulite 2000 (Cortisol, DHEA-S) bzw. RIA (17-OH-P, Androstendion) bestimmt. Werte angegeben als Mittelwert prozentual zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01 verglichen mit unbehandelten Kontrollen bzw. alleiniger FSK-Stimulation.*

3.2.3 Steroidprofil

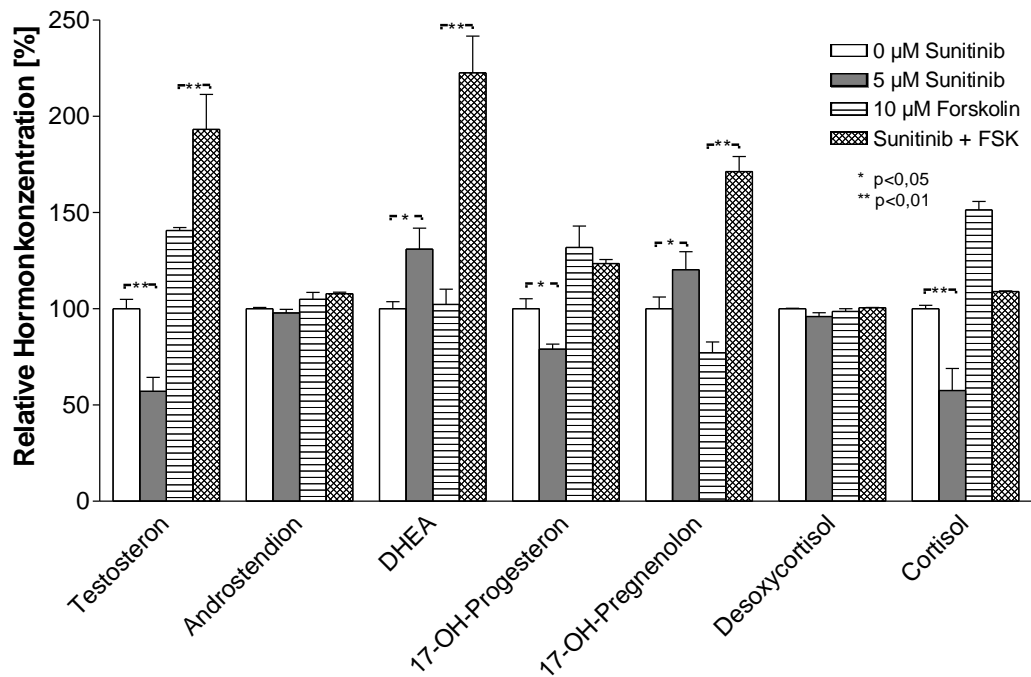
Beim gaschromatographischen Steroidprofil mittels ID/GC-MS können mehrere Steroidhormone in einem Analysedurchlauf bestimmt werden (siehe 2.4.3). Auf die Messwerte der Androgene Testosteron, Dihydrotestosteron und Androstendiol wird hier nicht näher eingegangen, da sie keine typischen Nebennierenhormone sind. Sie wurden im Steroidprofil mitanalysiert, die Konzentrationen waren variabel, teilweise nur knapp über der Nachweisgrenze, teilweise auch darunter.

Steroidprofil nach Forskolin-Stimulation

Auf Grund der deutlichen Vorergebnisse (vgl. Kap. 3.2.2) wurde orientierend zunächst eine repräsentative Versuchsreihe nach hohen Konzentrationen Sunitinib und gleichzeitiger Forskolin-Stimulation mittels ID/GC-MS analysiert. Dabei bestätigte sich bei den Endhormonen Cortisol und Testosteron eine signifikante und deutliche Abnahme nach Sunitinibbehandlung, während sich Vorläufersubstanzen wie DHEA und 17-OH-Pregnenolon signifikant anreichern.

Die Anreicherung der Vorläufersubstanzen verdeutlichte sich noch nach Stimulation der Glukokortikoidsynthese mit Forskolin (vgl. Diagramm 5 und zugehörige Tabelle 7).

Diagramm 5: Steroidprofil von NCI-h295-Zellen nach drei Tagen Inkubation mit Sunitinib und Stimulation mit Forskolin (FSK)



Das Steroidprofil (ID/GC-MS) von NCI-h295-Zellen nach drei Sunitinib- und Forskolininkubation. Werte angegeben als Mittelwert prozentual zu den unbehandelten Kontrollzellen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen bzw. alleiniger FSK-Stimulation. Von dem Versuchstriplett FSK/5 μ M Sunitinib konnte nur ein Cortisol-Wert ausgewertet werden, so dass dafür keine Standardabweichung und kein Signifikanzniveau angegeben werden kann.

Tabelle 7: Übersicht Steroidprofil nach Forskolinstimulation

	Testo- steron	Andro- stendion	DHEA	17-OH- P	17-OH- Preg	Desoxy- cortisol	Cortisol
Kontrolle	100,0 ± 4,9 <i>(=5,1 ng/ml)</i>	100,0 ± 0,7 <i>(=16,4 ng/ml)</i>	100,0 ± 3,6 <i>(=9,6 ng/ml)</i>	100,0 ± 5,2 <i>(=5,8 ng/ml)</i>	100,0 ± 6,1 <i>(=22,1 ng/ml)</i>	100,0 ± 0,2 <i>(=32,4 ng/ml)</i>	100,0 ± 1,7 <i>(1246,8 ng/ml)</i>
5 µM Sunitinib	57,1 ± 7,2**	97,8 ± 1,9	131,0 ± 10,9*	78,9 ± 2,7*	120,2 ± 9,4*	96,0 ± 2,0	57,6 ± 11,4**
10 µM FSK	140,67 ± 1,5	104,9 ± 3,6	102,2 ± 7,9	131,8 ± 11,1	77,2 ± 5,6	98,6 ± 1,4	151,3 ± 4,4
10 µM FSK/ 5 µM Sunitinib	193,2 ± 18,1**	107,8 ± 0,8	222,6 ± 19,0**	123,5 ± 2,1	171,3 ± 7,8**	100,6 ± 0,1	108,9

Übersicht über das Steroidprofil (ID/GC-MS) nach Inkubation mit 5 µM Sunitinib und 10 µM Forskolin (FSK), angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen bzw. alleiniger FSK-Stimulation. In Klammern die gemessenen Absolutwerte der Hormonkonzentrationen bei den Kontrollzellen. Von dem Versuchstriplett FSK/5 µM Sunitinib konnte nur ein Cortisol-Wert ausgewertet werden, so dass dafür keine Standardabweichung und kein Signifikanzniveau angegeben werden kann.

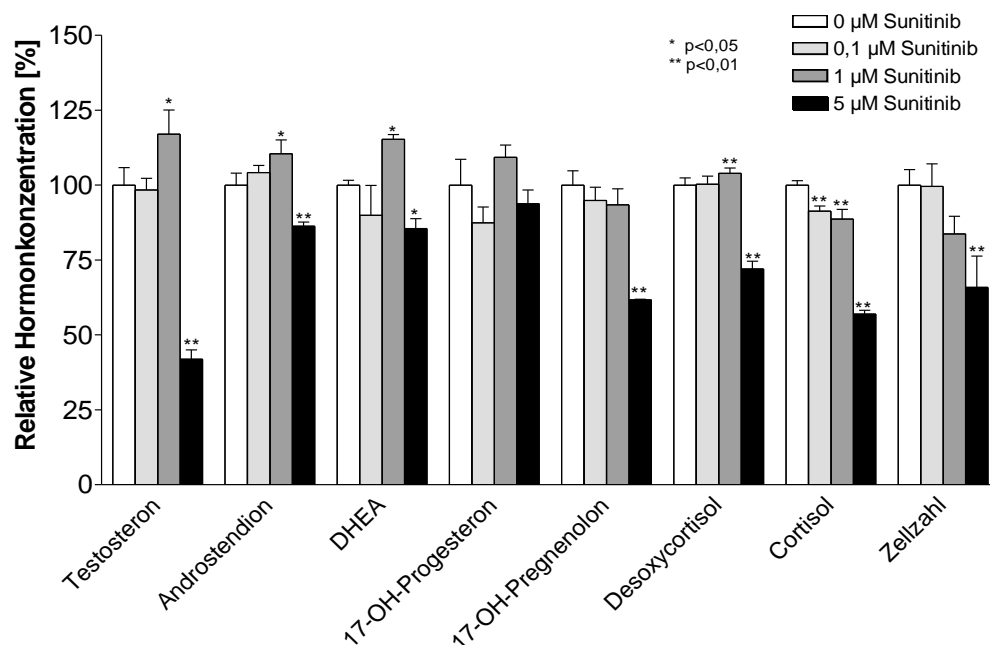
Dosisabhängiges Steroidprofil

Zum Unterstreichen der Ergebnisse der Forskolin-stimulierten Steroidversuche wurde je eine weitere Versuchsreihe mit Proben nach zwei und vier Tagen Sunitinib-Inkubation mittels Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie (ID/GC-MS) analysiert.

Nach zwei Tagen zeigt sich deutlich eine Hemmung von Testosteron, 17-OH-Pregnenolon, Desoxycortisol und Cortisol unter 5 µM Sunitinib, die zwar im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, nicht aber in Korrelation zur Zellzahl signifikant ist (siehe Diagramm 6 und Tabelle 8: Steroidprofil nach zwei Tagen Inkubation mit Sunitinib).

Nach vier Tagen dagegen reichern sich ab einer Konzentration von 1 µM deutlich weitere Vorläufersubstanzen (Androstendion, DHEA, 17-OH-Pregnenolon) an, während die gemessenen Cortisolkonzentrationen signifikant abnehmen (siehe Diagramm 7 und Tabelle 9: Steroidprofil nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib).

Diagramm 6: Steroidprofil nach zwei Tagen Inkubation mit Sunitinib



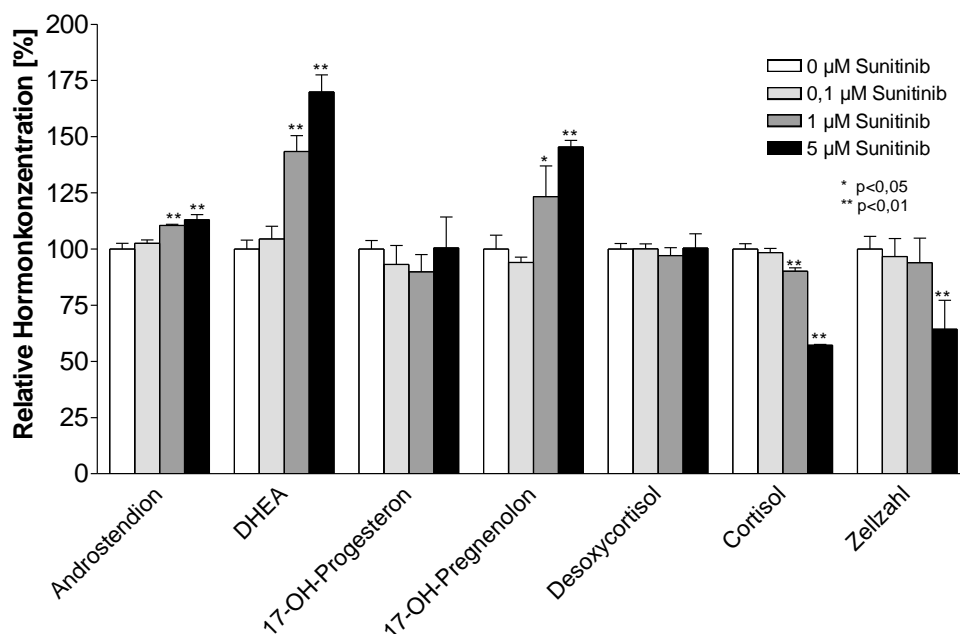
Das Steroidprofil (ID/GC-MS) von NCI-h295-Zellen nach zwei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib, Mittelwerte dargestellt prozentual im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Zum Vergleich ist die Zellzahl mit dargestellt. * p < 0,05; ** p < 0,01 verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Tabelle 8: Steroidprofil nach zwei Tagen Inkubation mit Sunitinib

	Testo- steron	Andro- stendion	DHEA	17-OH- P	17-OH- Preg	Desoxy- cortisol	Cortisol
Kontrolle	100,0 ± 5,8 <i>(=2,1 ng/ml)</i>	100,0 ± 4,0 <i>(=21,1 ng/ml)</i>	100,0 ± 1,6 <i>(=5,0 ng/ml)</i>	100,0 ± 8,6 <i>(=5,0 ng/ml)</i>	100,0 ± 4,8 <i>(=9,0 ng/ml)</i>	100,0 ± 2,4 <i>(=49,8 ng/ml)</i>	100,0 ± 1,5 <i>(=1298 ng/ml)</i>
0,1 µM Sunitinib	98,4 ± 3,9	104,2 ± 2,4	89,9 ± 10,0	87,4 ± 5,3	94,9 ± 4,4	100,3 ± 2,7	91,3 ± 1,7**
1 µM Sunitinib	117,0 ± 8,1*	110,3 ± 4,6*	115,3 ± 1,6*	109,3 ± 4,1	93,4 ± 5,4	103,9 ± 1,8**	88,7 ± 3,2**
5 µM Sunitinib	41,8 ± 3,1**	87,4 ± 1,4**	85,5 ± 3,3*	93,8 ± 4,6	61,7 ± 0,2**	72,0 ± 2,6**	57,0 ± 1,2**

Übersicht über das Steroidprofil (ID/GC-MS) von NCI-h295-Zellen nach zwei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib, angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. * p < 0,05; ** p < 0,01 verglichen mit unbehandelten Kontrollen. In Klammern die gemessenen Absolutwerte der Hormonkonzentrationen bei den Kontrollzellen.

Diagramm 7: Steroidprofil nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib



Das Steroidprofil (ID/GC-MS) von NCI-h295-Zellen nach vier Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib, Mittelwerte dargestellt prozentual im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Zum Vergleich ist die Zellzahl mit dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

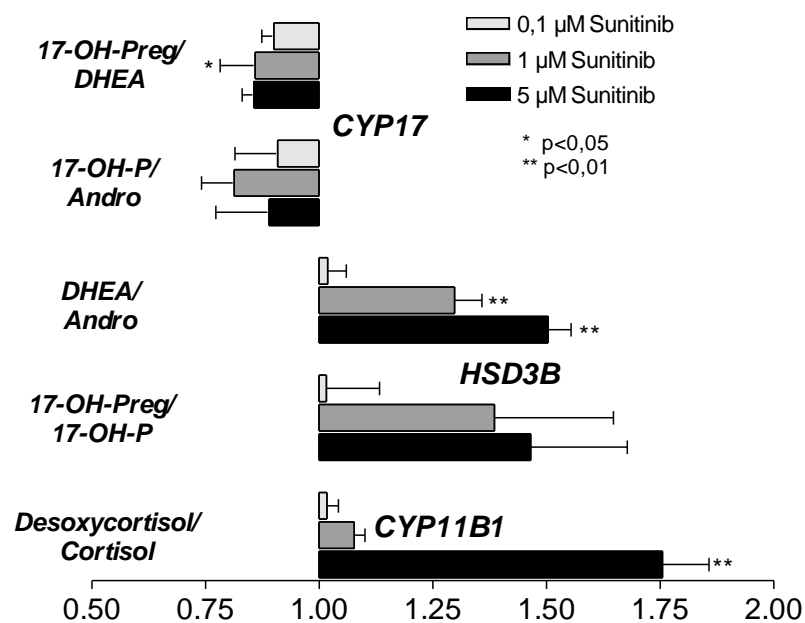
Tabelle 9: Steroidprofil nach vier Tagen Inkubation mit Sunitinib

	Testosteron	Androstendion	DHEA	17-OH-P	17-OH-Preg	Desoxycortisol	Cortisol
Kontrolle	100,0 ± 8,2 (=4,3 ng/ml)	100,0 ± 2,6 (=25,8 ng/ml)	100,0 ± 3,9 (=11,0 ng/ml)	100,0 ± 3,8 (=6,3 ng/ml)	100,0 ± 6,2 (15,0 ng/ml)	100,0 ± 2,5 (=53,45 ng/ml)	100,0 ± 2,4 (=2742 ng/ml)
0,1 µM Sunitinib	96,1 ± 6,9	102,6 ± 1,5	104,5 ± 5,6	93,1 ± 8,5	94,0 ± 2,4	100,1 ± 2,3	98,4 ± 1,9
1 µM Sunitinib	119,1 ± 1,5	110,5 ± 0,6**	143,4 ± 7,0**	89,9 ± 7,7	123,3 ± 13,7*	97,1 ± 3,5	90,1 ± 1,5**
5 µM Sunitinib	89,9 ± 4,7	113,0 ± 2,4**	169,9 ± 7,5**	100,5 ± 13,8	145,4 ± 3,0**	100,4 ± 6,4	57,2 ± 0,3**

Übersicht über das Steroidprofil (ID/GC-MS) von NCI-h295-Zellen nach vier Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib, angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen. In Klammern die gemessenen Absolutwerte der Hormonkonzentrationen bei den Kontrollzellen.

Insbesondere nach 4-tägiger Sunitinibinkubation fand sich also ein deutlicher Anstieg der Precursor-Hormone DHEA und 17-OH-Preg mit einem statistisch signifikanten Abfall der Cortisolproduktion. Um eine genauere Vorstellung zu bekommen, auf welcher Ebene die beobachteten Effekte liegen, wurden Hormonquotienten berechnet. Hierzu wurde jeweils das Vorläuferhormon im Verhältnis zum Edukt gesetzt, z. B. 17-OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron als indirekter Hinweis für die Aktivität der HSD3B2. Ein im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (=1) ansteigender Quotient deutet dabei auf eine Hemmung des jeweiligen Enzyms hin (siehe Diagramm 8).

Diagramm 8: Veränderungen der Hormonquotienten nach Inkubation mit Sunitinib



Berechnete Hormonquotienten nach vier Tagen Sunitinib-Inkubation, jeweils Vorläuferhormon zu Endprodukt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (=1,0) \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Die betroffenen Enzyme sind mitbenannt.

Die berechneten Ratios deuten auf eine zumindest partielle Hemmung der HSD3B (Anstieg des Quotienten DHEA/Androstendion: 0,1 µM Sunitinib: $1,02 \pm 0,04$; 1 µM: $1,30 \pm 0,06^{**}$; 5 µM: $1,5 \pm 0,05^{**}$, ** $p < 0,01$ bzw. 17-OH-Preg/17-OH-P: 0,1 µM: $1,02 \pm 0,12$; 1 µM: $1,34 \pm 0,26$; 5 µM: $1,46 \pm 0,21$) sowie von CYP11B1 (signifikanter Anstieg des Quotienten Desoxycortisol/Cortisol unter 5 µM Sunitinib auf $1,76 \pm 0,10$; $p < 0,01$), während zum Beispiel CYP17 nicht beeinflusst wird.

3.3 Wirkung von Sunitinib auf Enzyme der Steroidogenese

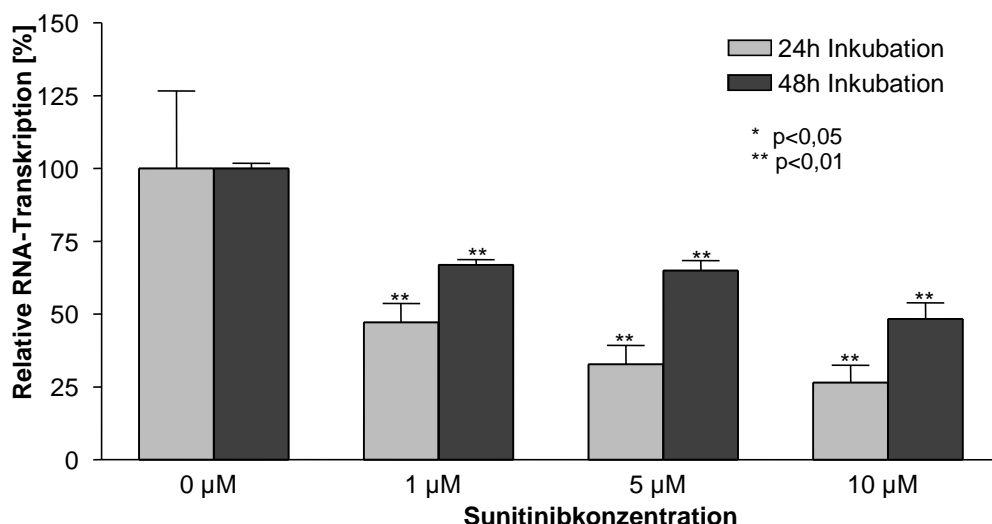
3.3.1 Einfluss auf die 3 β -Hydrosteroiddehydrogenase

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse (ID/GC-MS) geben Hinweise darauf, dass Sunitinib eine Hemmung der Steroidogenese auf Ebene der HSD3B2 bewirkt. Eine direkte Hemmung des Enzyms konnte mittels Hefe-Mikrosomen-Assay ausgeschlossen werden (durchgeführt am Institut von Prof. Dr. Wiebke Arlt in Birmingham, Details zur Methodik siehe [104]).

Mittels Real-time-PCR konnte eine Transkriptionshemmung für HSD3B unter Sunitinib auf RNA-Ebene bestätigt werden: NCI-h295-Suspensionszellen wurden für 24 und 48 Stunden mit Sunitinib inkubiert, anschließend die RNA extrahiert und eine quantitative Real-time-PCR zur Quantifizierung der in den Zellen vorhandenen HSD3B2-mRNA durchgeführt.

Hier zeigte sich dosisabhängig ein deutlicher Abfall der RNA für HSD3B2 bereits nach 24 Stunden (siehe Diagramm 9 und Tabelle 10). Als Referenzgen wurde gegen β -Aktin normalisiert.

Diagramm 9: RTq-PCR HSD3B nach Inkubation mit Sunitinib



Quantifizierung der mRNA für HSD3B bei NCI-h295-Zellen nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Sunitinib, Mittelwerte \pm Standardabweichung, prozentual im Vergleich zu den Mittelwerten der unbehandelten Kontrollzellen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

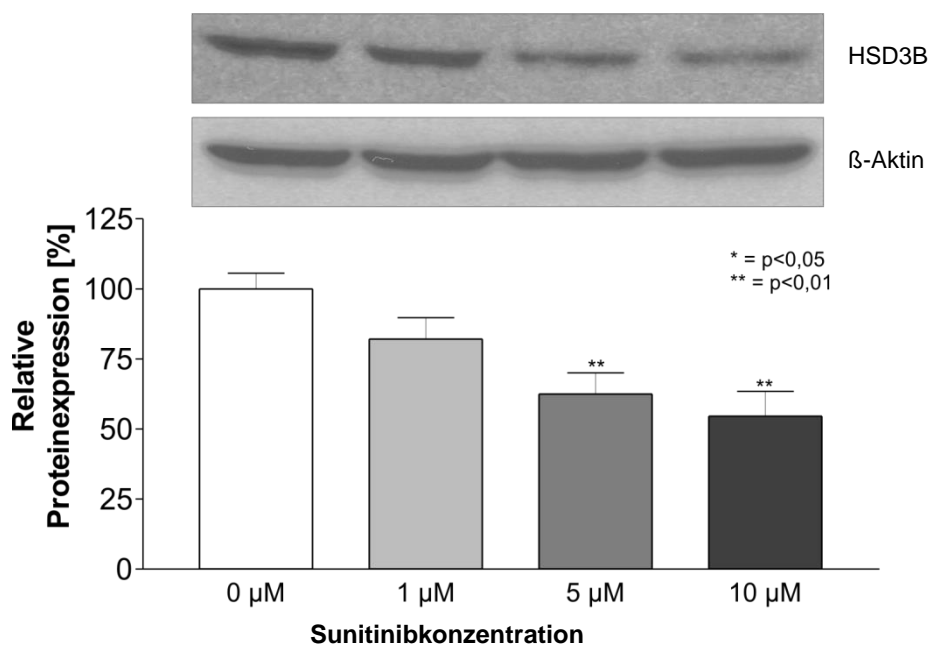
Tabelle 10: HSD3B-RNA nach 24 und 48 Stunden Sunitinib-Inkubation

	24 h	48 h
Kontrolle	100,0 ± 26,6	100,0 ± 3,0
1 µM Sunitinib	47,2 ± 6,6	67,0 ± 3,2
5 µM Sunitinib	32,8 ± 6,5	65,1 ± 5,6
10 µM Sunitinib	26,6 ± 5,9	48,8 ± 9,1

Quantifizierung der mRNA für HSD3B bei NCI-295-Suspensionszellen nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit Sunitinib, angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. Alle Ergebnisse $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Auf Proteinebene konnte dieser dosisabhängige Effekt mittels Western Blot für die HSD3B bestätigt werden (siehe Diagramm 10).

Diagramm 10: Western Blot HSD3B nach 24 Stunden Inkubation mit Sunitinib



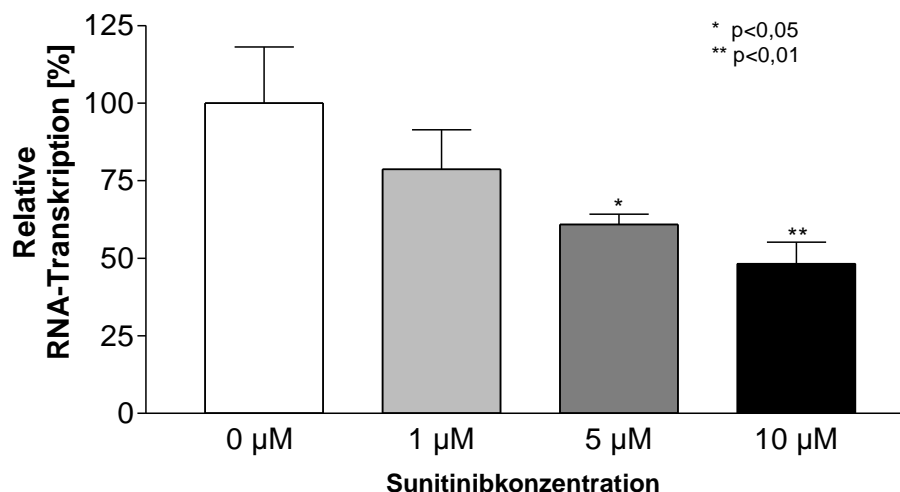
Western Blot HSD3B bei NCI-295-Suspensionszellen nach 24 Stunden Sunitinib-Behandlung, angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ± Standardabweichung. Mit abgebildet ist ein Originalblot. ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Nach Normalisierung gegen β -Aktin fand sich eine dosisabhängige Abnahme der Proteinexpression von HSD3B: 1 μ M Sunitinib $82,1 \pm 7,6$ %; 5 μ M Sunitinib: $62,5 \pm 7,6$ %^{**}; 10 μ M Sunitinib: $54,6 \pm 8,8$ %^{**} in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen $100 \pm 5,6$ %; ^{**} $p < 0,01$.

3.3.2 Einfluss auf weitere Enzyme der Steroidbiosynthese

Auch der Einfluss von Sunitinib auf zwei weitere Enzyme CYP11A1 als Schlüsselenzym der Steroidsynthese und CYP11B1 wurde mittels quantitativer Real-time-PCR untersucht (siehe Diagramm 11)

Diagramm 11: RTq-PCR CYP11B1 nach 24 Stunden Inkubation mit Sunitinib



Quantifizierung der mRNA für CYP11B1 bei NCI-295-Suspensionszellen nach 24 Inkubation mit Sunitinib, angegeben als Mittelwert in Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Bei der Untersuchung der Transkription von CYP11B1 mittels RTq-PCR zeigte sich ebenfalls ein hemmender Einfluss von Sunitinib, allerdings weniger deutlich als bei HSD3B. Nach 24-stündiger Inkubation mit Sunitinib betrug die relative RNA-Transkription CYP11B1: 1 μ M Sunitinib: $78,6 \pm 12,7$ %; 5 μ M: $60,8 \pm 3,3$ %; 10 μ M: $48,2 \pm 7,0$ % in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen $100 \pm 18,1$ %. Dieser Effekt ließ sich allerdings auf Proteinebene mittels Western Blot nicht reproduzierbar bestätigen.

Auf CYP11A1, das erste Enzym in der Steroidbiosynthese, ließen sich keinerlei signifikanten Auswirkungen durch eine Inkubation mit Sunitinib beobachten (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Bei präklinischen Tests mit Sunitinib wurden bei hohen Dosen des Tyrosinkinaseinhibitors Veränderungen an den Nebennieren der Versuchstiere beschrieben [38, 47]. Laut Informationen des Herstellers Pfizer [48] zeigten sich in der bisherigen klinischen Anwendung allerdings keine wesentlichen Auffälligkeiten an den Nebennieren der behandelten Patienten und Probanden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Sunitinib auf Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem möglichen Einfluss einerseits auf die Proliferation, andererseits auf die Steroidbiosynthese der untersuchten Nebennierenkarzinomzellen.

4.1 Einfluss auf die Zellproliferation

Mittels Zellzählungen und MTT-Tests konnte gezeigt werden, dass Sunitinib einen dosisabhängigen wachstumshemmenden Effekt auf die beiden Nebennierenkarzinomzelllinien NCI-h295 (sowohl in der adhärent wachsenden Variante als auch auf Suspensionszellen) und SW-13 hat.

Bei zahlreichen anderen Tumorentitäten konnte bereits ein direkter antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf die Proliferation von malignen Zellen nachgewiesen werden – unabhängig von antiangiogenetischen Effekten über VEGF und PDGF. Dies belegen *in vitro*-Versuche mit völlig unterschiedlichen Tumorzellen: Beim Kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigte sich bei NCI-h256-Zellen [105] eine dosisabhängige Wachstumshemmung, die im serumfreien Medium mit SCF gesteigert werden konnte. Auch bei der Glioblastomzelllinie CL 15 [106] und bei FRTL5-Schilddrüsen-Zellen [107] konnte ein direkter antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden.

Die verwendeten Sunitinibkonzentrationen und Dauer der Sunitinib-Inkubation sind in den genannten Veröffentlichungen [105-107] vergleichbar mit den Experimenten dieser Arbeit. Wie auch in dieser Arbeit (vgl. Kap. 3.1, S. 38) konnten signifikante antiproliferative Effekte erst bei hohen Sunitinib-Konzentrationen in einer Größenordnung von 2-10 μM Sunitinib beobachtet

werden. Die *in vivo* erreichbaren therapeutischen Konzentrationen im Plasma erreichen etwa 50-100 ng/ml [38, 48]. Die molare Masse von Sunitinib maleat beträgt 532,6 g/mol, so dass die erreichbaren Plasmaspiegel etwa in der Größenordnung von 0,1-0,2 µM liegen. Die *in vitro* benötigten Dosierungen zur signifikanten Proliferationshemmung der untersuchten Nebennierenkarzinomzellen liegen damit etwa 10-50fach höher als die *in vivo* erreichbaren Plasmaspiegel. Dennoch sind mehrere Aspekte zu beachten: In dieser Arbeit wurden nur die direkten antiproliferativen Effekte von Sunitinib auf Nebennierenrindenzellen untersucht. Der Einfluss von Sunitinib auf die Angiogenese, dem im klinischen Alltag die größte Bedeutung zugerechnet wird, über die Zielmoleküle VEGF-R und PDGF-R wurde in diesen *in-vitro*-Zellversuchen nicht untersucht (siehe Kapitel 4.4.1). Zudem gibt es keine Daten zur Stabilität von Sunitinib in Zellkulturmodellen. In der klinischen Anwendung wird die Substanz täglich appliziert, in sämtlichen Versuchen erfolgte eine einmalige Sunitinib-Applikation.

4.2 Einfluss auf die Steroidbiosynthese

Bislang wurde dem Einfluss von Sunitinib auf die Steroidbiosynthese des Menschen kaum Beachtung geschenkt. Die in ersten Tierversuchen beobachteten Nebennierenveränderungen [38] konnten in der bisherigen klinischen Anwendungen laut Informationen des Herstellers Pfizer [48] nicht bestätigt werden. Während verschiedener klinischer Studien wurden nach diesen Informationen ACTH-Tests bei etwa 400 Patienten durchgeführt, von denen zwölf Patienten mit initial unauffälligem ACTH-Test nach Sunitinib-Behandlung eine erniedrigte Cortisol-Antwort zeigten. Klinisch zeigten diese Patienten allerdings keinen Hinweis auf eine Nebennierenrindeninsuffizienz [48-49].

In dieser Arbeit wurden steroidhormonbildende Nebennierenkarzinomzellen (NCI-h295) mit steigenden Dosen Sunitinib inkubiert und anschließend die Konzentration verschiedener Nebennierenrindenzellenhormone mittels Chemilumineszenz, Radioimmunoassays und schließlich zur genauen

Differenzierung mittels ID/GC-MS bestimmt. Es zeigte sich bei sämtlichen Versuchen eine signifikante dosisabhängige Abnahme der gemessenen Cortisolkonzentrationen ab einer Konzentration von etwa 1-5 μM . Wegen des antiproliferativen Effekts von Sunitinib lag die Vermutung nahe, dass diese Beobachtung der geringeren Zellzahl zuzurechnen ist. Allerdings war selbst nach Normierung gegen die Zellzahl ein dosisabhängiger Abfall der Cortisolsekretion zu beobachten.

Auch bei der zeitgleichen Bestimmung des Androgens DHEA-S fiel auf, dass DHEA-S sich im Vergleich zur Zellzahl und zu Cortisol statistisch signifikant anreicherte. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass höhere Dosen von Sunitinib spezifisch in die Steroidbiosynthese eingreifen.

Um Hinweise auf die genauen Mechanismen zu bekommen, wurden weitere Vorläuferhormone der Steroidbiosynthese mittels RIA untersucht wie 17-OH-P und Androstendion. Schließlich wurde mittels ID/GC-MS, dem derzeit genauesten Verfahren zur Steroidanalyse, ein sogenanntes Steroidprofil erstellt.

Beide Methoden zeigten eine Anreicherung von Vorläufersubstanzen wie 17-OH-Pregnenolon und DHEA. Einen Unterschied gab es allerdings zwischen den beiden Verfahren: Während 17-OH-P im RIA dosisabhängig supprimiert wird, ist in der ID/GC-MS kein signifikanter Einfluss auf 17-OH-P zu sehen, während 17-OH-Pregnenolon sich anreichert. Dies liegt möglicherweise an Kreuzreaktionen zwischen 17-OH-P und 17-OH-Preg im RIA, während Kreuzreaktionen bei der ID/GC-MS methodenbedingt ausgeschlossen sind.

Ergänzend wurden die Zellen mit Forskolin stimuliert, worauf NCI-h295R-Zellen oft mit einer deutlicheren Hormonproduktion reagieren als auf eine Stimulation mit ACTH [108]. Forskolin stimuliert in allen Zellen die Adenylatzyklase, führt damit zu einer Erhöhung von cAMP und Aktivierung des Proteinkinase-A-Wegs [109-110]. In Nebennierenrindenzellkultur führt dies zu einer vermehrten Transkription von StAR, HSD3B und CYP17, CYP11A1 und CYP21 [87, 108, 111]. Auch in unseren Experimenten fanden sich nach Forskolin-Behandlung erhöhte Steroidhormonspiegel. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Sunitinib und Forskolin konnte diese Stimulation jedoch partiell wieder überwunden werden.

Die Sunitinib-abhängige Anreicherung von Vorläufersubstanzen wie DHEA und 17-OH-Pregnenolon zeigte sich jedoch noch deutlicher: DHEA stieg zum Beispiel auf über das Doppelte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen an.

Die Ergebnisse des Steroidprofils mit Anreicherung bestimmter Vorläuferhormone deuten auf spezifische Hemmung von Enzymen der Steroidbiosynthese hin. Um diese zu identifizieren, wurden Quotienten zwischen Vorläuferhormon und dem nächsten Zwischenprodukt der Steroidbiosynthese gebildet. Insbesondere fiel z. B. ein Anstieg der Quotienten 17-OH-Preg/17-OH-P sowie DHEA/Androstendion auf, was auf eine Hemmung der HSD3B2 hindeutet sowie Desoxycortisol/Cortisol als Hinweis für eine Hemmung der CYP11B1. Weitere Quotienten wie die von CYP17 (17-OH-Preg/DHEA) blieben unbeeinflusst.

Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 8 einen Ausschnitt aus der Steroidbiosynthese ab 17-OH-Pregnenolon mit Darstellung der mittels ID/GC-MS untersuchten Hormone. Die unterschiedlichen Schriftgrößen stellen die Veränderungen der Hormonkonzentration nach Sunitinib-Behandlung dar.

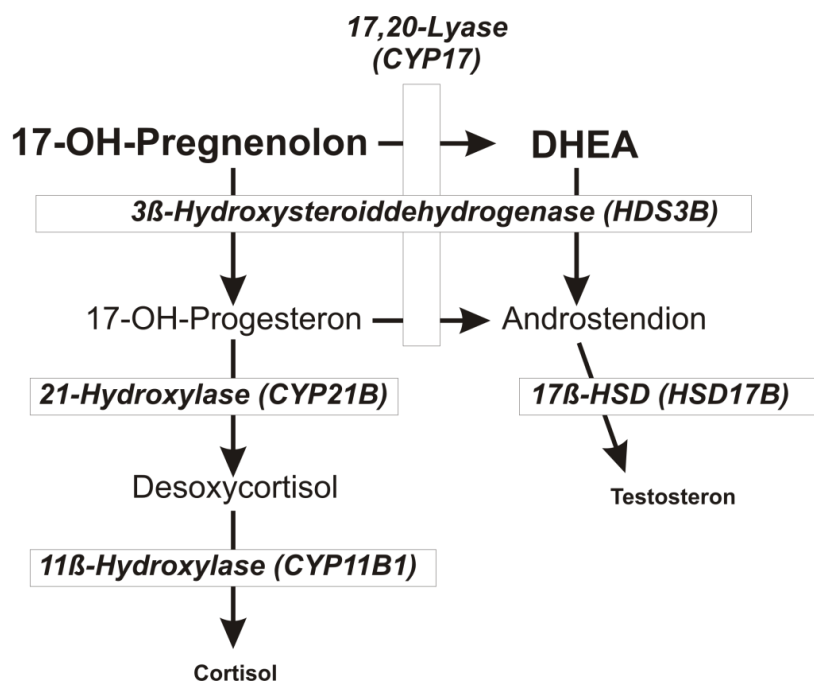


Abbildung 8: Ausschnitt aus der Steroidbiosynthese

Um die Ursache der veränderten Steroidhormonquotienten zu klären, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Ein direkter Einfluss von Sunitinib auf das intakte Enzym HSD3B2 wurde mittels Hefe-Mikrosomen-Assay durch Frau Prof. Dr. Wiebke Arlt und Dr. Vivek Dhir (Universität Birmingham) ausgeschlossen.

Weiterhin wurde die Transkription der Enzyme HSD3B2, CYP11B1 und CYP11A1 weiter untersucht mittels Real-time-PCR. Für *CYP11A1*, dem Schlüsselenzym der Steroidsynthese konnte kein eindeutiger Effekt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In der Transkriptionsanalyse mittels Real-time-PCR konnten wir zeigen, dass Sunitinib schon in Konzentrationen ab 1 μM die mRNA der *HSD3B2* deutlich supprimiert. Passend dazu ist die größte Hemmung der Transkription nach etwa 24 Stunden zu erreichen, während die sinkende Steroidhormonkonzentration erst nach einem längeren Zeitraum (zwei bis vier Tage) deutlich wird. Western-Blot-Analysen für HSD3B2 bestätigten deren spezifische Hemmung auf Proteinebene. Für *CYP11B1* (11 β -Hydroxylase, letzter Schritt der Cortisolsynthese) konnte ähnlich wie für *HSD3B2* eine Abnahme der mRNA gezeigt werden, die allerdings weniger deutlich ausfällt als bei der HSD3B2. Auf Proteinebene ließ sich dieser Effekt mittels Western Blot nicht bestätigen.

Erstmals konnte also belegt werden, dass Sunitinib die Transkription von HSD3B2 und in geringerem Ausmaß auch von CYP11B1 hemmt.

Nach Stimulation der NCI-h295-Zellen mit Forskolin, einem potenten Aktivator der Adenylatzyklase, der über cAMP-Erhöhung die Transkription verschiedener Steroidenzyme, unter anderem HSD3B2 stimuliert [112], lässt sich der Effekt, dass sich Vorläuferhormone im Vergleich zum Edukt anreichern, noch verstärken. Dies weist darauf hin, dass Sunitinib nicht über den cAMP-Weg wirkt, bzw. erst auf einer späteren Ebene der Transkriptionsregulation eingreift. Mögliche Angriffspunkte könnten eine Beeinflussung über Hemmung weiterer Transkriptionsfaktoren, Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA oder Einfluss auf die mRNA-Stabilität (vermehrter Abbau) sein.

Die HSD3B2 wird auf verschiedenen Ebenen reguliert: über den Proteinkinase-A-Weg (hier wirkt Forskolin), andererseits auch über einen Proteinkinase-C-

abhängigen Weg [113]. Als Schlüsselfaktoren für die Regulation der Steroidogenese gelten (intranukleäre) Transkriptionsfaktoren wie die Mitglieder der NR5A (Nuclear receptor family 5, hier v.a. SF1/Steroidogenic factor 1 und LRH-1/Liver receptor Homologue 1) und der NR4A-Familie (Nuclear receptor family 4 Group A; v.a. Nur77, auch Nerve Growth Factor IB/NGFIB oder NRF4A1 genannt). Untersuchungen haben gezeigt, dass SF1 die basale transkriptionale Aktivität des *HSD3B2*-Gens in NCI-h295-Zellen steuert. Diese kann mit Phorbolestern stimuliert werden, was auf einen Proteinkinase-C-abhängigen Weg hindeutet [114]. In NCI-h295-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Nur77 deutlicher die Transkription der *HSD3B2* stimuliert als SF1 [115-116]. Der in dieser Arbeit gezeigte spezifische Effekt der Hemmung der *HSD3B2* durch Sunitinib kann durch einzelne intranukleäre Transkriptionsfaktoren nicht ausreichend erklärt werden, gut vorstellbar ist eine Interaktion über Tyrosinkinasen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren.

4.3 Mögliche Ursachen der beobachteten Veränderungen

Über Ursachen der in dieser Arbeit dargestellten Veränderungen durch Sunitinib kann nur spekuliert werden. Sunitinib hemmt verschiedenste Rezeptortyrosinkinasen [27]. Die sonst für Sunitinib als am wichtigsten erachteten Rezeptoren VEGFR und PDGFR scheinen für die hier beobachteten Effekte eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sie eher in den Endothelzellen und nicht in den Krebszellen selbst exprimiert werden [10-11]. Nur als Abstract vorliegende Untersuchungen zur Überexpression von KIT bei Nebennierenkarzinomzelllinien lassen vermuten, dass KIT keine Rolle beim Nebennierenkarzinom und auch in NCI-h295-Zellen spielt [117]. Die weiteren Tyrosinkinaserezeptoren, die bekanntermaßen durch Sunitinib beeinflusst werden, sind eher für andere Gewebe typisch: RET ist typischerweise bei neuroendokrinen Tumoren, MEN2-Syndromen und papillären Schilddrüsenkarzinomen mutiert [118]. FLT3 [13] und CSF1-R (Makrophagenstimulierender Faktor) sind eher in der Hämatopoese zu finden.

Allerdings wird eine andere Rezeptortyrosinkinase bei Nebennierenrindenzellen exprimiert: der IGF1R. Sowohl für NCI-h295 als auch für SW-13-Zellen konnte eine Überexpression des IGF1R gezeigt werden. Für die NCI-h295R-Zelllinie wurde bereits vor längerer Zeit nachgewiesen, dass vor allem IGF-II sezerniert wird und dieser Wachstumsfaktor autokrin und parakrin die Proliferation der Zellen fördert [119]. Auch die Steroidbiosynthese wird durch IGF-I und IGF-II beeinflusst. Dabei werden vor allem die HSD3B und die 17 α -Hydroxylase stimuliert [120].

Dass Sunitinib auch auf den IGF1R wirken könnte, zeigen präklinische biochemische Assays. Allerdings sind hier viel höhere Konzentrationen nötig als bei den bereits genannten Rezeptortyrosinkinasen: Um 50 % der Tyrosinkinasen zu autophosphorylieren (IC_{50}), werden beim IGF1R 4,0 μ M Sunitinib benötigt, beim VEGFR2 zum Beispiel dagegen nur bei 0,004 μ M. In Zellversuchen wurde der Einfluss von Sunitinib auf den IGF1R allerdings nicht näher untersucht [27].

Zumindest teilweise könnten die Ergebnisse dieser Arbeit also über eine mögliche Inhibition des IGF1R durch Sunitinib erklärt werden: Wie auch in den Bioassays mit IGF1R [27] wurden die Effekte in dieser Arbeit erst bei hohen Sunitinib-Dosen im Bereich von 5 μ M erzielt.

Auch der Einfluss auf die Steroidgenese und insbesondere die partielle Hemmung der HSD3B2 könnte so erklärt werden, da für die HSD3B2 ein stimulierender Effekt durch IGF bereits früher nachgewiesen werden konnte [51, 119-120]. Die 17 α -Hydroxylase, die ebenfalls durch IGFs stimuliert wird [120], wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sie katalysiert den Schritt zwischen Pregnenolon bzw. Progesteron zu 17-OH-Pregnenolon bzw. 17-OH Progesteron. Pregnenolon und Progesteron wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt. Auf die 17,20-Lyase, die ebenfalls zu CYP17 gehört, und den nächsten Schritt von 17-OH-Pregnenolon bzw. 17-OH-Progesteron in Richtung Androgene katalysiert, scheint Sunitinib anhand der berechneten Hormonquotienten keinen Einfluss zu haben (vgl. Diagramm 8, S. 50). Dies wurde allerdings nicht weiter auf Transkriptions- und Translationsebene untersucht.

Die Hypothese, dass die beobachteten Veränderungen auf die Steroidbiosynthese über den IGF-Weg erfolgen, ist nur eine mögliche Erklärung. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass die beobachteten Auswirkungen Ergebnisse eines multifaktoriellen Geschehens sind.

4.4 Mögliche klinische Bedeutung

4.4.1 Sunitinib als Therapieoption beim Nebennierenkarzinom

Wie bereits in Kapitel 1.2.2, S. 17, beschrieben, ist das Nebennierenkarzinom im Stadium IV eine Erkrankung mit sehr schlechter Prognose [66-68, 73]. Neben Symptomen durch den Tumor selbst, leiden die Patienten dabei häufig unter Beschwerden durch einen Steroidexzess.

In vielen Fällen ist eine kurative Resektion des Tumors nicht mehr möglich oder es kommt zu Rezidiven. Verschiedene Chemotherapie-Regimes und das Adrenostatikum Mitotane, welches als Standardtherapie des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms gilt [82, 121], zeigen nur mäßige Ansprechraten und haben zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen [68, 84]. Neue Therapiestrategien sind daher dringend nötig

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sunitinib einen antiproliferativen Effekt auf Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* hat und zusätzlich die Steroidsynthese hemmt. Dies macht Sunitinib zu einer interessanten Therapieoption beim Nebennierenkarzinom. Zu beachten ist jedoch, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen antiproliferativen Effekte erst bei Sunitinib-Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ auftraten bzw. erst dann statistisch signifikant waren.

Ein Fallbericht aus Japan [122] zeigte unter Sunitinib eine immerhin sieben Monate anhaltende partielle Remission bei einer Patientin mit metastasiertem Nebennierenkarzinom nach fehlgeschlagener Cisplatin- und Mitotane-basierter Chemotherapie. Über die hormonelle Aktivität des Tumors wird in diesem Fallbericht nichts ausgesagt.

Parallel zu dieser *in vitro* Studie wurde Sunitinib auch in einer klinischen Phase-II-Studie getestet (SIRAC: "Sunitinib In Refractory Adrenocortical Carcinoma patients progressing platin based cytotoxic chemotherapy") [123]. Hier wurde Sunitinib bei 38 Patienten mit fortgeschrittenem Nebennierenkarzinom eingesetzt, bei denen unter der Standardtherapie (Mitotane und mindestens eine platinbasierte Chemotherapie) die Erkrankung progredient war. Der Therapieeffekt war mäßig. Bei fünf Patienten konnte eine stabile Erkrankung erreicht werden, bei den übrigen war die Erkrankung nach zwölf Wochen progredient. Auffallend im Rahmen dieser Studie war jedoch, dass Patienten, die gleichzeitig mit Mitotane behandelt wurden, schlechter auf Sunitinib ansprachen. Bei den sieben Patienten, von denen Blutproben verfügbar waren, wurden daher *post hoc* die Serumspiegel von Mitotane und Sunitinib bestimmt. Hohe Mitotane-Spiegel korrelierten dabei mit erniedrigten Sunitinib-Plasmaspiegeln, die insbesondere bei den Patienten mit höheren Mitotane-Spiegeln deutlich unter den bereits erwähnten in der klinischen Anwendung erreichbaren 50-100 ng/ml lagen (siehe 1.1.3, S. 7). Die Autoren folgern, dass durch Mitotane CYP3A4 aktiviert wird, wodurch Sunitinib zu seinem aktiven Metaboliten SU12662 umgewandelt wird, das dann weiter inaktiviert wird. Dass solche Medikamenteninteraktionen zwischen Sunitinib und anderen Medikamenten, die zum Beispiel CYP3A4 induzieren oder hemmen können, mehr Beachtung geschenkt werden sollte, unterstreicht auch ein aktuelles Review [124].

Eine kleine Pharmakokinetik-Studie konnte den induzierenden Effekt von Mitotane auf CYP3A4 bestätigen, insbesondere, dass er auch nach längerem Absetzen von Mitotane über mehrere Monate bestehen bleibt [125]. Dieses Erkenntnis ist nicht nur für Sunitinib als Therapieoption klinisch relevant, sondern für sämtliche Therapeutika, die in der Behandlung von mit Mitotane-behandelten Nebennierenkarzinompatienten eingesetzt werden [126].

Die vorliegende Arbeit konnte zudem zeigen, dass Sunitinib *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der Cortisolproduktion führt. Hierdurch könnte zusätzlich zum antiproliferativen Effekt bei Nebennierenkarzinompatienten mit Cushing-Syndrom eine Linderung der Symptome des Cortisolexzesses erzielt werden. Klinische Erkenntnisse hierzu stehen allerdings noch aus. Im Rahmen der

SIRAC-Studie erhobene Hormonspiegel sind bedauerlicherweise dazu nicht aussagekräftig, da alle Patienten bereits mit Mitotane vorbehandelt waren, was deutlichere adrenotoxische Effekte hat und aufgrund seiner langen Halbwertszeit die Steroidogenese auch nach Absetzen noch lange nachhaltig beeinflusst.

Über welche Mechanismen die antiproliferative Wirkung von Sunitinib auf Nebennierenkarzinomzellen vermittelt wird, lässt sich bislang nur mutmaßen, möglicherweise über eine Hemmung des IGF1R (vgl. 4.3, S. 60). IGF-II, das über den IGF1R wirkt, gilt als das am häufigsten überexprimierte Gen beim Nebennierenkarzinom und scheint in der Pathogenese dieses Tumors eine wichtige Rolle zu spielen [127-128]. Auch bei der Unterscheidung zwischen malignen und benignen Nebennierentumoren ist eine deutliche IGF-II-Überexpression im Tumorgewebe neben anderen Merkmalen von prognostischer Bedeutung [129].

Für IGF1R-Antagonisten konnte *in vitro* ebenfalls ein wachstumshemmender Effekt auf Nebennierenkarzinomzelllinien (unter anderem ebenfalls NCI-h295 und SW-13) nachgewiesen werden [130-131]. In einer aktuell publizierten multizentrischen Placebo-kontrollierten Studie [132] konnte durch Linsitinib, einem potenten IGF-1R- und Insulin-Rezeptor-Antagonisten kein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben im Vergleich zu Placebo erreicht werden. Allerdings fiel im Rahmen dieser Studie auf, dass einzelne Patienten (n=4 von 90) sehr gut auf Linsitinib ansprachen. Hier konnte die Erkrankung über mehr als zwei Jahre stabilisiert werden.

Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit die antiangiogenetischen Effekte von Sunitinib, denen in der Therapie anderer Tumorentitäten allgemein die größere Bedeutung zugerechnet wird, nicht untersucht worden ist. Auch wenn die antiproliferativen Effekte den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge erst bei hohen Sunitinibkonzentrationen auftreten, könnten natürlich zusätzliche, z. B. antiangiogenetische Effekte klinisch relevant sein. Bereits mehrere Studien zeigten, dass eine Überexpression von VEGF auch bei Nebennierenkarzinomen eine Rolle spielt. So wurden bei Patienten mit Nebennierenkarzinom signifikant höhere VEGF-Plasmaspiegel gemessen werden als in der gesunden

Kontrollgruppe und bei Nebennierenadenomen [133-134]. VEGF gilt als Marker für Malignität [135]. Vor allem bei Patienten mit Cushing-Syndrom fanden sich deutlich überhöhte VEGF-Spiegel, so dass hormonproduzierenden Nebennierenkarzinomen ein höheres angiogenetisches Potential zugerechnet wird [136]. Allerdings konnte in der Anwendung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab in Kombination mit dem Zytostatikum Capecitabine bei Patienten mit fortgeschrittenem Nebennierenkarzinom bei keinem der zehn Patienten ein objektives Ansprechen oder eine stabile Erkrankung beobachtet werden [137].

In der klinischen Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren konnten beim Nebennierenkarzinom bisher keine generellen Therapieerfolge verbucht werden: In einem Therapieversuch mit Imatinib, einem weiteren Tyrosinkinaseinhibitor gegen c-Kit und PDGFR kam es bei allen vier Patienten zu einer Krankheitsprogression [138]. Auch Erlotinib, ein Tyrosinkinasehemmer gegen den EGFR, konnte in Kombination mit Gemcitabine keine aussichtsreichen Therapieerfolge erreichen. Nur einer von zehn Patienten verzeichnete ein geringes Ansprechen mit progressionsfreiem Überleben über acht Monate, während die Erkrankung bei den anderen Patienten progredient war oder die Therapie vorzeitig abgebrochen wurde [139].

Eine weitere Option wäre jedoch möglicherweise, Sunitinib für die Therapie des Nebennierenkarzinoms mit anderen Medikamenten zu kombinieren. Auch eine Kombination mit Chemotherapeutika ist denkbar: Eine Untersuchung von Czabanka et al. [140] zeigte eine Veränderung der Mikrovaskularisierung und damit der Hämodynamik in mit Sunitinib-behandelten Tumoren, die über einen verstärkten Blutfluss der verbliebenen Gefäße zu einem chemosensitivierenden Effekt führten. In weiteren präklinischen Versuchen mit Brustkrebs- [141], Urothelkarzinom- [142] und Prostatakarzinommodellen [143-144] konnten bereits synergistische Effekte zwischen Sunitinib und unterschiedlichen Chemotherapeutika (unter anderem Docetaxel, Doxorubicin, Cisplatin) demonstriert werden.

Auch die Kombination von Angiogenesehemmern wie Sunitinib mit Strahlentherapie scheint in Modellversuchen erfolgversprechend: In

Tierversuchen mit Bronchialkarzinom-, Glioblastom- [145] sowie bei Pankreaskarzinommodellen [146] und bei Knochenmetastasen eines Mammakarzinoms [147] konnte präklinisch eine verbesserte Tumorkontrolle erzielt werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Tumorgefäße nach antiangiogenetischer Behandlung besser auf Strahlentherapie ansprechen [148]. In mehreren klinischen Studien wird aktuell die Kombinationsmöglichkeit von Sunitinib und Radiotherapie als Option für verschiedene, fortgeschrittene Neoplasien getestet (www.clinicaltrials.gov).

Vielleicht könnte durch Sunitinib also auch beim Nebennierenkarzinom, das eher schlecht auf Radio- und Chemotherapien anspricht, durch Kombination mehrerer Modalitäten ein Fortschritt in der Therapie erreicht werden. Die beiden klinischen Studien mit Sunitinib [123] wie auch mit dem IGF-1R-Antagonisten Linsitinib [132] zeigten auch, dass einzelne Patienten von einer Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren profitieren. Weitere Studien sind nötig, um herauszufinden, welche Prädiktoren (z. B. Weiss-Score, Ki67-Index) ein mögliches Ansprechen vorhersagen können, damit diese Patienten schon vor Therapie identifiziert werden können. Die im Rahmen der SIRAC-Studie aufgefallene Interaktion mit Mitotane – dem Standardtherapeutikum beim Nebennierenkarzinom – muss ebenfalls in künftigen Studien beachtet werden. Dies gilt es auch bei anderen Therapeutika zu beachten, die über CYP3A4 metabolisiert werden. Sinnvoll wäre es z. B. Sunitinib insbesondere bei Patienten zu erproben, bei denen bislang keine Mitotane-Therapie erfolgt ist.

4.4.2 Mögliche Nebenwirkung von Sunitinib in der Behandlung anderer Tumoren

Bei metastasierten Nierenzellkarzinomen, GIST und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas zählt Sunitinib mittlerweile zur Standardtherapie [23, 25, 149], bei zahlreichen anderen Tumorentitäten befindet es sich in unterschiedlichen Studien-Phasen (vgl. S. 7).

Bei einer vom Hersteller Pfizer durchgeführten Untersuchung sind keine klinisch relevanten Nebenniereninsuffizienzen bei Patienten beschrieben [48]. In Tierversuchen wurden jedoch pathologische Veränderungen der Nebennierenrinde von Ratten und Affen in Form vor allem von Hämorrhagien, Nekrosen nach längerdauernden (bis zu neun Monaten), hochdosierter Sunitinibtherapie beschrieben, die nach einer Erholungsphase reversibel waren. Elektronenmikroskopisch fallen in diesen Versuchen Veränderungen am kapillären Gefäßsystem der Nebennierenrinde auf [47].

Zwar wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Effekte erst bei einer Dosis beobachtet, die mindestens dem zehnfachen der unter einer normalen Tagesdosis von 50 mg Sunitinib per os erreichbaren Plasmaspiegel entspricht, allerdings sollte dabei bedacht werden, dass die Nebennierenkarzinomzellen dieser Arbeit jeweils mit einer einmaligen Dosis Sunitinib behandelt wurden. In der klinischen Anwendung nehmen die Patienten 37,5 bis 50 mg Sunitinib nach den meisten Dosierschemata über die Dauer von vier Wochen täglich ein. Nach einer zweiwöchigen Pause wiederholt sich dieser Zyklus beliebig oft, in manchen Fällen wird Sunitinib auch kontinuierlich eingenommen. Zwar ist Sunitinib in wässriger Lösung lange stabil, aber über die Stabilität in der Zellkultur liegen keine Daten vor, möglicherweise findet auch *in vitro* eine gewisse Metabolisierung von Sunitinib statt.

Den Beleg, dass Nebenwirkungen auch erst nach längerer Sunitinib-Behandlung auftreten können, geben zahlreiche Untersuchungen [46, 49, 150], die die Entwicklung von Hypothyreosen beziehungsweise auffälligen Anstiegen des TSH-Spiegels unter Sunitinib beschreiben. Dabei steigt das Risiko der Entwicklung einer Hypothyreose mit der Dauer der Sunitinib-Behandlung, bei einer retrospektiven Studie trat eine Hypothyreose durchschnittlich nach einer Behandlungsdauer von 50 Wochen (also etwa im 9. Zyklus) ein [151]. Mittlerweile gilt die Empfehlung, den TSH-Spiegel unter Sunitinib-Therapie regelmäßig zu überprüfen, da so rechtzeitig eine Hypothyreose erkannt und durch die Gabe von L-Thyroxin entgegengesteuert werden kann [46]. Kontrovers diskutiert wird noch, ob eine unter Sunitinib entwickelte Hypothyreose mit adäquater Behandlung

sogar einen prognostischen Hinweis bezüglich eines verbesserten progressionsfreien Überlebens darstellt [152-153].

Die Mechanismen dieser Sunitinib-induzierten Hypothyreose sind bislang nicht hinreichend geklärt [150, 154]. Da vor der Hypothyreose häufig auch supprimierte TSH-Werte bis zur Thyreotoxikose festgestellt werden, gehen manche Autoren von einer destruktiven Thyreoiditis aus, für andere ist die gute Durchblutung der Schilddrüse und damit die Blockierung der Angiogenese durch Sunitinib die plausibelste Erklärung. Da TSH-Werte bei Patienten unter Sunitinib-Therapie oft deutlicher erhöht sind, als die freien T3-/T4-Werte erwarten lassen, wird auch ein zusätzlicher direkter Effekt auf Hypophyse bzw. Hypothalamus in die Diskussion mit einbezogen [154].

Da erscheint es doch möglich, dass Sunitinib auch auf andere endokrinen Gewebe bei längerer Behandlungsdauer Einfluss nimmt. In Einzelfällen wurde bereits über Erniedrigung der Blutglukosespiegel bei Diabetikern berichtet, die wegen Nierenzellkarzinomen Sunitinib einnehmen. Auch hier wird spekuliert, dass diese Blutzuckersenkung möglicherweise über die IGF-Achse erfolgt [155-156].

Ob der in dieser Arbeit deutlich werdende Effekt auf die Steroidsynthese und besonders die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase auch klinisch relevant ist, bleibt abzuwarten. Die für Sunitinib beschriebenen typischen Nebenwirkungen wie Fatigue-Symptomatik und gastrointestinale Störungen [157] könnten auch zu den unspezifischen Symptomen einer Nebenniereninsuffizienz passen. Hier würde allerdings eher eine Hypotension auftreten. Dagegen werden unter antiangiogenetischen Medikamenten wie Sunitinib häufig hypertensive Blutdruckwerte beobachtet [158].

Zwischenzeitlich wurde ein einzelner Fallbericht aus Japan veröffentlicht [159], bei dem erstmals eine akute Nebenniereninsuffizienz während der Behandlung eines metastasierten Nierenzellkarzinoms mit Sunitinib auftrat. Bei dem 72-jährigen Patienten konnten schon vor Beginn der Sunitinibtherapie leicht erhöhte ACTH-Level nachgewiesen werden, was für eine bereits vorbestehende subklinische Nebenniereninsuffizienz spricht. Nach fast zwei Zyklen Sunitinib

entwickelte sich akut eine Fatigue-Symptomatik. Es fiel eine Thyreotoxikose sowie deutlich erhöhte ACTH-Werte auf. Nach Behandlung mit Steroiden besserte sich die Fatigue innerhalb eines Tages deutlich. Unter Substitutionstherapie für die Nebenniereninsuffizienz und Therapie der Thyreotoxikose konnte die Sunitinibbehandlung fortgesetzt werden. Die Grunderkrankung konnte so bis zum Ende des Beobachtungszeitraums mit einer niedrigeren Sunitinib-Dosierung kontrolliert werden.

Leider gibt es bislang keine Veröffentlichungen, in denen die Nebennierenfunktion bei Langzeitbehandlung mit Sunitinib an einem größeren Patientenkollektiv überwacht wurde. Lediglich in den ersten Beobachtungen von Pfizer werden auffällige ACTH-Tests unter Sunitinib-Therapie beschrieben, die allerdings zu keiner klinisch auffälligen Nebenniereninsuffizienz führten [48-49]. Eine kleinere Studie hat die Hypophysen-Nebennierenachse bei 25 CML-Patienten unter Imatinib-Therapie untersucht, hier zeigten nur acht Patienten einen adäquaten Cortisolanstieg im Glucagon- bzw. ACTH-Stimulationstest. Bei zwölf Patienten ließ sich ein zumindest partielles Glucocorticoiddefizit (Cortisol nach Stimulation <500 nmol/l bei normalen Cortisol-Spiegeln am Morgen) nachweisen, was bei keinem zuvor bekannt war [160].

Nachdem mittlerweile ein immer größer werdendes Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Tumoren mit Sunitinib und anderen Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt wird, wäre es sinnvoll, auch bei einer repräsentativen Patientenzahl die Nebennierenfunktion nochmals zu überprüfen, so wie die Schilddrüsenfunktion [150]. Idealerweise könnten vor Beginn der Sunitinib-Therapie und im Verlauf ACTH-Tests und zusätzlich Steroidprofile im 24-Stunden-Urin der Patienten durchgeführt werden. So kann eine eventuell entstehende Nebenniereninsuffizienz schnell erkannt und wenn nötig durch die Substitution von Glukokortikoiden behandelt werden, was die Lebensqualität der Patienten mit häufig chronischer Müdigkeit deutlich verbessern dürfte. Gerade in Stresssituation wie Traumen, Operationen oder Fieber besteht für nicht behandelte Patienten mit Glukokortikoiddefizit Lebensgefahr, die aber leicht durch entsprechende Substitutionstherapie gebannt werden könnte.

4.5 Limitierungen der Arbeit

Erstmals konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von Sunitinib auf Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* gezeigt werden. Auf die beiden verfügbaren Nebennierenkarzinomzelllinien NCI-295 und SW-13 konnte eine direkte antiproliferative Wirkung belegt werden. Einschränkend ist anzumerken, dass dies die einzigen beiden standardisiert verfügbaren humanen Zelllinien zum Nebennierenkarzinom sind, obwohl das klinische Erscheinungsbild dieser seltenen Erkrankung durchaus vielfältig ist (vgl. 1.2.2, S. 17). Zudem waren *in vitro* sehr hohe Dosierungen von Sunitinib nötig, um eine signifikante Proliferationshemmung der untersuchten Nebennierenkarzinom-Zellen zu bewirken. Sie lagen in den Versuchen etwa 10-50fach höher als die *in vivo* erreichbaren Plasmaspiegel (vgl. 4.1, S. 55). Dennoch sind mehrere Aspekte zu beachten: In dieser Arbeit wurden nur die direkten antiproliferativen Effekte von Sunitinib auf Nebennierenrindenzellen untersucht. Der Einfluss von Sunitinib auf die Angiogenese über die Zielmoleküle VEGF-R und PDGF-R konnte in diesen *in-vitro*-Zellversuchen nicht untersucht werden. Zudem gibt es keine Daten zur Stabilität von Sunitinib in Zellkulturmodellen. In der klinischen Anwendung wird die Substanz täglich appliziert und so der Plasmaspiegel über längere Dauer konstant gehalten, in sämtlichen Versuchen erfolgte eine einmalige Sunitinib-Applikation.

In dieser Arbeit wurde erstmals auch ein direkter Einfluss von Sunitinib auf die Steroidbiosynthese von Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* gezeigt mit Hemmung der HSD3B auf Transkriptions- und Translationsebene. Der genaue Wirkmechanismus kann anhand der durchgeführten Untersuchungen allerdings nicht dargestellt werden (vgl. 4.2, S. 56) und bleibt Spekulation (vgl. 4.3, S. 60). Vermutlich ist ein multifaktorielles Geschehen über mehrere beteiligte Transkriptionsfaktoren und Tyrosinkinaserzeptoren dabei beteiligt. Diese wurden hier jedoch nicht genauer untersucht.

Inwieweit die *in vitro* beobachteten Veränderungen auch in der Klinik *in vivo* relevant sind, bleibt daher abzuwarten. In der SIRAC-Studie wurde Sunitinib bereits als Therapieoption beim fortgeschrittenen Nebennierenkarzinom mit nur

mäßigem Therapieerfolg getestet [123]. Allerdings ist hier von einer deutlichen Medikamenteninteraktion mit Mitotane auszugehen. Dieses reduziert wahrscheinlich die Sunitinib-Plasmaspiegel, so dass keine endgültige Aussage bezüglich eines grundsätzlichen Therapieversagens anhand dieser einzelnen Studie getroffen werden sollte (siehe 4.4.1, S. 62).

Über die adrenotoxische Wirkung von Sunitinib in der Behandlung anderer Tumorentitäten kann nach diesen *in vitro*-Versuchen ebenfalls keine eindeutige Aussage getroffen werden. Allerdings konnte auf einzelne Enzyme der Steroidbiosynthese eine spezifische Hemmung nachgewiesen werden. Diese Hemmung der Steroidbiosynthese ist auch in gesunden Nebennieren denkbar. Hierzu wären weitere klinische Untersuchungen bzw. endokrinologische Testungen (z. B. ACTH-Stimulationstests) *in vivo* an einer ausreichend großen Zahl Patienten nötig (siehe auch 4.4.2, S. 66).

5 Zusammenfassung

Tyrosinkinaseinhibitoren nehmen in der modernen Onkologie einen wachsenden Stellenwert ein. Sunitinib wirkt als Multityrosinkinaseinhibitor einerseits antiangiogenetisch, andererseits auch direkt antiproliferativ auf Tumorzellen. Im Tierversuch sind unter Sunitinib adrenotoxische Wirkungen beschrieben. Für das Nebennierenkarzinom, eine sehr seltene Tumorerkrankung mit schlechter Prognose, werden dringend neue Therapieoptionen benötigt. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Sunitinib auf die Proliferation von Nebennierenkarzinomzellen *in vitro* und auf deren Steroidbiosynthese untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Sunitinib dosisabhängig auf die beiden Nebennierenkarzinomzelllinien NCI-h295(R) und SW-13 antiproliferativ wirkt (SW-13: unter 0,1 μM Sunitinib $96 \pm 7\%$; 1 μM $90 \pm 9\%^*$; 5 μM $62 \pm 6\%^*$, Kontrollen $100 \pm 9\%$, ab 1 μM $p < 0,05$). Zudem konnte mittels Steroidanalysen bei NCI-h295-Zellen eine signifikante Abnahme der Glukokortikoidproduktion mit Anreicherung von Steroidvorläuferhormonen von Nebennierenzellen nach Sunitinib-Inkubation erzielt werden. Steroidanalysen mittels Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie belegen eine Abnahme der Cortisolsekretion (1 μM $90,1 \pm 1,5\%^*$, 5 μM $57,2 \pm 0,3\%^*$, Kontrollen $100 \pm 2,4\%$), während bestimmte Vorläuferhormone akkumulieren. Wenn man die Quotienten einzelner Hormone und deren direkter Vorläufer bestimmt, kann man ableiten, ob und wenn ja, welche Enzyme blockiert werden. Der beobachtete Anstieg der Quotienten von 17-OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron und DHEA zu Androstendion belegt eine partielle Hemmung der Steroidsynthese auf Ebene der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD3B). Nachdem eine direkte Hemmung des Enzyms HSD3B mittels Hefe-Mikrosomen-Assay ausgeschlossen werden konnte, bestätigte sich auf RNA- mittels Real-Time-PCR und Proteinebene mittels Western Blot eine dosisabhängige Hemmung der Transkription und Translation des Enzyms (mRNA: 1 μM $47 \pm 7\%^*$; 5 μM $33 \pm 7\%^*$; 10 μM $27 \pm 6\%^*$; Protein: 1 μM $82 \pm 8\%$; 5 μM $63 \pm 8\%^*$; 10 μM $55 \pm 9\%^*$). Auch für CYP11B1 zeigte sich eine dosisabhängige

Transkriptionshemmung durch Sunitinib, andere Enzyme wie CYP11A1 dagegen werden nicht beeinflusst.

Wenn sich diese *in vitro* Effekte bei Patienten unter Sunitinib-Therapie bestätigen sollten, könnte es bei einzelnen Patienten zu einer klinisch relevanten Nebenniereninsuffizienz kommen. Entsprechende weitere klinische Untersuchungen sind nötig. Eine eindeutige Wirksamkeit von Sunitinib als Therapieoption beim Nebennierenkarzinom konnte im Rahmen der SIRAC-Studie nicht bestätigt werden. Hier ist jedoch anzumerken, dass wahrscheinlich eine gravierende Medikamenteninteraktion mit Mitotane zu einer Reduktion des Effekts von Sunitinib beigetragen hat.

6 Literaturverzeichnis

1. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 361-70.
2. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 172-87.
3. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
4. Goodsell, D.S., *The molecular perspective: epidermal growth factor*. Oncologist, 2003. **8**(5): p. 496-7.
5. Janmaat, M.L. and G. Giaccone, *Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors*. Oncologist, 2003. **8**(6): p. 576-86.
6. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
7. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S9-15.
8. Goodsell, D.S., *The molecular perspective: VEGF and angiogenesis*. Oncologist, 2002. **7**(6): p. 569-70.
9. Otrrock, Z.K., et al., *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(2): p. 212-20.
10. Otrock, Z.K., J.A. Makarem, and A.I. Shamseddine, *Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **38**(3): p. 258-68.
11. Alvarez, R.H., H.M. Kantarjian, and J.E. Cortes, *Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(9): p. 1241-57.
12. Yuzawa, S., et al., *Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor*. Cell, 2007. **130**(2): p. 323-34.
13. Small, D., *FLT3 mutations: biology and treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 178-84.
14. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 915-28.
15. Chitnis, M.M., et al., *The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6364-70.
16. Stinchcombe, T.E. and M.A. Socinski, *Gefitinib in advanced non-small cell lung cancer: does it deserve a second chance?* Oncologist, 2008. **13**(9): p. 933-44.
17. Steuer, C.E., F.R. Khuri, and S.S. Ramalingam, *The next generation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer*. Cancer, 2015. **121**(8): p. E1-6.
18. Gray, J. and E. Haura, *Update on third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Transl Lung Cancer Res, 2014. **3**(6): p. 360-2.
19. de Kogel, C.E. and J.H. Schellens, *Imatinib*. Oncologist, 2007. **12**(12): p. 1390-4.

20. Druker, B.J., et al., *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2006. **355**(23): p. 2408-17.
21. Daub, H., K. Specht, and A. Ullrich, *Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(12): p. 1001-10.
22. Baselga, J., *Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave*. Science, 2006. **312**(5777): p. 1175-8.
23. Rock, E.P., et al., *Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma*. Oncologist, 2007. **12**(1): p. 107-13.
24. Faivre, S., et al., *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(9): p. 734-45.
25. Goodman, V.L., et al., *Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1367-73.
26. Raymond, E., et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 501-13.
27. Chow, L.Q. and S.G. Eckhardt, *Sunitinib: from rational design to clinical efficacy*. J Clin Oncol, 2007. **25**(7): p. 884-96.
28. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115-24.
29. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma*. J Urol, 2007. **178**(5): p. 1883-7.
30. Motzer, R.J., et al., *Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(22): p. 3584-90.
31. Zhi, W.I. and J.J. Kim, *An update on current management of advanced renal cell cancer, biomarkers, and future directions*. Ann Cancer Res, 2014. **1**(2): p. 1-10.
32. Demetri, G.D., et al., *Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial*. Lancet, 2006. **368**(9544): p. 1329-38.
33. Burstein, H.J., et al., *Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane*. J Clin Oncol, 2008. **26**(11): p. 1810-6.
34. Socinski, M.A., *The current status and evolving role of sunitinib in non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(6 Suppl 2): p. S119-23.
35. Socinski, M.A., et al., *Multicenter, phase II trial of sunitinib in previously treated, advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(4): p. 650-6.
36. Cabebe, E. and H. Wakelee, *Sunitinib: a newly approved small-molecule inhibitor of angiogenesis*. Drugs Today (Barc), 2006. **42**(6): p. 387-98.
37. Saltz, L.B., et al., *Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy*. J Clin Oncol, 2007. **25**(30): p. 4793-9.

38. Faivre, S., et al., *Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 25-35.
39. La Vine, D.B., et al., *Frequent dose interruptions are required for patients receiving oral kinase inhibitor therapy for advanced renal cell carcinoma.* Am J Clin Oncol, 2010. **33**(3): p. 217-20.
40. Telli, M.L., et al., *Cardiotoxicity associated with the cancer therapeutic agent sunitinib malate.* Ann Oncol, 2008.
41. Schmidinger, M., et al., *Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma.* J Clin Oncol, 2008. **26**(32): p. 5204-12.
42. Wolter, P., et al., *The clinical implications of sunitinib-induced hypothyroidism: a prospective evaluation.* Br J Cancer, 2008. **99**(3): p. 448-54.
43. Cohen, R., et al., *[Sunitinib and hypothyroidism].* Ann Endocrinol (Paris), 2007. **68**(5): p. 332-6.
44. Wolter, P., H. Dumez, and P. Schoffski, *Sunitinib and hypothyroidism.* N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1580; author reply 1580-1.
45. Tamaskar, I., et al., *Thyroid function test abnormalities in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sorafenib.* Ann Oncol, 2008. **19**(2): p. 265-8.
46. Illouz, F., et al., *Endocrine side-effects of anti-cancer drugs: thyroid effects of tyrosine kinase inhibitors.* Eur J Endocrinol, 2014. **171**(3): p. R91-9.
47. Patyna, S., et al., *Nonclinical safety evaluation of sunitinib: a potent inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3, and RET receptors.* Toxicol Pathol, 2008. **36**(7): p. 905-16.
48. Pfizer, *Clinical Trial Information: Sunitinib.* Jan 2006.
49. Lodish, M.B. and C.A. Stratakis, *Endocrine side effects of broad-acting kinase inhibitors.* Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(3): p. R233-44.
50. Krieglstein, *Nebennieren*, in *Anatomie, Band 2*, Benninghoff/Drenckhahn, Editor. 2003. p. 206-214.
51. Payne, A.H. and D.B. Hales, *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones.* Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 947-70.
52. Pelletier, G., et al., *Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads.* J Endocrinol, 2001. **171**(2): p. 373-83.
53. BIASON-LAUBER, A., *Molecular medicine of steroid hormone biosynthesis.* Mol Aspects Med, 1998. **19**(3): p. 155-220.
54. Pignatelli, D., M.M. Magalhaes, and M.C. Magalhaes, *Direct effects of stress on adrenocortical function.* Horm Metab Res, 1998. **30**(6-7): p. 464-74.
55. Bornstein, S.R., H. Rutkowski, and I. Vrezas, *Cytokines and steroidogenesis.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 135-41.
56. Marx, C., et al., *Regulation of adrenocortical function by cytokines--relevance for immune-endocrine interaction.* Horm Metab Res, 1998. **30**(6-7): p. 416-20.

57. Ehrhart-Bornstein, M., et al., *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*. *Endocr Rev*, 1998. **19**(2): p. 101-43.
58. Haidan, A., et al., *Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells*. *Endocrinology*, 1998. **139**(2): p. 772-80.
59. Bassett, J.R. and S.H. West, *Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release*. *Microsc Res Tech*, 1997. **36**(6): p. 546-57.
60. Muller, J., *Aldosterone: the minority hormone of the adrenal cortex*. *Steroids*, 1995. **60**(1): p. 2-9.
61. Lang, F. and F. Verrey, *Nebennierenrindenhormone*, in *Physiologie des Menschen*, R. Schmidt and F. Lang, Editors. 2007. p. 495-501.
62. Sapolsky, R.M., L.M. Romero, and A.U. Munck, *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(1): p. 55-89.
63. Arlt, W., *Dehydroepiandrosterone and ageing*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2004. **18**(3): p. 363-80.
64. Wajchenberg, B.L., et al., *Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations*. *Cancer*, 2000. **88**(4): p. 711-36.
65. Fassnacht, M. and B. Allolio, *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009. **23**(2): p. 273-89.
66. Else, T., et al., *Adrenocortical carcinoma*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(2): p. 282-326.
67. Fassnacht, M., M. Kroiss, and B. Allolio, *Update in adrenocortical carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(12): p. 4551-64.
68. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
69. Icard, P., et al., *Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group*. *World J Surg*, 2001. **25**(7): p. 891-7.
70. Bellantone, R., et al., *Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma*. *Surgery*, 1997. **122**(6): p. 1212-8.
71. Hermsen, I.G., et al., *Extremely long survival in six patients despite recurrent and metastatic adrenal carcinoma*. *Eur J Endocrinol*, 2008. **158**(6): p. 911-9.
72. Sullivan, M., M. Boileau, and C.V. Hodges, *Adrenal cortical carcinoma*. *J Urol*, 1978. **120**(6): p. 660-5.
73. Fassnacht, M., et al., *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification*. *Cancer*, 2009. **115**(2): p. 243-50.
74. Lughezzani, G., et al., *The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(4): p. 713-9.

75. Reibetanz, J., et al., *Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma*. *Ann Surg*, 2012. **255**(2): p. 363-9.
76. Allolio, B., et al., *Management of adrenocortical carcinoma*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. **60**(3): p. 273-87.
77. Polat, B., et al., *Radiotherapy in adrenocortical carcinoma*. *Cancer*, 2009. **115**(13): p. 2816-23.
78. Fassnacht, M., et al., *Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(11): p. 4501-4.
79. Habra, M.A., et al., *A retrospective cohort analysis of the efficacy of adjuvant radiotherapy after primary surgical resection in patients with adrenocortical carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(1): p. 192-7.
80. Sabolch, A., et al., *Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **80**(5): p. 1477-84.
81. Scheingart, D.E., *Adjuvant mitotane therapy of adrenal cancer - use and controversy*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(23): p. 2415-8.
82. Terzolo, M., et al., *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(23): p. 2372-80.
83. Fassnacht, M., et al., *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(23): p. 2189-97.
84. Kirschner, L.S., *Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(1): p. 14-21.
85. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. *Cancer Res*, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
86. Rainey, W.E., K. Saner, and B.P. Schimmer, *Adrenocortical cell lines*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **228**(1-2): p. 23-38.
87. Rainey, W.E., I.M. Bird, and J.I. Mason, *The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies*. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **100**(1-2): p. 45-50.
88. Staels, B., D.W. Hum, and W.L. Miller, *Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal*. *Mol Endocrinol*, 1993. **7**(3): p. 423-33.
89. Hecker, M., et al., *Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **217**(1): p. 114-24.
90. Leibovitz, A., et al., *New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(2): p. 691-7.
91. Albertin, G., et al., *Endothelin-1 and adrenomedullin enhance the growth of human adrenocortical carcinoma-derived SW-13 cell line by stimulating proliferation and inhibiting apoptosis*. *Int J Mol Med*, 2005. **15**(3): p. 469-74.
92. Itoh, S., et al., *Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production in a cultured human adrenocortical carcinoma cell line (SW-13)*. *Endocrinol Jpn*, 1988. **35**(1): p. 149-58.

93. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
94. Gerlier, D. and N. Thomasset, *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. J Immunol Methods, 1986. **94**(1-2): p. 57-63.
95. Green, L.M., J.L. Reade, and C.F. Ware, *Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines*. J Immunol Methods, 1984. **70**(2): p. 257-68.
96. Tello, F.L. and D.M. Hernandez, *Performance evaluation of nine hormone assays on the Immulite 2000 immunoassay system*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(10): p. 1039-42.
97. Wudy, S.A., *Synthetic procedures for the preparation of deuterium-labeled analogs of naturally occurring steroids*. Steroids, 1990. **55**(10): p. 463-71.
98. Wudy, S.A. and M.F. Hartmann, *Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology*. Horm Metab Res, 2004. **36**(6): p. 415-22.
99. Holzapfel, B.W., L., *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie unserer Zeit, 2007. **37**(2).
100. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
101. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
102. Thomas, J.L., et al., *Differences in substrate and inhibitor kinetics of human type 1 and type 2 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase are explained by the type 1 mutant, H156Y*. Endocr Res, 2002. **28**(4): p. 471-5.
103. Nonaka, Y., et al., *Frog cytochrome P-450 (11 beta,aldo), a single enzyme involved in the final steps of glucocorticoid and mineralocorticoid biosynthesis*. Eur J Biochem, 1995. **229**(1): p. 249-56.
104. Arlt, W., et al., *Cinnamic acid based thiazolidinediones inhibit human P450c17 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and improve insulin sensitivity independent of PPARgamma agonist activity*. J Mol Endocrinol, 2004. **32**(2): p. 425-36.
105. Abrams, T.J., et al., *SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(5): p. 471-8.
106. de Bouard, S., et al., *Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma*. Neuro Oncol, 2007. **9**(4): p. 412-23.
107. Salem, A.K., et al., *Effect of sunitinib on growth and function of FRTL-5 thyroid cells*. Thyroid, 2008. **18**(6): p. 631-5.
108. Rainey, W.E., et al., *Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(3): p. 731-7.
109. Insel, P.A. and R.S. Ostrom, *Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling*. Cell Mol Neurobiol, 2003. **23**(3): p. 305-14.

110. Seamon, K.B. and J.W. Daly, *Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems*. J Cyclic Nucleotide Res, 1981. **7**(4): p. 201-24.
111. Moriwaki, K., et al., *Forskolin potentiates adrenocorticotropin-induced cyclic AMP production and steroidogenesis in isolated rat adrenal cells*. Life Sci, 1982. **30**(25): p. 2235-40.
112. Bird, I.M., J.I. Mason, and W.E. Rainey, *Battle of the kinases: integration of adrenal responses to cAMP, DG and Ca²⁺ at the level of steroidogenic cytochromes P450 and 3betaHSD expression in H295R cells*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 345-54.
113. Mason, J.I., et al., *The regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression*. Steroids, 1997. **62**(1): p. 164-8.
114. Leers-Sucheta, S., et al., *Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7960-7.
115. Bassett, M.H., et al., *The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37622-30.
116. Martin, L.J. and J.J. Tremblay, *The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 861-9.
117. Zwermann, O., W. Saeger, and M. Reincke, *Imatinib is not a therapeutic option in adrenocortical cancer*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2004. **112**(S 1): p. P179.
118. Murakumo, Y., et al., *RET and neuroendocrine tumors*. Pituitary, 2006. **9**(3): p. 179-92.
119. Logie, A., et al., *Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line*. J Mol Endocrinol, 1999. **23**(1): p. 23-32.
120. l'Allemand, D., et al., *Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(11): p. 3892-7.
121. Hahner, S. and M. Fassnacht, *Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment*. Curr Opin Investig Drugs, 2005. **6**(4): p. 386-94.
122. Lee, J.O., et al., *Metastatic adrenocortical carcinoma treated with sunitinib: a case report*. Jpn J Clin Oncol, 2009. **39**(3): p. 183-5.
123. Kroiss, M., et al., *Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(10): p. 3495-503.
124. Bilbao-Meseguer, I., et al., *Drug interactions with sunitinib*. J Oncol Pharm Pract, 2015. **21**(1): p. 52-66.
125. van Erp, N.P., et al., *Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity*. Eur J Endocrinol, 2011. **164**(4): p. 621-6.

126. Kroiss, M., et al., *Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2011. **75**(5): p. 585-91.
127. Fottner, C., et al., *Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis*. Horm Metab Res, 2004. **36**(6): p. 397-405.
128. Boulle, N., et al., *Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(5): p. 1713-20.
129. Erickson, L.A., et al., *Pathologic features and expression of insulin-like growth factor-2 in adrenocortical neoplasms*. Endocr Pathol, 2001. **12**(4): p. 429-35.
130. Barlaskar, F.M., et al., *Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 204-12.
131. Almeida, M.Q., et al., *Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(9): p. 3524-31.
132. Fassnacht, M., et al., *Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 426-35.
133. Korzeniewska, M., et al., *[Assessment of pro- and antiangiogenic factors blood serum concentrations in patients with hormonal inactive adrenal tumors]*. Endokrynol Pol, 2005. **56**(1): p. 39-44.
134. de Fraipont, F., et al., *Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4734-41.
135. Kolomecki, K., et al., *Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours*. Endocr Regul, 2001. **35**(1): p. 9-16.
136. Zacharieva, S., et al., *Circulating vascular endothelial growth factor and active renin concentrations and prostaglandin E2 urinary excretion in patients with adrenal tumours*. Eur J Endocrinol, 2004. **150**(3): p. 345-9.
137. Wortmann, S., et al., *Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2009.
138. Gross, D.J., et al., *The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 535-40.
139. Quinkler, M., et al., *Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2057-62.
140. Czabanka, M., et al., *Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy*. Int J Cancer, 2009. **124**(6): p. 1293-300.
141. Abrams, T.J., et al., *Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care"*

- therapeutic agents for the treatment of breast cancer. Mol Cancer Ther, 2003. 2(10): p. 1011-21.*
142. Sonpavde, G., et al., *Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. Urol Oncol, 2008.*
 143. Cumashi, A., et al., *Sunitinib malate (SU-11248) alone or in combination with low-dose docetaxel inhibits the growth of DU-145 prostate cancer xenografts. Cancer Lett, 2008. 270(2): p. 229-33.*
 144. Guerin, O., et al., *Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. 134(1): p. 51-7.*
 145. Schueneman, A.J., et al., *SU11248 maintenance therapy prevents tumor regrowth after fractionated irradiation of murine tumor models. Cancer Res, 2003. 63(14): p. 4009-16.*
 146. Cuneo, K.C., et al., *SU11248 (sunitinib) sensitizes pancreatic cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. 71(3): p. 873-9.*
 147. Zwolak, P., et al., *Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. Eur J Cancer, 2008. 44(16): p. 2506-17.*
 148. Lu, B., et al., *The use of tyrosine kinase inhibitors in modifying the response of tumor microvasculature to radiotherapy. Technol Cancer Res Treat, 2005. 4(6): p. 691-8.*
 149. Faivre, S., et al., *Pancreatic NETs: where do we stand now? Cancer Metastasis Rev, 2014. 33(1): p. 361-6.*
 150. Illouz, F., et al., *Tyrosine kinase inhibitors and modifications of thyroid function tests: a review. Eur J Endocrinol, 2009. 160(3): p. 331-6.*
 151. Desai, J., et al., *Hypothyroidism after sunitinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumors. Ann Intern Med, 2006. 145(9): p. 660-4.*
 152. Nearchou, A., et al., *Acquired Hypothyroidism as a Predictive Marker of Outcome in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors: A Literature-Based Meta-Analysis. Clin Genitourin Cancer, 2014.*
 153. Bianchi, L., et al., *Thyroid dysfunction and tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. Endocr Relat Cancer, 2013. 20(5): p. R233-45.*
 154. Makita, N. and T. Iiri, *Tyrosine kinase inhibitor-induced thyroid disorders: a review and hypothesis. Thyroid, 2013. 23(2): p. 151-9.*
 155. Templeton, A., et al., *Remission of diabetes while on sunitinib treatment for renal cell carcinoma. Ann Oncol, 2008. 19(4): p. 824-5.*
 156. Billefont, B., et al., *Blood glucose levels in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. Br J Cancer, 2008. 99(9): p. 1380-2.*
 157. Hutson, T.E., et al., *Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: an overview of toxicity and dosing strategies. Oncologist, 2008. 13(10): p. 1084-96.*
 158. Launay-Vacher, V. and G. Deray, *Hypertension and proteinuria: a class-effect of antiangiogenic therapies. Anticancer Drugs, 2009. 20(1): p. 81-2.*

159. Yoshino, T., et al., *A case of acute adrenal insufficiency unmasked during sunitinib treatment for metastatic renal cell carcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 2012. **42**(8): p. 764-6.
160. Bilgir, O., et al., *Is there any relationship between imatinib mesylate medication and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction?* Int J Clin Pract, 2010. **64**(1): p. 45-50.

Danksagung

Einige Personen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, die in den Jahren 2007-2009 im Endokrinologischen Labor des Universitätsklinikum Würzburg entstand:

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Faßnacht-Capeller, der diese Arbeit von Beginn an in unterschiedlichen Phasen des Entstehungsprozesses begleitet und immer wieder zur Fertigstellung motiviert hat. Herrn Prof. Dr. Bruno Allolio danke ich dafür, die Untersuchungen im Endokrinologischen Labor durchführen zu dürfen, der stets konstruktiven kritischen Anmerkungen und schließlich auch meiner Anstellung in „seinem“ Schwerpunkt. Vielen Dank für die Möglichkeit, die Ergebnisse der Arbeit auf verschiedenen Kongressen präsentieren zu dürfen.

Für die initiale Betreuung bedanke ich mich bei Frau Dr. Sarah Johanssen (jetzt Endokrinologikum Berlin) und Herrn Dr. Dr. Matthias Kroiß, der schließlich die weitere Betreuung und gemeinsame Erstautorenschaft in der Publikation übernommen hat.

Frau Prof. Dr. Wiebke Arlt und Herrn Dr. Vivek Dhir (Universität Birmingham) danke ich für die Durchführung des Hefe-Mikrosomenversuchs, Herrn Prof. Dr. Wudy und Frau Dr. Hartmann (Universitätskinderklinik Gießen) für die Untersuchungen mittels Isotopenverdünnungs-/Gaschromatographie-Massenspektrometrie.

Vielen Dank an alle Mitarbeitern des Schwerpunkts Endokrinologie der Medizinischen Klinik I für Ihr stets offenes Ohr und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere an Frau Martina Zink für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur, sowie die Durchführung der Western Blots, Frau Melanie Beyer für die Unterstützung bei den PCR-Untersuchungen. Frau Angelika Luthe und den weiteren MTAs aus dem Routinelabor ein herzliches Dankeschön für die Messungen am Immulite 2000 und die stete Hilfsbereitschaft bei Schwierigkeiten mit der Durchführung der Radioimmunoassays.

Von ganzem Herzen ein Dankeschön an meine Familie und meinen Mann Markus, die mich auch in schwierigen Zeiten stets unterstützt haben und immer wieder motivierend zur Seite standen.